

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

LAÍS PRISCILA KARAS

**CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE DADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
RESISTÊNCIA BACTERIANA A PARTIR DE ESPECTROMETRIA DE MASSA DO
TIPO MALDI-TOF**

PONTA GROSSA

2022

LAÍS PRISCILA KARAS

**CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE DADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE
RESISTÊNCIA BACTERIANA A PARTIR DE ESPECTROMETRIA DE MASSA DO
TIPO MALDI-TOF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

Coorientação: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto

PONTA GROSSA

2022

K18 Karas, Laís Priscila
Construção de um banco de dados para a identificação de resistência bacteriana a partir de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF / Laís Priscila Karas. Ponta Grossa, 2022.
58 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi.
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto.

1. Espectrometria de massa. 2. Genes patogênicos. 3. Ribopeaks. 4. Resistência aos antimicrobianos. I. Miyoshi, Edmar. II. Etto, Rafael Mazer. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fisiologia e Fisiopatologia. IV.T.

CDD: 610.28



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA 06/2022 DA MESTRANDA LAÍS PRISCILA KARAS REALIZADA NO DIA 02 DE SETEMBRO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos dois dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte dois, às 8h00min, através do sistema de web conferência da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) via plataforma GoogleMeet – NUTEAD/UEPG, em seção pública, sob a presidência do **Prof. Dr. Rafael Mazer Etto** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Laís Priscila Karas** na linha de pesquisa Fisiopatologia do Sistema Nervoso Central, constituída pelos demais membros titulares: **Drª Maria Isabel Stets** - Instituto de Biologia Molecular do Paraná e **Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira** - DEBIOGEM/UEPG. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **“Construção de um banco de dados para a identificação de resistência bacteriana a partir de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF”**. Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como **APROVADA**. Considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, a aluna deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Alteração de título:

Sugestão:

Prof. Dr. Rafael Mazer Etto - Co-orientador - Presidente

Prof. Dr. Edmar Miyoshi – Orientador

Dra. Maria Isabel Stets – Membro titular

Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira

Ponta Grossa, 02 de setembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por sempre me guiar com as devidas lições e me conduzir pelo melhor caminho.

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando, dando força e apoiando de forma incondicional, e que não mediram esforços para proporcionar um ensino de qualidade, tornando tudo isso possível.

Ao meu irmão, Pedro, que compartilhou comigo todos os momentos, por sempre estar ao meu lado e por me fazer ter confiança nas minhas decisões.

Aos meus avós e familiares, que sempre incentivaram, apoiaram e motivaram durante a trajetória acadêmica.

Ao meu namorado, Gabriel, por fazer parte de toda essa trajetória e deixar a vida mais leve.

Aos meus orientadores, Dr. Edmar Miyoshi, Dr. Rafael Mazer Etto e também a professora Dra. Carolina Weigert Galvão, que esteve a todo momento auxiliando. Agradeço a vocês por toda orientação, dedicação, atenção e amizade. Por toda sabedoria transmitida com tanta humildade, e mais do que isso, por cultivar o amor à pesquisa.

Ao LABMOM, por me proporcionar uma experiência maravilhosa, onde encontrei minha segunda família e amigos que vou levar por toda a vida! Em especial, agradeço ao Renann e Douglas por todo auxílio, atenção e paciência durante o desenvolvimento do trabalho e por estarem sempre à disposição.

Ao LUAC e toda equipe, em especial a minha amiga Larissa, por dividir comigo todos esses momentos.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas e toda a comunidade acadêmica, especialmente aos professores que proporcionaram um ensino de qualidade, transmitindo não apenas o conhecimento, mas fazendo desenvolver um pensamento crítico, a valorizar, lutar pelo ensino público e de qualidade e retribuir de alguma forma à comunidade em geral esta oportunidade.

Às agências de fomento, pelo suporte financeiro à pesquisa.

“O essencial é invisível aos olhos.” (Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Com o objetivo de reduzir o tempo, custo e aprimorar a precisão do diagnóstico, a busca por novas tecnologias para a identificação de microrganismos patogênicos tem se intensificado na área médica. A identificação rápida de patógenos em pacientes que estão hospitalizados é fundamental, já que possibilita o início precoce de uma terapia antimicrobiana apropriada, assegurando a prevenção e controle de infecções. Nesse contexto, a espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF vem se mostrando uma técnica altamente promissora para a identificação de microrganismos. Na prática clínica, essa tecnologia atua de forma revolucionária, uma vez que permite a identificação de bactérias patogênicas em um curto espaço de tempo e com baixo custo se comparado aos métodos de análises bioquímicas ou moleculares tradicionais. Entretanto, devido à grande diversidade bacteriana, para que ocorra uma identificação precisa e adequada há a necessidade de bancos de dados sólidos e completos. Nesse cenário, uma ferramenta que vem ganhando destaque é o Ribopeaks, um software capaz de realizar a identificação de bactérias de forma muito robusta e com grande poder de assertividade. Visando o aperfeiçoamento e a expansão das informações fornecidas pelo software Ribopeaks, o presente trabalho teve por objetivo construir um banco de dados com informações referente a genes patogênicos, permitindo, além da identificação taxonômica, fornecer também dados referentes as possíveis resistências antimicrobianas apresentadas pela bactéria identificada.

Palavras-chave: Espectrometria de Massa, Genes Patogênicos, Ribopeaks, Resistência aos Antimicrobianos

ABSTRACT

In order to reduce time, cost and improve diagnostic accuracy, the search for new technologies for the identification of pathogenic microorganisms has intensified in the medical field. The rapid identification of pathogens in patients who are hospitalized is critical, as it enables early initiation of appropriate antimicrobial therapy, ensuring infection prevention and control. MALDI-TOF mass spectrometry has been shown to be a highly promising technique for the identification of microorganisms. In clinical practice, this technology works in a revolutionary way, as it allows the identification of pathogenic bacteria in a short time and at a low cost compared to traditional biochemical or molecular analysis methods. However, due to the great bacterial diversity, for accurate and adequate identification there is a need for solid and complete databases. In this scenario, a tool that has been gaining prominence is Ribopeaks, a software capable of performing the identification of bacteria in a very robust way and with great power of assertiveness. Aiming at improving and expanding the information provided by the Ribopeaks software, the present work aimed to build a database with information regarding pathogenic genes, allowing, in addition to taxonomic identification, to also provide data regarding possible antimicrobial resistance presented by the identified bacterium.

Keywords: Mass Spectrometry, Pathogenic Genes, Ribopeaks, Antimicrobial Resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do funcionamento do Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF para a identificação de microrganismos.....	17
Figura 2 - Representação da interface do software Ribopeaks.....	20
Figura 3 - Representação dos mecanismos de transferência horizontal de genes.....	28
Figura 4 - Representação dos mecanismos de resistências aos antimicrobianos.....	29
Figura 5 - Representação da interface atualizada do software Ribopeaks.....	38
Figura 6 - Análise de resistências bacterianas em relação às classes de antimicrobianos.....	39
Figura 7 - Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) no continente Americano (2015).....	40
Figura 8 - Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) no continente Europeu (2015).....	41
Figura 9 - Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) em países da região do Mediterrâneo (2015).....	42
Figura 10 - Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) em países da região do Pacífico Ocidental (2015).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação da análise de resistências bacterianas em relação à classe dos β -lactâmicos com correlação de 1% de significância.....	44
Tabela 2 - Relação da análise de resistências bacterianas em relação aos antimicrobianos inibidores de síntese proteica com correlação de 1% de significância.....	45

LISTA DE SIGLAS

MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
TOF	<i>Time of flight</i>
EM	Espectrometria de massa
30S	Subunidade menor do ribossomo em procariotos
50S	Subunidade maior do ribossomo em procariotos
kDa	Unidade de medida, correspondente a mil Daltons
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
NDARO	<i>National Database of Antibiotic Resistant Organisms</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivo Específico	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF	16
3.2	Identificação bacteriana utilizando o software Ribopeaks	19
3.3	Espectrometria de massa e detecção de resistência a antimicrobianos	21
3.4	Resistência aos antimicrobianos	22
3.5	Mecanismos de ação dos antimicrobianos	23
3.5.1	Inibição da síntese da parede celular	24
3.5.2	Alterações das funções ribossomais	24
3.5.3	Alterações na síntese de ácidos nucleicos.....	25
3.5.4	Alterações na síntese de folato	26
3.5.5	Indução da ruptura da membrana celular.....	26
3.6	Mecanismos de resistência	27
3.6.1	Alterações na absorção do fármaco.....	29
3.6.2	Modificação de alvo do fármaco.....	30
3.6.3	Inativação do fármaco	32
3.6.4	Sistemas de efluxo	32
4	JUSTIFICATIVA	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35

5.1	Identificação dos microrganismos	35
5.2	Aquisição dos dados de resistência	35
5.3	Inserção dos dados da plataforma NDARO no sistema Ribopeaks	36
5.4	Análise estatística.....	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A identificação de um microrganismo é o primeiro passo para a resolução de problemas epidemiológicos, uma vez que norteiam medidas emergenciais precisas e essenciais em laboratórios de análises clínicas (TORRES-SANGIAO; RODRIGUEZ; GARCÍA-RIESTRA, 2021; LEO et al., 2020). Dentre as principais técnicas de identificação microbiana utilizadas em laboratórios de microbiologia clínica, encontramos as metodologias convencionais, como os métodos bioquímicos ou a identificação molecular a partir de processos que envolvem técnicas de sequenciamento genético (GE et al., 2017).

Embora os testes bioquímicos apresentem um baixo custo associado ao desenvolvimento da técnica e sejam sensíveis, são métodos demorados e que demandam em torno de 24 a 48 horas para a obtenção dos resultados. Em contrapartida, os métodos moleculares, como o sequenciamento do gene 16S rRNA, são considerados como o padrão ouro, porém envolvem um custo mais alto, além de necessitar de mão de obra qualificada para a execução e interpretação dos resultados (KOSTRZEWA et al., 2019; AYHAN et al., 2021).

Nesse contexto, a busca por novas tecnologias para a identificação de microrganismos tem se intensificado, em uma tentativa de reduzir os custos, o tempo de análise, bem como aprimorar a acurácia do diagnóstico (GILAD-MORAN, 2019; AYHAN et al., 2021).

Diante desse cenário, uma ferramenta que vem se mostrando altamente promissora e com um bom desempenho tanto para a identificação de microrganismos, quanto para determinação de susceptibilidade antimicrobiana é a espectrometria de massa (EM) do tipo MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of flight*) (WEIS; JUTZELER; BORGWARDT, 2020).

A EM do tipo MALDI-TOF vem se tornando uma técnica aliada dos laboratórios de análises clínicas, uma vez que permite a identificação de forma simples e rápida de bactérias gram-positivas ou gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas, além de permitir também a identificação de microrganismos fastidiosos, como alguns fungos e micobactérias (ANGELETTI; CICOZZI, 2019). A técnica também vem sendo empregada para a identificação de vírus, tendo um destaque na atual pandemia, quando utilizada para o SARS-CoV-2 (TRAN et al., 2021).

O princípio da técnica de EM do tipo MALDI-TOF está baseada na avaliação do tempo de voo das amostras ionizadas (WIESER et al., 2012). A identificação e a quantificação das moléculas são realizadas a partir da razão massa/carga (m/z), onde m representa a massa em Daltons e o z a carga do íon. A partir da ionização dos peptídeos e proteínas é possível obter um espectro (FUNG et al., 2020).

Os dados gerados a partir de análises do espectro de massa dos microrganismos são extremamente importantes, uma vez que aliados às ferramentas da bioinformática possibilitam os estudos de aprendizado de máquina, aumentando a precisão na identificação dos microrganismos (AYHAN et al., 2021).

Além disso, o aprimoramento e o desenvolvimento dos softwares e das tecnologias associados à identificação têm permitido um maior emprego da EM e sua utilização em diversas áreas (PSAROULAKI; CHOCHLAKIS, 2018). Dentre esses avanços, encontramos o Ribopeaks, um software que a partir de um modelo classificatório e de dados de proteínas ribossomais é capaz de realizar a identificação de bactérias de forma muito robusta e com grande poder de assertividade (TOMACHEWSKI et al., 2018).

Além dos benefícios na identificação de bactérias, a técnica também vem sendo utilizada como um instrumento para a tipagem de cepas e a detecção de resistência aos antimicrobianos (OVIAÑO; BOU, 2019). Atuando como uma ferramenta promissora na detecção de resistência aos antimicrobianos, já que a busca por metodologias rápidas na detecção de resistências vem se intensificando, principalmente quando se leva em conta os índices crescentes de microrganismos multirresistentes (IDELEVICH; BECKER, 2019; IDELEVICH et al., 2021).

O tratamento com antibacterianos foi uma revolução para o século XX, tornando-se um aliado na prevenção contra mortes por infecção bacteriana (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016). Entretanto, o uso inadequado dessa classe de fármacos vem corroborando para a seleção de genes resistentes, sendo motivo de preocupação no contexto da saúde pública global (ISKANDAR et al., 2022). Dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), revelaram que em 2017 a infecção por sepse foi responsável por 20% das mortes globais, correspondendo a 11 milhões de mortes (WHO, 2020).

Dessa forma, o início rápido de uma terapia antimicrobiana adequada é primordial, principalmente em pacientes hospitalizados, visto que auxilia no controle e prevenção de infecções, bem como na redução do tempo de internação do paciente

e na taxa de mortalidade, o que conseqüentemente impacta de forma positiva na saúde pública, uma vez que reduz os custos hospitalares (RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ et al., 2019; OVIAÑO; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2021).

Na tentativa de expandir e aprimorar a identificação dos microrganismos utilizando EM bem como a identificação de resistência aos antimicrobianos, o presente trabalho teve por intenção a construção de um banco de dados com informações referentes a genes que conferem patogenicidade. Os dados obtidos no presente trabalho serão unidos ao banco de dados PUCHUY, desenvolvido por Silva et al. (2019), o qual foi gerado a partir da carga/massa de proteínas ribossomais de bactérias que possuem genoma completamente sequenciado.

Dessa forma, além de auxiliar na identificação bacteriana, a ferramenta também irá fornecer dados referentes a genes patogênicos, o que possibilita um direcionamento em relação às possíveis resistências apresentadas pelo microrganismo em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificação de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos e atualização do software de identificação bacteriana Ribopeaks.

2.2 Objetivo Específico

- Análise e seleção de proteínas relacionadas à resistência aos antimicrobianos, presentes em genomas bacterianos depositados no GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology);
- Montagem de um banco de dados das proteínas relacionadas à resistência aos antimicrobianos;
- Identificação de bactérias resistentes aos antimicrobianos usando dados de massa/carga de proteínas ribossomais;
- Determinação do padrão de resistência aos antimicrobianos nos diferentes grupos taxonômicos de bactérias.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF

A expansão da EM para uma variedade maior de amostras começou a ser cogitada a partir de 1960. Até então, a técnica era utilizada principalmente na química, com a finalidade de investigar as propriedades dos átomos, como a caracterização de suas massas, sendo também a primeira ferramenta capaz de revelar os isótopos (GRIFFITHS, 2008).

Somente na década de 80 surgiram trabalhos envolvendo macromoléculas, como os desenvolvidos por Karas e Hillenkamp (1987) e Tanaka (1988) o que abriu caminho para a utilização de biomoléculas com tamanhos maiores presentes em células bacterianas (GRIFFITHS, 2008; SCHUMANN; MAIER, 2014).

A partir de então, a inserção da EM do tipo MALDI-TOF nas rotinas de laboratórios clínicos vem sendo incorporada em análises patológicas, na bioquímica clínica, na substituição de análises moleculares e principalmente na área microbiológica, onde contribui de forma significativa para a rápida identificação de patógenos, além de estar associada a resultados de alta qualidade (DUNCAN; DEMARCO, 2019; KOSTRZEWA et al., 2019).

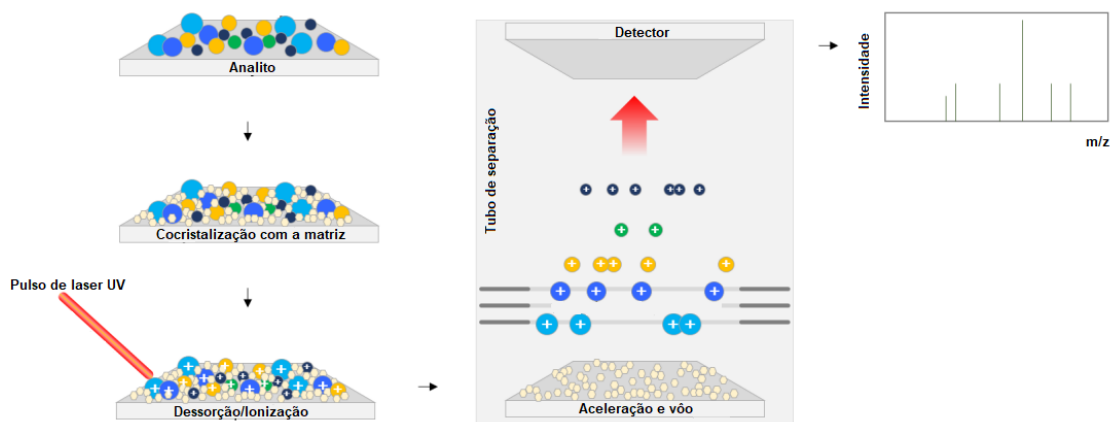
A rápida identificação proporcionada pela técnica, se dá pela maior agilidade no fluxo de trabalho dentro do laboratório, uma vez que não há a necessidade de execução de algumas etapas, as quais seriam necessárias ao se empregar os métodos convencionais (FLORIO et al., 2018).

Dentre essas etapas, a cultura prévia em placas de ágar para a obtenção de colônias já não é mais obrigatória para muitas amostras (TSUCHIDA; UMEMURA; NAKAYAMA, 2020). O que constitui um grande salto na identificação de microrganismo, já que, amostras de sangue, de urina e de líquido cefalorraquidiano podem ser analisadas de forma direta (TORRES-SANGIAO; RODRIGUEZ; GÁRCIA-RIESTRA, 2021).

Embora haja a possibilidade de análise direta de algumas amostras, a técnica também permite a transferência direta de células bacterianas previamente cultivadas para a placa do equipamento, além disso, outra alternativa seria realizar o método de extração de proteínas das células bacterianas cultivadas, na tentativa de obter resultados com uma melhor qualidade (ASHFAQ; DA'NA; AL-GHOUTI, 2022)

O espectrômetro de massa é composto por três partes. Na primeira parte encontramos uma fonte de laser que tem por função ionizar as moléculas da amostra e transferir os íons gerados para uma fase gasosa, nessa etapa a matriz possui um papel fundamental na ionização, já que é capaz de absorver a energia do laser e assim facilitar a ionização das amostras cristalizadas (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

Figura 1 - Representação do funcionamento do Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF para a identificação de microrganismos



Adaptado de: YOON, E-J.; JEONG, S. H. MALDI-TOF mass spectrometry technology as a tool for the rapid diagnosis of antimicrobial resistance in bacteria. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 982, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34439032/>. Acesso em: 26 fev. 2022.

Legenda: Representação do funcionamento do Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF para a identificação de microrganismos. Esquema adaptado, representando o funcionamento do MALDI-TOF, até a obtenção de um espectro de massa, a ionização das amostras, o voo das macromoléculas ionizadas da amostra pelo tubo, a captação dos sinais pelo detector e a geração dos picos no espectro.

Além de atuar na ionização do analito, e na doação de prótons, uma matriz ideal deve apresentar outros requisitos, como um peso molecular adequado e uma boa absorção do laser, tornando assim o processo rápido e eficiente (YOON; JEONG, 2021). Com a incidência do laser não há a fragmentação das moléculas, mas sim, a passagem para uma fase gasosa (OVIÂNIO; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2021).

A segunda parte é composta por um analisador de massa, que tem por função acelerar os íons com o auxílio de um campo magnético. Durante o percurso dentro do analisador TOF é possível verificar que cada íon possui uma velocidade distinta, correspondente à sua massa respectiva e à carga recebida durante a ionização, dessa forma, essa etapa permite a separação de acordo com a razão massa/carga (m/z) (CHONG et al., 2018). Por fim, a terceira parte consiste em um detector que tem a capacidade de captar os sinais e gerar um espectro (WOLK; CLARK, 2018).

O princípio da técnica está baseado na identificação dos microrganismos a partir dos diferentes perfis proteicos que são gerados (CULEBRAS, 2018). A partir da razão massa/carga (m/z) gerada na EM, é formado um espectro digital característico, específico e exclusivo para cada microrganismo, que atua de forma semelhante a uma impressão digital (ANGELETTI, 2017).

Para a classificação dos organismos, os perfis proteicos são analisados geralmente em uma faixa que compreende de 2 a 20 kDa, região essa que corresponde principalmente às proteínas ribossomais (WIESER et al., 2012; OVIÂNIO; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, 2021). As proteínas ribossomais, são consideradas proteínas *housekeeping* e representam cerca de 60 a 70% do peso da massa seca do microrganismo (NAKAMURA et al., 2017; HAN; JEONG; CHOI, 2021).

Dentro dos espectros gerados por MALDI-TOF, marcadores únicos e específicos são buscados e com o auxílio do aprendizado de máquina os diferentes perfis podem ser identificados (LEE et al., 2019). A rapidez e agilidade oferecidas pela técnica durante a identificação direta de amostras sanguíneas, pode ser verificada em diversos trabalhos (CHEN et al., 2021).

Em um estudo realizado por Dai *et al.* (2021), a utilização da espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF foi capaz de reduzir o tempo de identificação de microrganismos presentes em amostras de sangue para 20 minutos, além de apresentar uma precisão de 87%. Outro trabalho, desenvolvido por Lo *et al.* (2020), revelou que a avaliação de amostras sanguíneas com o auxílio da EM do tipo MALDI-TOF foi capaz de reduzir o tempo de identificação, bem como o tempo de início de uma terapia antimicrobiana adequada.

Já quando a técnica foi empregada em amostras de urina, foi possível verificar que o tempo para a identificação bacteriana reduziu entre 24 a 48 horas quando comparada aos métodos de cultivo convencionais (LEI et al., 2021).

Mais do que a identificação dos microrganismos, a técnica também possibilita ampliar o entendimento e a relação existente entre as doenças e seus respectivos patógenos, uma vez que é capaz de identificar fatores de virulência e mecanismos de resistência (KOSTRZEWA et al., 2019; TORRES-SANGIAO et al., 2021).

Atualmente, dentre os sistemas comercializados para identificação a partir de espectros de massa, dois fabricantes despontam no mercado, sendo o sistema alemão Bruker Biotyper (Bruker Daltonics) e o francês Vitek MS (bioMérieux) (KOSTRZEWA et al., 2019; COX; HARRIS, 2021). Diante desse panorama, para que

ocorra uma identificação precisa a partir de EM do tipo MALDI-TOF há a necessidade de bancos de dados sólidos e completos (NOMURA, 2015). Entretanto, um dos maiores problemas encontrados para a identificação de microrganismos a partir da técnica de EM é justamente a carência de bancos de dados que contemplem a grande diversidade bacteriana (TSUCHIDA, 2018).

Além disso, a acessibilidade de produtos que envolvem inteligência artificial ainda é escassa no mercado, o que dificulta a implementação em laboratórios de análises clínicas. Outra barreira é o fato de que poucos estudos tornam seus dados públicos, dificultando assim a análise e reprodutibilidade dos ensaios (WEIS et al., 2020; BRUYNE et al., 2020).

3.2 Identificação bacteriana utilizando o software Ribopeaks

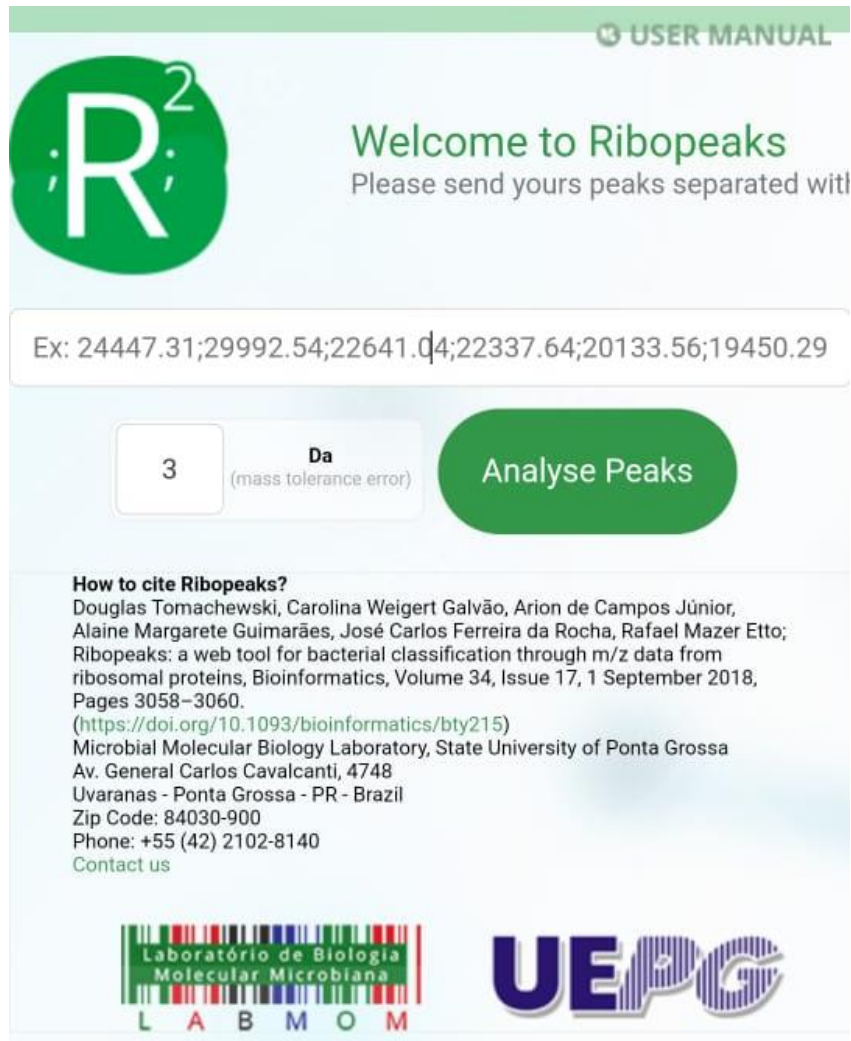
A identificação rápida e de baixo custo são fatores relevantes, uma vez que estão atrelados ao início de uma terapia antimicrobiana adequada, bem como a benefícios econômicos (HAN; JEONG; CHOI, 2021).

Nesse sentido, a EM do tipo MALDI-TOF é uma ferramenta promissora, visto que possibilita a rápida identificação, exercendo um papel importante tanto na redução das taxas de mortalidade quanto na transmissão de infecções (ALIZADEH et al., 2021).

Dentro desse contexto, o software Ribopeaks juntamente com a base de dados PUKYU, constituem um importante instrumento para a identificação bacteriana, uma vez que apresentam dados referentes a 57 tipos diferentes de proteínas ribossomais, totalizando 28.505 registros bacterianos, 6.936 espécies e 1.949 gêneros (SILVA, 2021).

Ao utilizar o software para a identificação bacteriana, o usuário necessita carregar as informações referentes às massas moleculares das proteínas ribossomais que foram obtidas a partir da análise de EM na plataforma da ferramenta, como ilustrado na Figura 2 (TOMACHEWSKI, 2017).

Figura 2 - Representação da interface do software Ribopeaks



Fonte: TOMACHEWSKI, D.; GALVÃO, C. W.; DE CAMPOS JÚNIOR, A.; GUIMARÃES, A. M.; DA ROCHA, J. C. F.; ETTO, R. M. Ribopeaks: a web tool for bacterial classification through m/z data from ribosomal proteins. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. 3058-3060, 2018. Disponível em: <http://www.ribopeaks.com>. Acesso em: 3 abr. 2022.

Legenda: Representação da interface do software Ribopeaks. Ilustração representando a interface do software Ribopeaks, que conta com a presença de uma caixa onde há a possibilidade de digitar ou colar os valores de massa/carga obtidos a partir da análise de EM do tipo MALDI-TOF. Além disso, há a possibilidade de selecionar a busca de dados apenas no banco de dados das proteínas ribossomais 30S e 50S, ou no banco de dados que apresenta genomas completos, ou ainda em ambos os bancos.

O software desenvolvido por Tomachewski *et al.* (2018) foi testado com dados de 116 microrganismos, obtidos a partir do trabalho de Ziegler *et al.* (2015). Ao final, os resultados apresentaram um desempenho de identificação de 87,93% para nível de espécie e de 90,51% para o nível de gênero (TOMACHEWSKI *et al.*, 2018). Dessa forma, o Ribopeaks se caracteriza como uma importante ferramenta de identificação bacteriana.

3.3 Espectrometria de massa e detecção de resistência a antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é um fator de grande impacto tanto na saúde humana quanto no setor econômico, sendo um perigo eminente (FEUCHEROLLES; CAUCHIE; PENNY, 2019). De acordo com as principais agências regulatórias do mundo, para o século XXI, a resistência aos antimicrobianos é considerada uma das maiores ameaças para a saúde global (ASLAM et al., 2021).

Os reflexos negativos da resistência antimicrobiana são visualizados na sociedade através de uma maior morbidade e mortalidade dos pacientes, resultando em uma necessidade maior de recursos a serem utilizados, o que por consequência eleva os custos hospitalares (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016).

A persistência de genes de resistência no ambiente e o acúmulo de resíduos de antimicrobianos, se deve em parte pelo uso indiscriminado desses medicamentos nas mais diversas áreas (ASLAM et al., 2021).

Dessa forma, a identificação rápida de um patógeno associado ao início de uma terapia antimicrobiana adequada são pontos-chave para o controle de infecções e nesse contexto, a EM do tipo MALDI-TOF é um importante instrumento, já que possibilita a identificação dos microrganismos (HRABÁK; CHUDÁCKOVÁ; WALKOVÁ, 2013). Além da identificação, a técnica também vem ganhando espaço na detecção de resistência aos antimicrobianos, uma vez que os espectros gerados permitem obter dados extras que possibilitam analisar a suscetibilidade antimicrobiana (WEIS et al., 2022).

Dentre os testes utilizados para verificar a suscetibilidade antimicrobiana, encontramos as metodologias convencionais que incluem os testes de disco difusão, em que será verificada a inibição do crescimento microbiano ao redor do disco contendo o antibiótico, e o teste de microdiluição, onde se avalia a concentração inibitória mínima do fármaco capaz de inibir o crescimento do microrganismo, além de antibiogramas automatizados e técnicas moleculares. Entretanto, uma das principais problemáticas é o tempo demandado por tais metodologias (FEUCHEROLLES; CAUCHIE; PENNY, 2019; VRIONI et al., 2018; BENKOVA; SOUKUP; MAREK, 2020).

Diante desse panorama, a EM do tipo MALDI-TOF vem se apresentando como uma ferramenta extremamente importante, na rápida detecção de patógenos e na resistência antimicrobiana (CHEN et al., 2021).

Para a detecção de resistência antimicrobiana, a técnica emprega quatro diferentes metodologias:

- I) Análise de hidrólise da molécula do antimicrobiano, através de enzimas produzidas pelas bactérias, como por exemplo, a hidrólise do anel dos β -lactâmicos;
- II) Identificação de perfis de massa específicos encontrados no espectro;
- III) Marcação de moléculas de aminoácidos e sua detecção no espectro;
- IV) Avaliação dos perfis gerados com o crescimento do microrganismo na presença e na ausência do antimicrobiano (FEUCHEROLLES; CAUCHIE; PENNY, 2019; VRIONI et al., 2018).

3.4 Resistência aos antimicrobianos

Os antimicrobianos são responsáveis por um dos maiores avanços na área médica no século XX, tendo em vista sua implementação no tratamento de infecções bacterianas, que vem sendo empregado há mais de 70 anos, além de seu uso nas mais diversas áreas (UDDIN et al., 2021).

Dentro dessa classe de fármacos, três deles marcaram o início da terapia antimicrobiana: Arsfenamina (Salvarsan), Sulfonamina (Prontosil) e Penicilina. O composto Salvarsan surgiu a partir de pesquisas desenvolvidas por Paul Erlich *et al.* (1904), na tentativa de buscar um tratamento para a sífilis, até então tratada com compostos altamente tóxicos derivados de sais de mercúrio (AMINOV, 2010). Já em 1932, pesquisadores alemães sintetizaram um corante vermelho que apresentava eficácia contra determinadas infecções bacterianas em camundongos, corante esse, que em 1935 se tornou comercialmente disponível com o nome de Sulfonamina (Prontosil) (LESCH, 2007). Mas somente em 1940 iniciou-se a comercialização da penicilina, uma descoberta acidental de Alexander Fleming em 1928, que ficou conhecida como o 'nascimento da era dos antibióticos' (FLEMING, 1929; MOHR, 2016).

Entretanto, o uso indevido desses fármacos nos mais diversos seguimentos, favorece a resistência aos antimicrobianos ao redor do mundo (MCEWEN; COLLIGNON, 2018). Sendo Fleming, um dos primeiros a alertar sobre as possíveis resistências à penicilina devido ao seu uso incorreto. Isso torna-se evidente quando levamos em conta a diferença entre a concentração inicial de penicilina, para a comercializada ao final de 1941, inicialmente a concentração produzida era de 4 unidades por mL, saltando para 40 unidades por mL (AMINOV, 2010; DODDS, 2017).

A resistência aos antimicrobianos é dada como a capacidade que uma bactéria tem de resistir ao fármaco que antes possuía a capacidade de inibir seu crescimento. Dessa forma, quando um microrganismo se torna resistente a determinado antimicrobiano, é possível verificar que a dose usual já não é mais suficiente, o que demanda por uma concentração maior do medicamento para o efeito desejado, havendo a necessidade da implantação de novas estratégias para o tratamento antimicrobiano (ZAMAN et al., 2017; RAYMOND, 2019).

A resistência a essa classe de medicamentos, além de estar relacionada com questões de saúde pública, também vem se tornando uma preocupação econômica. Estima-se uma queda na produção do produto interno global de 7% entre 2015 e 2050, o que corresponde a aproximadamente 210 trilhões de dólares (DODDS, 2017).

Diversos são os fatores envolvidos que levam um organismo a apresentar resistência aos antimicrobianos, dentre eles (UDDIN et al., 2021):

- I – Desenvolvimento de resistência por questões naturais
- II – Mutação genética
- III – Transferência de material genético
- IV – Pressão seletiva
- V – Diagnóstico inadequado
- VI – Prescrição inadequada de antimicrobianos
- VII – Automedicação
- VIII – Ambiente hospitalar inadequado
- IX – Uso extensivo de antimicrobianos no agronegócio
- X – Escassez de novos antimicrobianos.

3.5 Mecanismos de ação dos antimicrobianos

Para uma boa compreensão dos mecanismos de resistência apresentados pelas bactérias, é de fundamental importância compreender primeiramente os mecanismos pelos quais os antimicrobianos agem nesses microrganismos (ABUSHAHEEN et al., 2020).

Os agentes antimicrobianos podem atuar através de cinco mecanismos distintos (BYARUGABA, 2010):

- I) Inibição da síntese da parede celular;
- II) Alterações das funções ribossomais;

- III) Alterações na síntese de ácidos nucleicos
- IV) Alterações na síntese de folato
- V) Indução da ruptura da membrana celular

3.5.1 Inibição da síntese da parede celular

Ao redor das bactérias encontramos camadas poliméricas de açúcares, que agrupados são responsáveis pela formação dos polímeros, os quais constituem a estrutura da parede celular (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). A parede celular além de assegurar a estrutura bacteriana é um constituinte de extrema importância, já que permite manter as condições ideais de pressão osmótica, e servir como uma barreira protetora contra fatores externos (GREEN, 2002).

A formação dessa estrutura é mediada por duas enzimas, as transglicosidases e transpeptidases, capazes de realizar a junção dos açúcares N-acetilglucosamina e Ácido N-acetilmurâmico, que juntamente com as cadeias peptídicas, darão origem ao peptidoglicano da parede celular (REYNOLDS, 1989; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Entretanto, algumas classes de antimicrobianos, como os β -lactâmicos ou glicopeptídeos, são capazes de desestabilizar a parede celular, tornando assim, a célula bacteriana mais susceptível. A primeira classe é responsável por promover a acilação do sítio ativo da transpeptidase, inibindo assim a enzima responsável pela reticulação dos açúcares. Já a segunda classe, age por meio de um impedimento no substrato da enzima, uma vez que se liga na porção terminal D-Alanina-D-Alanina impedindo o acesso da transpeptidase (BOCKSTAEL; AERSCHOT, 2009; JAMES et al., 2012; BASU; BANIK, 2017; SAGAR et al., 2019).

3.5.2 Alterações das funções ribossomais

A síntese proteica é um dos elementos primordiais para o bom desenvolvimento e correto funcionamento celular, processo esse, catalisado pelos ribossomos (SCHMEING; RAMAKRISHNAN, 2009). Os ribossomos são formados por duas estruturas, sendo uma subunidade menor 30S e uma subunidade maior 50S, constituídas por 21 e 36 proteínas respectivamente (BOCKSTAEL; AERSCHOT, 2009).

Durante esse processo de biossíntese de proteínas, chamado de tradução, existem alguns passos, como: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos (LAURSEN et al., 2005). Todo esse mecanismo, atua como um excelente alvo, já que contempla diversas fases para a ação dos antimicrobianos (WILSON et al., 2005).

Dentre os antimicrobianos que atuam na subunidade 30S, existem aqueles que são responsáveis por inibir o início do processo de tradução no sítio P, impedindo uma ligação estável entre o RNA transportador e o códon de iniciação, o que consequentemente gera erros na leitura do RNA mensageiro (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017; WILSON, 2014). Já outros antimicrobianos, que agem na mesma subunidade, apresentam como alvo o sítio A, sendo capazes de interferir no alongamento da tradução ou na translocação (WILSON, 2014).

Já o mecanismo apresentado por aqueles antimicrobianos que agem na subunidade 50S, em sua maioria, estão relacionados a interferências nas ligações peptídicas, visto que suas ações se concentram na enzima peptidil-transferase (WILSON, 2014).

Dentre as classes de antimicrobianos que promovem alterações e a inibição da síntese proteica encontramos os aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, oxazolidinonas e o cloranfenicol, pertencente a classe dos anfenicóis (BOCKSTAEL; AERSCHOT, 2009).

3.5.3 Alterações na síntese de ácidos nucleicos

O espaço requerido para a compartimentalização do DNA bacteriano seria superior ao tamanho da própria bactéria caso este não estivesse em um tamanho reduzido, ou seja, em um formato mais compacto (CALVO; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2009).

Entretanto, para que ocorra de forma correta o processo de replicação e transcrição do material genético bacteriano há a necessidade de encontrar o DNA de uma forma menos compacta, o que é permitido devido a ação de enzimas como a DNA girase e a topoisomerase (CALVO; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2009; GOODMAN; GILMAN, 2011).

Dentre os fármacos que promovem alterações na síntese de DNA encontramos a classe das quinolonas e fluoroquinolonas, responsáveis por bloquear a ação das enzimas responsáveis por promover a descompactação do material

genético bacteriano, tornando assim o cromossomo bacteriano inacessível para os processos de síntese (PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019; KAUR et al., 2022).

Já a rifamicina constitui outra classe de fármacos que age bloqueando um dos primeiros passos da expressão gênica, por meio da inibição da síntese de RNA, a partir do bloqueio da enzima RNA polimerase (GOODMAN; GILMAN, 2011; MOSAEI; ZENKIN, 2020).

3.5.4 Alterações na síntese de folato

O folato é um elemento essencial para a produção de bases nitrogenadas, aminoácidos e nucleotídeos, sendo assim, alterações na sua via metabólica impactam diretamente na replicação do DNA e como consequência na sobrevivência do microrganismo (CALVO; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2009; ZHOU et al., 2013).

Dentro da via de síntese do ácido fólico, as sulfonamidas e a trimetoprima são antimicrobianos que agem em dois passos distintos (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017). As sulfonamidas são compostos sintéticos que se assemelham ao ácido para-aminobenzóico (PABA), atuando como inibidores competitivos da enzima diidropteroato sintase, enzima essa, responsável por uma das etapas precursoras da formação de ácido fólico (GOODMAN; GILMAN, 2011; ZHAO et al., 2016). Já a trimetoprima, atua em outra etapa da via, inibindo a enzima diidrofolato redutase (SCOCCHERA; WRIGHT, 2017).

3.5.5 Indução da ruptura da membrana celular

A membrana celular externa de bactérias gram-negativas é uma estrutura fosfolipoproteica que permite a manutenção da integridade e das condições internas ideais (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010; SUN et al., 2022).

A ruptura dessa estrutura leva à alteração de sua função, o que é a base para o mecanismo de ação de alguns antimicrobianos, como a classe das polimixinas, que promovem a ruptura da membrana celular, através da interação eletrostática formada entre a carga positiva do fármaco e a carga negativa apresentada pelo lipídio A, do lipopolisacarídeo (YIN et al., 2020; MOHAPATRA; DWIBEDY; PADHY, 2021).

Alterações na função da membrana celular também podem ser verificadas pela daptomicina, um fármaco representante da classe dos lipopeptídeos, que possui a capacidade de se ligar à membrana celular, provocar despolarização através do

efluxo de potássio, resultando em uma perda de potencial e como consequência a inviabilidade celular (BOCKSTAEL; AERSCHOT, 2009; GOODMAN; GILMAN, 2011).

3.6 Mecanismos de resistência

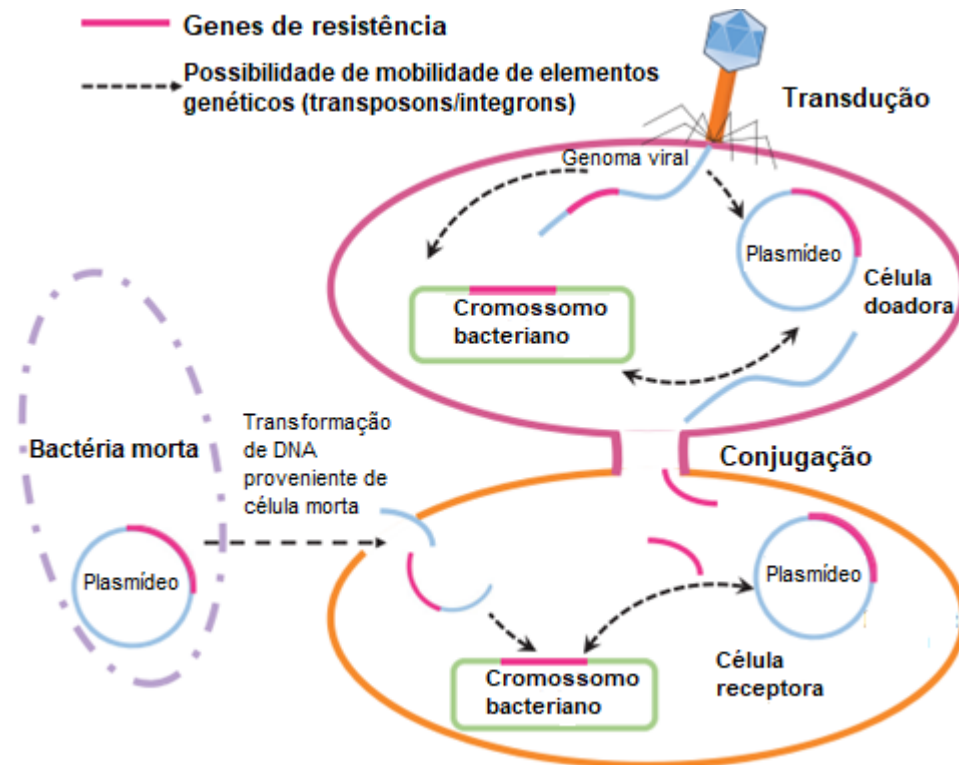
Com a introdução da terapia antimicrobiana em meados de 1900, a batalha contra os microrganismos era dada por vencida, entretanto, a resistência a essa classe de fármacos logo veio à tona (REYGAERT, 2018).

Por um bom período de tempo a resistência aos antimicrobianos foi contornada com o surgimento contínuo de novos antibióticos no mercado, entretanto, a queda no desenvolvimento de novos fármacos nos últimos anos provocou uma mudança no cenário, resultando em uma prevalência maior de patógenos resistentes (MARTINEZ, 2014).

A origem da resistência pode ser dada de formas distintas, podendo se apresentar como uma resistência intrínseca, ou seja, é a forma de resistência inerente ao microrganismo, antes mesmo de ser exposto ao antimicrobiano (MARTINEZ, 2014). Dentre os mecanismos encontrados na resistência intrínseca está a alteração de permeabilidade, presença de bombas de efluxo e a modificação de alvos (OLIVARES et al., 2013).

Outra forma de resistência é a adquirida, que pode ser temporária ou permanente, podendo ser obtida através de mutações no DNA cromossomal, ou por meio da transferência horizontal de genes, que pode ocorrer através de três processos distintos: transformação, transdução ou conjugação (Figura 3) (REYGAERT, 2018; ISKANDAR et al., 2022).

Figura 3 - Representação dos mecanismos de transferência horizontal de genes



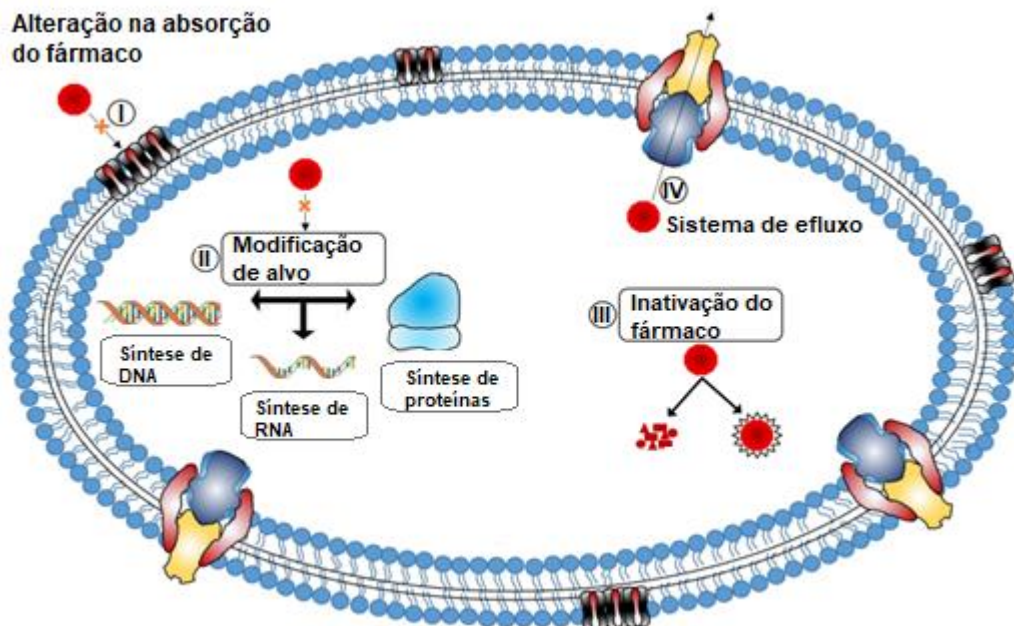
Adaptado de: NADEEM, S. F.; GOHAR, U. F.; TAHIR, S. F.; MUKHTAR, H.; PORNPUKDEEWATTANA, S.; NUKTHAMNA, P.; ALI, A. M. M.; BAVISSETTY, S. C. B.; MASSA, S. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 578-599, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32954887/>. Acesso em: 26 fev. 2022. Legenda: Representação dos mecanismos de transferência horizontal de genes. Esquema adaptado, representando os mecanismos responsáveis pela transferência horizontal de genes, englobando os processos de transformação, conjugação e transdução.

Entretanto, existem variações entre os mecanismos de resistência utilizados por Bactérias Gram-Positivas (BGP) e Bactérias Gram-Negativas (BGN), uma vez que BGN são notoriamente mais resistentes que BGP e isso se deve em parte às diferenças estruturais apresentadas por esses microrganismos (REYGAERT, 2018; ISKANDAR et al., 2022).

As resistências aos antimicrobianos são divididas em quatro mecanismos principais (TENOVER; MCGOWAN, 2008):

- I) Alterações na absorção do fármaco
- II) Modificação do alvo do fármaco
- III) Inativação do fármaco
- IV) Sistemas de efluxo

Figura 4 - Representação dos mecanismos de resistências aos antimicrobianos



Adaptado de: KAPIL, S.; KUMAR, T.; SHARMA, V. Mechanism and challenges associated with adaptation and Evolution of drug-resistant bacteria: an overview. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 1-18, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/340848721_Mechanism_and_challenges_associated_with_a_daptation_and_evolution_of_drug-resistant_bacteria_an_overview. Acesso em: 20 jan. 2021.

Legenda: Representação dos mecanismos de resistências aos antimicrobianos. Esquema adaptado, representando os mecanismos responsáveis por conferir resistência aos antimicrobianos, englobando os processos de: I) Alteração na absorção do fármaco, II) Modificação de alvo; III) Inativação do fármaco e IV) Sistema de efluxo.

3.6.1 Alterações na absorção do fármaco

A diminuição na permeabilidade dos antimicrobianos se constitui como um dos mecanismos de resistência, já que a grande maioria desses fármacos necessita penetrar o interior da célula bacteriana para exercer sua ação (MUNITA; ARIAS, 2016).

Dentro desse contexto, existem diferenças inerentes as BGN em relação às BGP, uma vez que a camada de lipopolisacarídeos presente nas BGN funciona como uma barreira, tornando-as menos permeáveis a alguns antimicrobianos, como a vancomicina (UDDIN et al., 2021).

Outro mecanismo apresentado pelas bactérias são modificações nas porinas, que são canais que possibilitam o influxo de compostos, sendo também um dos meios pelos quais os antimicrobianos conseguem ter acesso ao interior da célula (PAGÈS;

JAMES; WINTERHALTER, 2008). As modificações apresentadas nesses canais podem ocorrer por meio da perda de porinas, modificações em seu diâmetro e condutância ou então por uma menor expressão (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020). Os antimicrobianos mais afetados por esse tipo de resistência são aqueles considerados hidrofílicos, sendo representados pelas tetraciclinas, β -lactâmicos e fluoroquinolonas (BLAIR et al., 2015; UDDIN et al., 2021).

A diminuição da expressão de porinas ou a mudança de sua seletividade também afeta a entrada de moléculas polares em enterococos, sendo os aminoglicosídeos uma classe de fármacos que sofre a ação desse mecanismo de resistência (UDDIN et al., 2021).

Outro fator que possibilita a alteração de permeabilidade e proteção contra os agentes antimicrobianos é a produção de biofilme, que além de reduzir o acesso desses fármacos, também reduz a ação daqueles que atuam em processos de divisão celular, já que os microrganismos que se encontram envoltos por esse composto apresentam uma redução no metabolismo e como consequência uma queda no processo da divisão celular (REYGAERT, 2018).

3.6.2 Modificação de alvo do fármaco

A alteração do sítio alvo dos antimicrobianos representa um importante mecanismo de resistência bacteriana, tendo em vista a ampla gama de locais onde esses fármacos podem atuar (ZHU; HUANG; YANG, 2022).

Um dos alvos de modificação encontrados em BGP, que afeta a classe dos β -lactâmicos, está relacionado ao aumento da quantidade ou então modificação do arranjo das Proteínas Ligadoras de Penicilina, do inglês Peptide Binding Protein (PBPs), proteínas essas que estão relacionadas à formação da parede celular (UDDIN et al., 2021). Nesse caso, as chances de que ocorram ligações adequadas do antimicrobiano com o alvo são reduzidas tanto pelo fato de um aumento na quantidade dessas proteínas, o que faz com que a probabilidade da ligação entre o antimicrobiano e o alvo diminua, quanto pela modificação do arranjo do alvo, impossibilitando uma interação adequada (REYGAERT, 2018).

Dentro desse contexto encontramos os genes *mecA*, responsáveis por conferir resistência bacteriana ao *Staphylococcus aureus*, através da produção de uma proteína ligadora de penicilina diferente, denominada PBP2a, a qual impede uma ligação adequada do antimicrobiano, tornando os β -lactâmicos, como as penicilinas,

cefalosporinas e carbapenêmicos, ineficazes contra esse patógeno (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; NADEEM et al., 2020).

Assim como os β -lactâmicos, os glicopeptídeos também atuam na parede celular, entretanto, por mecanismos diferenciados, enquanto a primeira classe interfere nas PBPs, a segunda classe causa dano nas ligações dos peptidoglicanos quando se liga à porção D-alanina-D-alanina da parede celular (MUNITA; ARIAS, 2016).

A vancomicina, fármaco representante dos glicopeptídeos, sofre resistência por meio da modificação do seu alvo, onde os genes *van*, presentes principalmente no grupo dos *Enterococcus*, possuem a capacidade de modificar a porção final dos precursores de peptidoglicanos, substituindo a alanina por uma serina ou lactato, modificação essa que impede a ligação do antimicrobiano (DHANDA et al., 2019; NADEEM et al., 2020).

A resistência na modificação de alvo é um mecanismo que afeta também o grupo das quinolonas, medicamentos que agem na síntese de ácidos nucleicos, inibindo a ação das enzimas DNA girase e topoisomerase (HAWKEY, 2003). Nesse caso, genes da família *qnr* conferem proteção às enzimas DNA girase e topoisomerase através da ligação de proteínas que impedem a ação dos antimicrobianos (BLAIR et al., 2015).

A ação da daptomicina, um composto pertencente à classe dos lipopeptídeos, se dá através de interações eletrostáticas entre a carga negativa da membrana celular e a carga positiva do fármaco após complexo formado com moléculas de cálcio (MUNITA; ARIAS, 2016). Entretanto, mutações nos genes *mprF*, são capazes de causar alterações na carga da membrana celular, promovendo uma repulsão eletrostática que interfere na ação da daptomicina (ERNST; PESCHEL, 2019).

A modificação do alvo também é encontrada para aqueles fármacos que agem nas proteínas ribossomais, como os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (NADEEM et al., 2020). Essas resistências geram uma redução na afinidade de ligação entre o antimicrobiano e o alvo, podendo ser geradas a partir de três mecanismos distintos: mutações ribossômicas, mecanismos de proteção ribossomal ou metilação da subunidade ribossomal, sendo a metilação desencadeada principalmente por genes *erm* (REYGAERT, 2018).

As sulfonamidas e o trimetopim, fármacos inibidores das enzimas relacionadas com a via metabólica da síntese do ácido fólico, também sofrem a ação

da resistência por modificação do alvo (REYGAERT, 2018). Em ambos os casos a resistência pode ser verificada através da produção de enzimas que impossibilitam a ligação do antimicrobiano ao fármaco (FLENSBURG; SKÖLD, 1987; HUOVINEN, 1987; BURNS, 1995).

3.6.3 Inativação do fármaco

As enzimas são as moléculas protagonistas dos mecanismos de resistência que levam em conta a inativação dos antimicrobianos, uma vez que possuem a capacidade de realizar a hidrólise, ou modificações do fármaco por adição de grupos químicos (REYGAERT, 2018; MOHANTY; PACHPUTE; YADAV, 2021). Há uma diversidade muito grande de enzimas conhecidas por possuírem a capacidade de degradar diversas classes de fármacos, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fenícois e macrolídeos (BLAIR et al., 2015).

Dentre essas enzimas, as β -lactamases compreendem um grupo de enzimas que possuem a capacidade de inibir a ação do antimicrobiano por meio da ruptura do anel β -lactâmico (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

Outra forma de inativação mediada por enzimas está relacionada ao impedimento estérico, formado na molécula do antimicrobiano, processo esse desencadeado devido à adição de grupos químicos, como acetil, fosforil ou adenilil (BLAIR et al., 2015; REYGAERT, 2018).

3.6.4 Sistemas de efluxo

As bombas de efluxo estão presentes na membrana citoplasmática das células bacterianas e apresentam a capacidade de transportar nutrientes e eliminar substâncias tóxicas para a célula, constituindo assim um mecanismo de resistência contra antimicrobianos (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020; PULINGAM et al., 2022).

Os genes responsáveis pela aquisição de bombas de efluxo podem ser tanto intrínsecos aos microrganismos quanto adquiridos (ISKANDAR et al., 2022). Para BGN, as bombas de efluxo se apresentam como um importante mecanismo de resistência intrínseca (UDDIN et al., 2021).

A classificação das bombas de efluxo é baseada em diversos fatores, como sua composição, substrato utilizado, fonte de energia utilizada e número de regiões

transmembrana (ISKANDAR et al., 2022). Podendo ser classificadas em cinco principais famílias: superfamília cassete de ligação ATP (ABC), família de extrusão de multidrogas e compostos tóxicos (MATE), família resistência-nodulação-divisão (RND), família de baixa resistência a multidrogas (SMR) e família dos facilitadores principais (MFS) (NADEEM et al., 2020).

4 JUSTIFICATIVA

A busca por metodologias rápidas, precisas e de baixo custo na identificação bacteriana tem se intensificado nos últimos tempos. Nesse sentido, a EM do tipo MALDI-TOF atua como uma ferramenta que vem se destacando, devido ao seu bom desempenho. Entretanto, a carência de banco de dados robustos e que contemplem a grande diversidade bacteriana prejudica a identificação adequada e precisa dessa técnica, o que justifica a necessidade do desenvolvimento de mais estudos nessa área.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por finalidade construir um banco de dados para a identificação de resistência bacteriana, na intenção de incrementar as informações fornecidas pelo Ribopeaks, um software que vem se mostrando como um importante instrumento de identificação taxonômica bacteriana.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Identificação dos microrganismos

Para a identificação dos microrganismos foi utilizado o aprendizado de máquina do software Ribopeaks, desenvolvido por Tomachewski *et al.* (2018).

Para a construção do classificador foram utilizados dados referentes às proteínas ribossomais (30S e 50S), obtidas a partir do repositório GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology), na data de 13/06/2016. A partir dos dados de massas moleculares (m/z) das proteínas ribossomais, o software foi capaz de classificar e identificar bactérias (TOMACHEWSKI *et al.*, 2018). A base de dados de m/z utilizada pelo Ribopeaks, é a PUCHUY, desenvolvida por Silva *et al.* (2019), a partir de genomas bacterianos completamente sequenciados. Essa base de dados possibilita verificar se a ausência de dada proteína ribossomal no espectro de massa é resultado da falta do gene na bactéria. Esse tipo de informação aumentou a assertividade do Ribopeaks na classificação taxonômica.

Para as análises, o software também contou com o auxílio de uma calculadora de peptídeos, que tinha por função converter em pesos moleculares as sequências de aminoácidos contidas em cada proteína, gerando assim o peso molecular total da proteína (TOMACHEWSKI, 2017).

5.2 Aquisição dos dados de resistência

Para a construção do banco de dados, foram selecionados dados referentes as resistências antimicrobianas presentes na ferramenta AMRFinderPlus, um software proposto pelo NCBI (National Center for Biotechnology) capaz de identificar genes de resistência antimicrobiana utilizando anotações de proteínas ou as sequências de nucleotídeos, na data de 20/07/2021.

O software faz parte da plataforma NDARO (National Database of Antibiotic Resistant Organisms), um compilado de dados que pertence ao repositório do NCBI. A plataforma NDARO surgiu a partir de um plano nacional americano proposto em 2015, em parceria com as principais agências regulatórias do mundo, o qual visa combater a resistência antimicrobiana bem como fornecer dados rápidos e acessíveis a diversos pesquisadores do mundo.

Os arquivos foram obtidos através do formato fasta, contendo a sequências de aminoácidos, sendo que cada aminoácido apresenta uma letra correspondente: G (Glicina ou Glicocola), A (Alanina), L (Leucina), V (Valina), I (Isoleucina), P (Prolina), F (Fenilalanina), S (Serina), T (Treonina), C (Cisteína), Y (Tirosina), N (Asparagina), Q (Glutamina), D (Aspartato ou Ácido aspártico), E (Glutamato ou Ácido glutâmico), R (Arginina), K (Lisina), H (Histidina), W (Triptofano), M (Metionina). Os arquivos também foram selecionados quanto ao tamanho da proteína em kDa, visto que os dados utilizados pela EM correspondem a uma faixa entre 2 a 20 kDa.

Juntamente com a obtenção das sequências de aminoácidos dos genes patogênicos de cada bactéria, também foi realizada a coleta de dados referentes à resistência antimicrobiana, como a classe e subclasse dos antimicrobianos de resistência, além da obtenção da taxonomia segundo domínio, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie.

5.3 Inserção dos dados da plataforma NDARO no sistema Ribopeaks

A Plataforma NDARO, que contém informações sobre os genes patogênicos bacterianos foi associado ao banco de m/z do Ribopeaks, referente às bactérias que possuem genoma completamente sequenciados. Assim, o Ribopeaks ao classificar taxonomicamente as bactérias baseadas no seu perfil de m/z de proteínas ribossomais, automaticamente traz as informações referentes à classe e subclasse das resistências aos antimicrobianos que a estirpe carrega em seu genoma.

5.4 Análise estatística

Para a análise estatística, os dados de massa/carga (m/z) dos genes patogênicos foram ordenados por Análise de Componentes Principais (PCA) (do inglês Principal Component Analysis), na matriz de correlação no programa R (R Core Team 2017), usando o pacote Vegan (OKSANEN et al., 2007).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos com a construção da base de genes de resistência visam ampliar as informações fornecidas pelo software Ribopeaks. A base de dados obtida a partir de dados coletados no NCBI conta com 2.576 microrganismos diferentes, 986 espécies e 329 gêneros.

Originalmente, o Ribopeaks apresentava a interface mostrada na Figura 5 e apresentava as informações de 1 a 14. A partir do desenvolvimento do presente trabalho foram inseridas as informações de 15 a 19. A identificação da bactéria utilizando o Ribopeaks é feita da seguinte forma: Após a inserção dos dados de massas moleculares no software (1), a ferramenta irá analisar os dados a partir do banco de dados que contempla informações referentes às proteínas ribossomais 30S e 50S e do banco de dados referente aos genomas completos. O usuário também pode ajustar o erro de tolerância de massa em Daltons (Da), que será permitido entre o pico do banco de dados do Ribopeaks e aquele apresentado pela amostra analisada (2). Como recomendação, o software preconiza o valor de 3 Da, já que testes anteriores revelaram que esse valor possui a capacidade de evitar correspondências falso-positivas e também de descartar picos positivos. Ao clicar no botão 'Analyse Peaks' (3), o software iniciará o comando de busca dos dados no banco. Nesse momento, também é possível observar a quantidade de picos inseridos pelo usuário para análise. Logo após o tempo estimado de análise, os resultados podem ser visualizados. Dentre os resultados gerados, encontramos a quantidade de picos inseridos para análise (4), o Score (5) que indica a confiança da classificação taxonômica, a Paridade Parcial (6) que corresponde à proximidade entre os picos encontrados na base de dados com aqueles analisados, além da Paridade Total (7) que representa a cobertura do resultado quando comparado com o total de informações presentes na base dados do Ribopeaks. O software também fornece a taxonomia da bactéria classificada (8), o número de picos encontrados na base e que correspondem à bactéria classificada (9), o gráfico de espectro virtual da bactéria identificada (10), a proteína ribossomal presente no banco do software e que foi utilizada para a identificação (11) sendo as letras L e S correspondentes a subunidade maior (do inglês Large) e menor (do inglês Small) respectivamente. Abaixo de cada proteína ribossomal a ferramenta também indica o valor do peso molecular do pico (12) que foi utilizado pelo usuário para a identificação, além do valor de massa da

proteína ribossomal (13) presente no banco de dados do Ribopeaks e por fim, dentro da classificação taxonômica, o software revela a Densidade da Probabilidade (14), valor esse que revela a contribuição de cada pico para a pontuação final.

A partir do desenvolvimento do presente trabalho, além da identificação, o Ribopeaks agora apresenta dados referentes aos genes de resistência presentes no genoma do microrganismo identificado. Abaixo de cada identificação taxonômica, o usuário terá acesso à quantidade de genes de resistência (15) apresentados pelo microrganismo identificado. Ao clicar no ícone 15, o usuário terá acesso aos diferentes genes, podendo visualizar a nomenclatura do gene (16), seu código de identificação no NCBI (17), além da classe do antimicrobiano (18) e subclasse (18) de resistência.

Figura 5 - Representação da interface atualizada do software Ribopeaks

The screenshot shows the Ribopeaks web interface. At the top, there is a logo and a welcome message. Below that, a search bar contains a long string of m/z values. A 'Da' field is set to 3, and an 'Analyse Peaks' button is visible. The main content area displays a table of peak data for *Streptomyces lividans tk24*. The table has columns for Description, Score, Partial Parity, and Total Parity. Below the table, there is a section for antibiotic resistances, listing 11 resistances to antibiotics.

Description - 15 peaks submitted	Score	Partial Parity	Total Parity								
Streptomyces lividans tk24 (ncbi code: GCF_000739105.1) - 15 sp. -	1.030e-243	100%	25%								
L1 (25632.41) (0.665)	L2 (30419.71) (0.665)	L3 (22653.22) (0.665)	L4 (23511.63) (0.665)	L5 (20721.83) (0.665)	L6 (19048.068) (0.665)	L10 (18515.10) (0.665)	L11 (15307.8409) (0.665)	L7L12 (13077.97) (0.665)	L13 (16447.9582) (0.665)	L14 (13369.6051) (0.665)	L15 (15816.3458) (0.665)
L18 (13447.39) (0.665)	L22 (12795.64) (0.665)	L23 (14847.0343) (0.665)									

This bacterium contains 11 resistances to antibiotics

Gene: MULTISPECIES: DNA-binding response regulator partial [Streptomyces]	Gene: MULTISPECIES: chloramphenicol efflux MFS transporter CmiR [Streptomyces]
NCBI gene ID: WP_011029105.1	NCBI gene ID: WP_003971483.1
Antibiotic Class: GLYCOPEPTIDE	Antibiotic Class: PHENICOL
Antibiotic Subclass: VANCOMYCIN	Antibiotic Subclass: CHLORAMPHENICOL

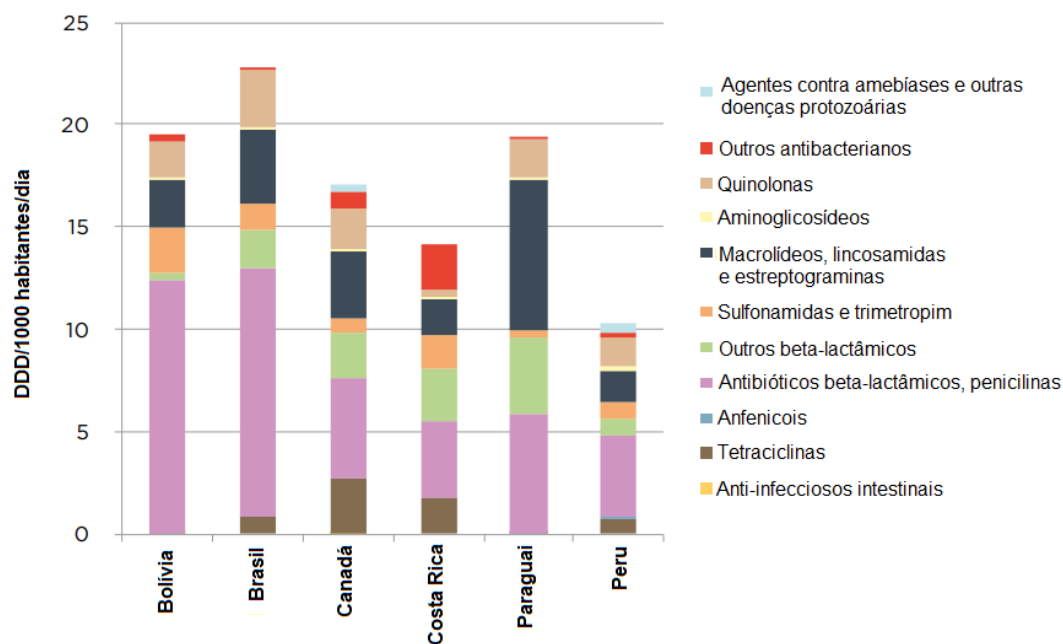
Adaptado de: TOMACHEWSKI, D.; GALVÃO, C. W.; DE CAMPOS JÚNIOR, A.; GUIMARÃES, A. M.; DA ROCHA, J. C. F.; ETTO, R. M. Ribopeaks: a web tool for bacterial classification through m/z data from ribosomal proteins. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. 3058-3060, 2018. Disponível em: <http://www.ribopeaks.com>. Acesso em: 3 abr. 2022.

Legenda: Representação da interface atualizada do software Ribopeaks. O software conta com os parâmetros de 1 a 14, sendo referentes aqueles destinados a classificação bacteriana. Já os parâmetros de 15 a 19 são utilizados para verificar a presença de resistência aos antimicrobianos.

A análise dos dados foi realizada através de uma PCA (Análise de Componentes Principais, do inglês Principal Component Analysis), com a finalidade de se avaliar a inter-relação entre as bactérias que apresentam genes de resistência e as principais classes de antimicrobianos a que esses genes apresentam resistência, o que pode ser verificado na Figura 6.

Em um estudo realizado por Marin *et al.* (2022), foi possível verificar que nos países latino americanos como Argentina, Chile, Colômbia, Costa Rica e Peru a penicilina e seus derivados são os compostos antimicrobianos de maior consumo, sendo o Paraguai uma exceção, uma vez que o grupo de antimicrobianos mais utilizado pertence a classe dos macrolídeos e lincosamidas, o que vai de encontro aos dados apresentados pela OMS (Figura 7).

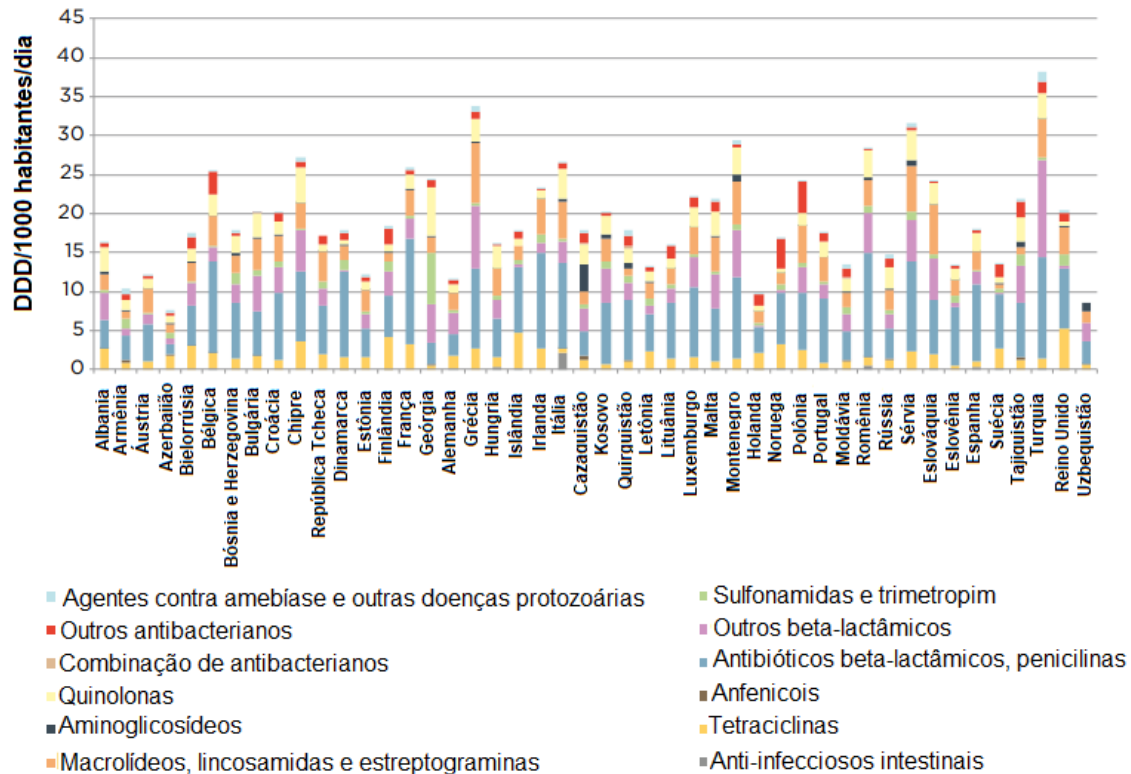
Figura 7 - Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) no continente Americano (2015)



Adaptado de: WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption, 2018. Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) no continente Americano (2015). Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-surveillance-of-antibiotic-consumption>. Acesso em: 25 abr. 2022.

Já, quando se avalia o continente Europeu, um estudo desenvolvido por Bruyndonckx *et al.* (2021), verificou que a classe dos antimicrobianos β -lactâmicos representou a classe de maior consumo entre o período de 1997 e 2017, sendo a penicilina o antimicrobiano mais utilizado no ano de 2017, representando 42,30%, seguido por outros β -lactâmicos, que corresponderam a 11,62%. Dados esses que corroboram com aqueles apresentados pela Organização Mundial da Saúde em 2015 (Figura 8).

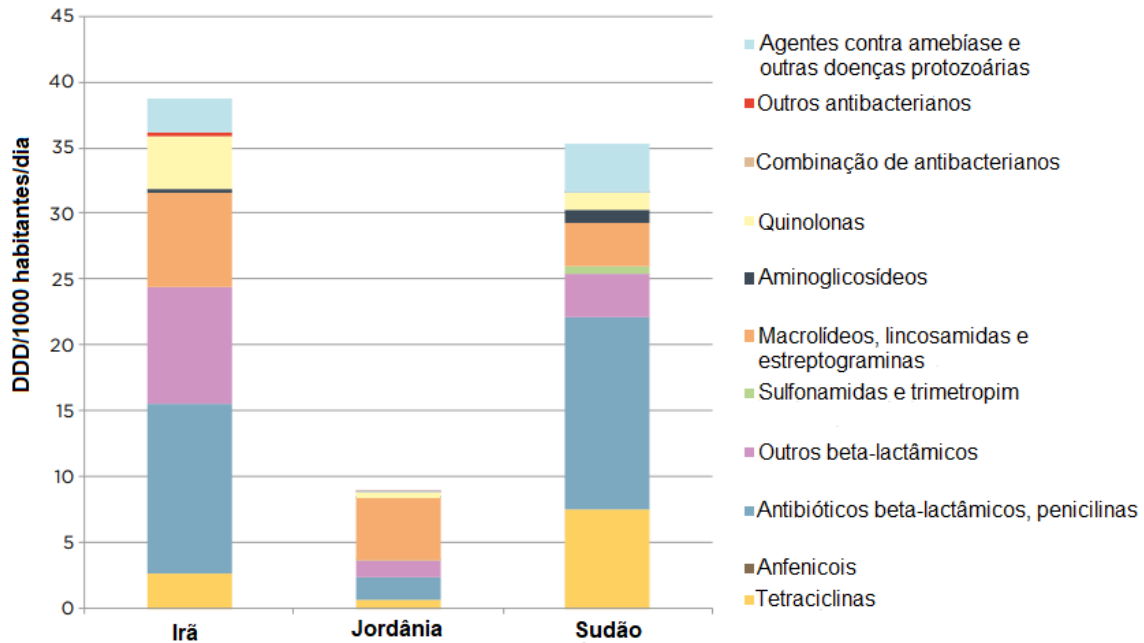
Figura 8 - Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) no continente Europeu (2015)



Adaptado de: WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption, 2018. Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) no continente Europeu (2015). Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-surveillance-of-antibiotic-consumption>. Acesso em: 25 abr. 2022.

Devido à escassez de dados referentes ao consumo de antibióticos, principalmente naqueles países que apresentam uma renda mais baixa, um trabalho desenvolvido por Browne *et al.* (2021), utilizou um estudo de modelagem espacial para estimar o consumo de antibióticos entre o período de 2000 e 2018 em 204 países. Os dados obtidos permitiram inferir que dentre os antimicrobianos de amplo espectro, a amoxicilina e a ampicilina são os representantes mais utilizados, ambos pertencentes a classe dos β -lactâmicos. Além disso, o estudo também verificou que o maior consumo de antimicrobianos está no continente Europeu e na Ásia Central e que embora o Sudão represente um país que apresenta um alto consumo de antimicrobianos (Figura 9), as menores taxas são encontradas no continente Africano (BROWNE *et al.*, 2021).

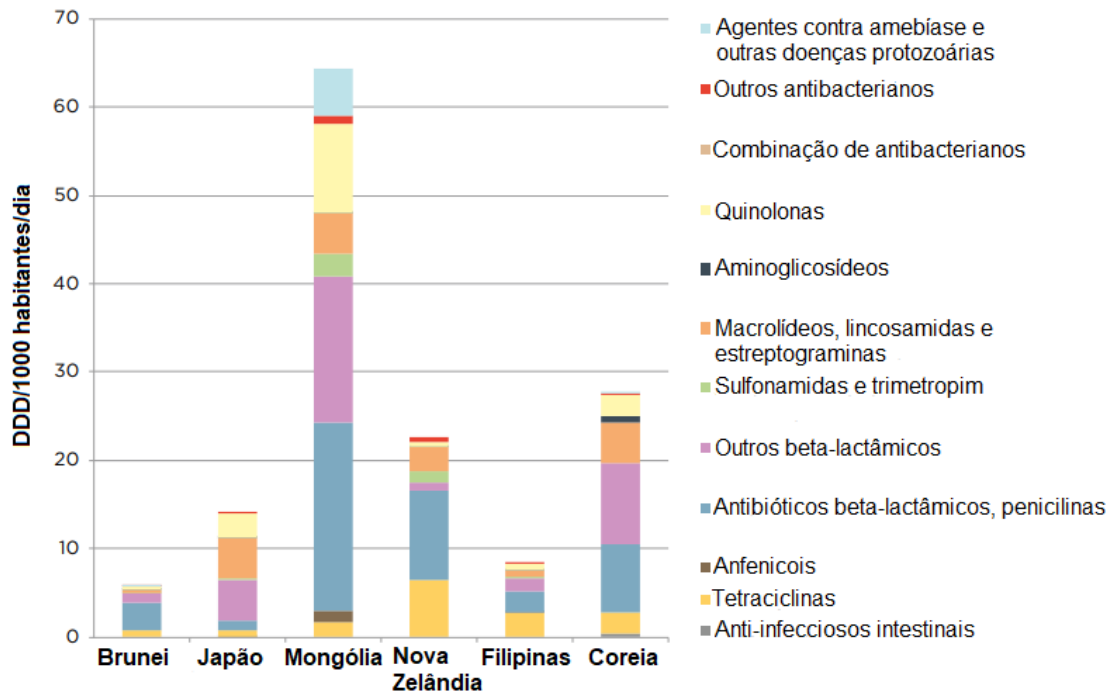
Figura 9 - Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) em países da região do Mediterrâneo (2015)



Adaptado de: WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption, 2018. Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) em países da região do Mediterrâneo (2015). Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-surveillance-of-antibiotic-consumption>. Acesso em: 25 abr. 2022.

Grandes contrastes no consumo de antimicrobianos também podem ser verificados quando se comparam alguns países vizinhos, como por exemplo a Mongólia, que apresentam um alto consumo, superando as taxas apresentadas pela China que foram de 10% do consumo global de antimicrobianos. Já em contrapartida, Filipinas apresentou taxas relativamente mais baixas que seus vizinhos como Vietnã, Tailândia e Malásia (BROWNE et al., 2021).

Figura 10 - Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) em países da região do Pacífico Ocidental (2015)



Adaptado de: WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption, 2018. Consumo de antimicrobianos (DDD por habitantes por dia) em países da região do Pacífico Ocidental (2015). Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-report-on-surveillance-of-antibiotic-consumption>. Acesso em: 25 abr. 2022.

Devido ao uso extensivo de antimicrobianos β -lactâmicos há mais de 70 anos, é possível verificar um aumento expressivo na quantidade de enzimas β -lactamases, as quais são responsáveis pela degradação do fármaco e constituem o principal mecanismo de resistência a essa classe (BUSH; BRADFORD, 2020). Além das enzimas β -lactamases, mais três mecanismos são responsáveis por conferir resistência contra os β -lactâmicos: a modificação de canais de porinas que dificultam a entrada do fármaco, produção de PBPs e proteínas responsáveis pelo efluxo (FISHER; MEROUEH; MOBASHERY, 2005).

Também é possível verificar na Tabela 1, que a resistência aos β -lactâmicos engloba em sua maioria BGN. Nas BGN, as enzimas β -lactamases são responsáveis pelo principal mecanismos de resistência encontrados nesses microrganismos (BUSH, 2018; KAPIL, S.; KUMAR, T.; SHARMA, V, 2020).

Tabela 1 - Relação da análise de resistências bacterianas em relação à classe dos β -lactâmicos com correlação de 1% de significância

Bactéria	r ²		PC1	PC2	Gram
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.9634	***	-0.99873	0.05038	BGN
<i>Acinetobacter pittii</i>	0.9847	**	-0.99998	0.00656	BGN
<i>Acinetobacter sp. ACNIH2</i>	0.5911	**	-0.97237	0.23344	BGN
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	0.5118	**	-0.99475	0.10236	BGP
<i>Bacillus thuringiensis</i>	0.5118	**	-0.99475	0.10236	BGP
<i>Burkholderia oklahomensis</i>	0.5911	**	-0.97237	0.23344	BGN
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	0.8589	**	-0.99472	0.10261	BGN
<i>Citrobacter freundii</i>	0.9043	***	-0.99441	0.10563	BGN
<i>Elizabethkingia anophelis</i>	0.9980	**	-0.99979	-0.02070	BGN
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.9052	**	-0.99886	0.04765	BGN
<i>Klebsiella michiganensis</i>	0.5911	**	-0.97237	0.23344	BGN
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.9610	**	-0.99886	-0.04769	BGN
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	0.7213	***	-0.99635	0.08531	BGN
<i>Legionella pneumophila subsp. pneumophila</i>	0.5911	**	-0.97237	0.23344	BGN
<i>Morganella morganii</i>	0.8032	**	-0.99826	-0.05902	BGN
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0.4351	**	-0.93551	0.35330	BGP
<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>	0.9427	***	-0.87119	0.49094	BGP
<i>Myroides odoratimimus</i>	0.9476	**	-0.91866	0.39505	BGN
<i>Proteus mirabilis</i>	0.9427	***	-0.87119	0.49094	BGN
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.9577	**	-0.99885	0.04794	BGN
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.8160	**	-0.96890	0.24745	BGP
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.9823	**	-0.99336	0.11502	BGN

Fonte: A autora.

Legenda: A tabela ilustra a análise de resistências bacterianas em relação à classe dos antimicrobianos β -lactâmicos, considerando um $p < 0,01$. Onde r^2 corresponde à força de correlação existente entre a bactéria em relação à classe do antimicrobiano, onde, quanto mais próximo ao valor de 1, maior será a força de correlação do microrganismo em questão. BGN e BGP correspondem a Bactéria Gram-Negativa e Bactéria Gram-Positiva, respectivamente. Os símbolos utilizados estão relacionados aos valores de significância, sendo: '****' significância entre 0 e 0,001 e '***' significância entre 0,001 e 0,01.

Além da resistência apresentada contra a classe dos antimicrobianos β -lactâmicos, também foi possível verificar na análise de PCA (Figura 6), que algumas bactérias apresentaram uma correlação maior com as classes de antimicrobianos que inibem a síntese proteica, como as tetraciclínas (A08), aminoglicosídeos (A03), macrolídeos (A06) e lincosamidas (A018). Dentre esses microrganismos que apresentaram uma correlação com antimicrobianos inibidores da síntese proteica, todos se enquadram como BGP (Tabela 2).

Tabela 2 - Relação da análise de resistências bacterianas em relação aos antimicrobianos inibidores de síntese proteica com correlação de 1% de significância

Bactéria	r ²		PC1	PC2	Gram
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	0.3770	**	0.02765	0.99962	BGP
<i>Clostridioides difficile</i>	0.7267	**	-0.38762	0.92182	BGP
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.8243	***	-0.40646	0.91367	BGP
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	0.5917	**	0.01647	0.99986	BGP
<i>Streptococcus suis</i>	0.6908	**	0.02748	0.99962	BGP
<i>Trueperella pyogenes</i>	0.8208	**	0.01595	0.99987	BGP

Fonte: A autora.

Legenda: A tabela ilustra a análise de resistências bacterianas em relação à classe dos antimicrobianos inibidores de síntese proteica, considerando um $p < 0,01$. Onde r^2 corresponde à força de correlação existente entre a bactéria em relação a classe do antimicrobiano, onde, quanto mais próximo ao valor de 1, maior será a força de correlação do microrganismo em questão. BGP corresponde a Bactéria Gram-Positiva. Os símbolos utilizados estão relacionados aos valores de significância, sendo: '****' significância entre 0 e 0,001 e '***' significância entre 0,001 e 0,01.

Estima-se que dentre os microrganismos patogênicos, 70% apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano (ECONOMOU; GOUSIA, 2015; UDDIN et al., 2021). Quando avaliada a base de dados PUKYU foi possível verificar que 30% dos microrganismos apresentam pelo menos um gene de resistência.

A EM do tipo MALDI-TOF é uma ferramenta promissora para a identificação bacteriana e com grande potencial para a identificação de bactérias que são consideradas patógenos raros de infecções em humanos (SENG et al., 2013). Entretanto, a identificação dessas bactérias depende de bases de dados robustas e que contemplem uma ampla gama de microrganismos (NOMURA, 2015; HEATON; PATEL, 2018).

Dentre os principais sistemas comercializados atualmente para a identificação de microrganismos através da EM, encontramos o Bruker Biotyper e Vitek MS, ambos atuam de forma eficaz na identificação de microrganismos comumente encontrados em rotinas de laboratório (RYCHERT, 2019). Entretanto, esses sistemas podem apresentar dificuldade em realizar a identificação correta ao se deparar com patógenos considerados incomuns em casos de infecções em humanos (PARK; KIM; PARK, 2022).

Como por exemplo, o caso relatado no trabalho de Park *et al.* (2022), sobre o primeiro caso de infecção por *Azorhizobium caulinodans* em um paciente imunocomprometido. *A. caulinodans* é uma bactéria do solo que em associação com as plantas é capaz de atuar na promoção do crescimento vegetal, auxiliando no

suprimento de nitrogênio, não havendo até então relatos anteriores de infecção em humanos (LING et al., 2016; PARK; KIM; PARK, 2022).

Para a identificação de *A. caulinodans* o trabalho verificou que ao contrário do Ribopeaks, o sistema comercial Bruker Biotyper não apresentou êxito na identificação. Nesse contexto, o Ribopeaks mostrou-se como um importante instrumento de identificação bacteriana, uma vez que sua base de dados abrangente foi capaz de identificar de forma assertiva *A. caulinodans* corroborando com o resultado apresentado pela técnica molecular 16S rRNA (PARK; KIM; PARK, 2022).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostraram que aprimoramento do software Ribopeaks com as informações contidas na base NDARO, forneceu dados importantes além da identificação taxonômica, uma vez que o usuário possui acesso a informações referentes às possíveis resistências aos diferentes antimicrobianos. Informações essas que podem direcionar com antecedência a escolha de um tratamento mais adequado, optando por classes e subclasses de antimicrobianos que não estejam contempladas nas resistências. Entretanto, não se exclui a necessidade de testes complementares, como por exemplo antibiogramas.

Os dados obtidos com a análise de PCA também sugerem que a maior correlação existente entre os genes de resistência e as classes de antimicrobianos está presente na classe dos fármacos β -lactâmicos, seguida por aqueles medicamentos que atuam na síntese proteica, como as tetraciclínas, aminoglicosídeos, macrolídeos e as lincosamidas.

REFERÊNCIAS

- ABUSHAHEEN, M. A.; MUZAHEED,; FATANI, A. J.; ALOSAIMI, M.; MANSY, W.; GEORGE, M.; ACHARYA, S.; RATHOD, S.; DIVAKAR, D. D.; JHUGROO, C.; VELLAPPALLY, S.; KHAN, A. A.; SHAIK, J.; JHUGROO, P. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, 2020.
- ALIZADEH, M.; YOUSEFI, L.; PAKDEL, F.; GHOTASLOU, R.; REZAEI, M. A.; KHODADADI, E.; OSKOUEI, M. A.; BARHAGHI, M. H. S.; KAFIL, H. S. MALDI-TOF mass spectroscopy applications in clinical microbiology. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2021, 2021.
- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, n. 134, 2010.
- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 20-29, 2017.
- ANGELETTI, S.; CICCIZZIB, M. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: An updating review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 76, p. 104063, 2019.
- ASHFAQ, M. Y.; DA'NA, D. A.; AL-GHOUTI, M. A. Application of MALDI-TOF for identification of environmental bacteria: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 305, p. 114359, 2022.
- ASLAM, B.; KHURSHID, M.; ARSHAD, M. I.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M.; YASMEEN, N.; SHAH, T.; CHAUDHRY, T. H.; RASOOL, M. H.; SHAHID, A.; XUESHAN, X.; BALOCH, Z. Antibiotic resistance: one health one world outlook. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.
- AYHAN, K.; COSANSU, S.; ORHAN-YANIKAN, E.; GÜLSEREN, G. Advance methods for the qualitative and quantitative determination of microorganisms. **Microchemical Journal**, v. 166, 2021.
- BASU, S.; BANIK, B.K. Beta-lactams as clinically active medicines. In: BANIK, B.K. **Beta-Lactams**. 1. ed. Springer Cham Cap. 9, p. 285-309, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-55621-5>. Acesso em: 8 mar. 2021.
- BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in bacterial world? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.
- BENKOVA, M.; SOUKUP, O.; MAREK, J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. **Journal of Applied Microbiology**, n. 129, v. 4, p. 806-822, 2020.
- BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.

- BOCKSTAEL, K.; AERSCHOT, A. V. Antimicrobial resistance in bacteria. **Central European Journal of Medicine**, v. 4, n. 2, p. 141-155, 2009.
- BROWNE, A. J.; CHIPETA, M. G.; HAINES-WOODHOUSE, G.; KUMARAN, E. P. A.; HAMADANI, B. H. K.; ZARAA, S.; HENRY, N. J.; DESHPANDE, A.; JR REINER, R. C.; DAY, N. P. J.; LOPEZ, A. D.; DUNACHIE, S.; MOORE, C. E.; STERGACHIS, A.; HAY, S. I.; DOLECEK, C. Global antibiotic consumptions and usage in humans, 2000-18: a spatial modelling study. **Lancet Planet Health**, v. 5, n. 12, p. e893-e904, 2021.
- BRUYNDONCKX, R.; ADRIAENSSENS, N.; VERSPORTEN, A.; HENS, N.; MONNET, D. L.; MOLENBERGHS, G.; GOOSSENS, H.; WEIST, K.; COENEN, S. Consumption of antibiotics in the community, European Union/European Economic Area, 1997-2017. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 2, p. ii7-ii13, 2021.
- BRUYNE, S. D.; SPEECKAERT, M. M.; BIESEN, W. V.; DELANGHE, J. R. Recent evolutions of machine learning applications in clinical laboratory medicine. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 58, n. 2, p. 131-152, 2020.
- BURNS, J. L. Mechanisms of bacterial resistance. **Pediatric Clinics of North America**, v. 42, n. 3, p. 497-507, 1995.
- BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -Lactamase-producing pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. e00047-19, 2020.
- BYARUGA, D. K. Mechanisms of antimicrobial resistance. In: SOSA, A.; BYARUGADA, D.; AMÁBILE-CUEVAS, C.; HSUEH, P.R.; KARIUKI, S.; OKEKE, I. **Antimicrobial resistance in developing countries**. New York: Springer, 2010. Cap. 2, p. 15-26. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-89370-9>. Acesso em: 11 nov. 2021.
- CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 1, p. 44-52, 2009.
- CHEN, X-F.; HOU, X.; XIAO, M.; ZHANG, L.; CHENG, L-W.; ZHOU, M-L.; HUANG, J-J.; ZHANG, J-J.; XU, Y-C.; HSUEH, P-R. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1536, 2021.
- CHONG, Y-K.; HO, C-C.; LEUNG, S-Y.; LAU, S.K.P.; WOO, P. C.Y. Clinical Mass Spectrometry in the Bioinformatics Era: A Hitchhiker's Guide. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 316–334, 2018.
- CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, Evolution, and persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 1, p. 26-40, 2020.
- COX, C. R.; HARRIS, R. M. Mass spectrometry and microbial diagnostics in the clinical laboratory. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 41, n. 2, p. 285-295, 2021.
- CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

CULEBRAS, Esther. Application of MALDI-TOF in bacterial strain typing and taxonomy. In: COBO, Fernando. **The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology**. 1. ed. Spain: Academic Press, 2018. Cap. 15. p. 213-232. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128144510/the-use-of-mass-spectrometry-technology-maldi-tof-in-clinical-microbiology>. Acesso em: 8 fev. 2022.

DAI, Y.; XU, X.; YAN, X.; LI, D.; CAO, W.; TANG, L.; HU, M.; JIANG, C. Evaluation of a rapid simplified protocol for direct identification of microorganisms from positive blood cultures by using matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. 632679, 2021.

DHANDA, G.; SARKAR, P.; SAMADDAR, S.; HALDAR, I. Battle Against vancomycin-resistant bacteria: recente developments in Chemical strategies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 3184-3205, 2019.

DODDS, D. R. Antibiotic resistance: a current epilogue. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 139-146, 2017.

DUNCAN, M.; DEMARCO, M.L. MALDI-MS: Emerging roles in pathology and laboratory medicine. **Clinical Mass Spectrometry**, v. 13, p. 1-4, 2019.

ERNST, C. M.; PESCHEL, A. MprF-mediated daptomycin resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 309, n. 5, p. 359-363, 2019.

FEUCHEROLLES, M.; CAUCHIE, H-M.; PENNY, C. MALDI-TOF mass spectrometry and specific biomarkers: potencial new key for swift identification of antimicrobial resistance in foodborne pathogens. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 593, 2019.

FISHER, J. F.; MEROUEH, S. O.; MOBASHERY, S. Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 395-424, 2005.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929.

FLENSBURG, J.; SKÖLD, O. Massive overproduction of dihydrofolate reductase in bacteria as a response. **European Journal of Biochemistry**, v. 162, n. 3, p. 473-476, 1987.

FLORIO, W.; TAVANTI, A.; BARNINI, S.; GHELARDI, E.; LUPETTI, A. Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1097, 2018.

FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 416-422, 2016.

FUNG, A. W. S.; SUGUMAR, V.; REN, A. H.; KULASINGAM, V. Emerging role of clinical mass spectrometry in pathology. **Journal of Clinical Pathology**, v. 73, n. 2, p. 61-69, 2020.

GE, M. C.; KUO, A.J.; LIU, K.L.; W, Y.H.; CHIA, J.H.; CHANG, P.Y.; L, M. H.; W, T.L.; CHANG, S. C.; LU, J.J. Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: success rate, economic analysis, and clinical outcome. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 5, p. 662-668, 2017.

GILAD-MORAN, J. How do advanced diagnostics support public health policy development?. **Euro Surveill**, v. 24, n. 4, p. 1900068, 2019.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 12 ed. McGraw-Hill Medical, 2011. Disponível em: https://books.google.com.br/books/about/Goodman_and_Gilman_s_The_Pharmacological.html?id=bVUfAQAAQBAJ&redir_esc=y. Acesso em: 23 fev. 2021.

GREEN, D. W. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2002.

GRIFFITHS, J. A Brief History of Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry Features**, v. 80, p. 5678-5683, 2008.

HAN, S-S.; JEONG, Y-S.; CHOI, S-K. Current scenario and challenges in the direct identification of microorganisms using MALDI TOF MS. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1947, 2021.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 29-35, 2003.

HEATON, P.; PATEL, R. Mass spectrometry applications in infectious disease and pathogens identification. In: RIFAI, N.; HORVATH, A. R.; WITTEWER, C. T.; HOOFNAGLE, A. **Principles and applications of clinical mass spectrometry – small molecules, peptides, and pathogens**. 1. ed. Elsevier, Cap. 4, p. 93-114, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128160633/principles-and-applications-of-clinical-mass-spectrometry>. Acesso em: 7 fev. 2022.

HRABÁK, J.; CHUDÁCKOVÁ, E.; WALKOVÁ, R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 103-114, 2013.

HUOVINEN, P. Trimethoprim resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 10, p. 1451-1456, 1987.

IDELEVICH, E. A.; BECKER, K. How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1347-1355, 2019.

IDELEVICH, E. A.; NIX, I. D.; BUSCH, J. A.; SPARBIER, K.; DREWS, O.; KOSTRZEWA, M.; BECKER, K. Rapid simultaneous testing of multiple antibiotics by the MALDI-TOF MS direct-on-target microdroplet growth assay. **Diagnostics**, v. 11, n. 10, p. 1803, 2021.

ISKANDAR, K.; MURUGAIYAN, J.; HALAT, D. H.; HAGE, S. E.; CHIBABHAI, V.; ADUKKADUKKAM, S.; ROQUES, C.; MOLINIER, L.; SALAMEH, P.; DONGEN, M. V.

Antibiotic Discovery and resistance: the chase and the race. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, 2022.

JAMES, R. C.; PIERCE, J. G.; OKANO, A.; XIE, J.; BOGER, D. L. Redesign of glycopeptide antibiotics: back to the future. **ACS chemical biology**, v. 7, n. 5, p. 797-804, 2012.

KAPIL, S.; KUMAR, T.; SHARMA, V. Mechanism and challenges associated with adaptation and Evolution of drug-resistant bacteria: an overview. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 1-18, 2020.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300-305, 2017.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 78, p. 53-68, 1987.

KAUR, P.; A.; CHANDRA, A.; TANWAR, T.; SAHU, S. K.; MITTAL, A. Emerging quinolone- and quinolone-based antibiotics in the light of epidemics. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 00, p. 1-21, 2022.

KOSTRZEWA, M.; NAGY, E.; SCHRÖTTNER, P.; PRANADA, A. B. How MALDI-TOF mass spectrometry can aid the diagnosis of hard-to-identify pathogenic bacteria – the rare and the unknown. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 8, p. 667-682, 2019.

LAURSEN, B. S.; SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K.; SPERLING-PETERSEN, H. U. Initiation of protein synthesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 101-123, 2005.

LEE, J.; RHO, K.; PARK, K.H.; KIM, J.S.; SHIN, S.; KIM, T.S. KIM, S. Utilizing negative markers for identifying mycobacteria species based on mass spectrometry with machine learning methods. **IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM)**, p. 1331-1337, 2019.

LEI, D.; CHEN, P.; CHEN, X.; ZONG, Y.; LI, X. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of microorganisms in clinical urine specimens after two pretreatments. **Polish Journal of Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 207-213, 2021.

LEO, E.; CHERKAOUI, A.; RENZI, G.; SCHRENZEL, J. Mini review: clinical routine microbiology in the era of automation and digital health. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 582028, 2020.

LESCH, J. E. **The first miracle drugs: How the sulfa drugs transformed medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

LIMA, L. M.; da SILVA, B. N. M.; BARBOSA, G.; BARREIRO, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, 2020.

LING, J.; WANG, H.; WU, P.; LI, T.; TANG, Y.; NASEER, N.; ZHENG, H.; MASSON-BOIVIN, C.; ZHONG, Z.; ZHU, J. Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. **PNAS**, v. 113, n. 48, p. 13875-13880, 2016.

LO, C. K-F.; MERTZ, D.; YAMAMURA, D.; LOEB, M. Assessing impact of MALDI mass spectroscopy on reducing directed antibiotic coverage time for Gram-negative organisms. **Plos One**, v. 15, n. 2, 2020.

MARIN, G. H.; GIANGRECO, L.; DORATI, C.; MORDUJOVICH, P.; BONI, S.; MANTILLA-PONTE, H.; ARVEZ, M. J. A.; PEÑA, M. L.; GONZÁLEZ, M. F. A.; FUNG, S. M. C.; BARCELONA, L.; CAMPAÑA, L.; ORELLANA, A. V.; RODRÍGUEZ, T. O.; CANTERO, L. G.; VILLAR, R. A.; FUENTES, N. S.; MELERO, E.; MARIN-PIVA, H.; SOLER, G.; GABRIEL, F.; VELANDIA, L. P.; FLORENTÍN, C. O.; PATRON, S. R.; RIVAS, M. O.; BENÍTEZ, C. M.; MELLADO, R.; IVANOVSKA, V.; MULLER, A.; ROJAS, R.; CASTRO, J. L. Antimicrobial consumption in Latin American countries: first steps of a long road ahead. **Journal of Primary Care & Community Health**, v. 13, p. 1-11, 2022.

MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 33-39, 2014.

MCEWEN, S. A.; COLLIGNON, P. J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Microbiology Spectrum**, n. 6, v. 2, 2018.

MOHANTY, H.; PACHPUTE, S.; YADAV, R. P. Mechanism of drug resistance in bacteria: efflux pump modulation for designing of new antibiotic enhancers. **Folia Microbiol**, v. 66, n. 5, p. 727-739, 2021.

MOHAPATRA, S. S.; DWIBEDY, S. K.; PADHY, I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: mode of action, resistance emergence, and potential solutions. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 3, p. 85, 2021.

MOHR, K. I. History of antibiotics research. In: STADLER, M.; DERSCH, P. **How to Overcome the Antibiotic Crisis**. 1. ed. Springer Cham, 2016. Cap. 10. p. 237-272. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-49284-1>. Acesso em: 18 mar. 2022.

MOSAEI, H.; ZENKIN, N. Inhibition of RNA polymerase by rifampicin and rifamycin-like molecules. **American Society for Microbiology**, v. 9, n. 1, 2020.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. In: KUDVA, I. T.; CORNICK, N. A.; PLUMMER, P. J.; ZHANG, Q.; NICHOLSON, T. L.; BANNANTINE, J. P.; BELLAIRE, B. H. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**. 5. ed. Washington: ASM Press Cap. 17, p. 481-511, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1128/9781555819286>. Acesso em: 25 nov. 2021.

NADEEM, S. F.; GOHAR, U. F.; TAHIR, S. F.; MUKHTAR, H.; PORNPUKDEEWATTANA, S.; NUKTHAMNA, P.; ALI, A. M. M.; BAVISETTY, S. C.

B.; MASSA, S. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 578-599, 2020.

NAKAMURA, S.; SATO, H.; TANAKA, R.; KUSUYA, Y.; TAKAHASHI, H.; YAGUCHI, T. Ribosomal subunit protein typing using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification and discrimination of *Aspergillus* species. **BioMed Central Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 100, 2017.

NOMURA, F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1854, n. 6, p. 528-537, 2015.

OKSANEN, J.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; O'HARA, R. (2007) Vegan: Community Ecology Package. Software disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Acesso em: 26 abr. 2022.

OLIVARES, J.; BERNARDINI, A.; GARCIA-LEON, G.; CORONA, F.; SANCHEZ, M. B.; MARTINEZ, J. L. The intrinsic resistance of bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 103, 2013.

OVIÑO, M.; BOU, G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 1, p. e00037-18, 2019.

OVIÑO, M.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 39, n. 4, p. 192-200, 2021.

PAGÈS, J-M.; JAMES, C. E.; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 893-903, 2008.

PARK, J. H.; KIM, T. S.; PARK, H. The first case of *Azorhizobium caulinodans* bacteremia in a patient with leukemia. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 42, n. 4, p. 494-496, 2022.

PHAM, T. D. M.; ZIORA, Z. M.; BLASKOVICH, M. A. Quinolone antibiotics. **Medchemcomm**, n. 10, v. 10, p. 1719-1739, 2019.

PSAROULAKI, A.; CHOCHLAKIS, D. Use of MALDI-TOF mass spectrometry in the battle Against bacterial infectious diseases: recent achievements and future perspectives. **Expert Review of Proteomics**, v. 15, n. 7, p. 537-539, 2018.

PULINGAM, T.; PARUMASIVAM, T.; GAZZALI, A. M.; SULAIMAN, A. M.; CHEE, J. Y.; LAKSHMANAN, M.; CHIN, C. F.; SUDESH, K. Antimicrobial resistance: prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 170, 2022.

R CORE TEAM (2017). R: The R Project for Statistical Computing. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 26 abr. 2022.

RAYMOND, B. Five rules for resistance in the antibiotic apocalypse, a road map for integrated microbial management. **Evolutionary applications**, v. 12, n. 6, p. 1079-1091, 2019.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482-501, 2018.

REYNOLDS, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 943-950, 1989.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B.; CERCENADO, E.; COSTE, A. T.; GREUB, G. Review on the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. **Euro Surveill**, v.24, n. 4 p. 1800193, 2019.

RYCHERT, J. Benefits and limitations of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of microorganisms. **Journal of Infectiology**, v. 2, n. 4, p. 1-5, 2019.

SAGAR, S.; KAISTHA, S.; DAS, A. J.; KUMAR, R. **Antibiotic resistant bacteria: a challenge to modern medicine**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2019.

SCHMEING, T. M.; RAMAKRISHNAN, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. **Nature**, v. 461, p. 1234-1242, 2009.

SCHUMANN, P.; MAIER, T. MALDI-TOF Mass Spectrometry Applied to Classification and Identification of Bacteria. In: GOODFELLOW, M.; SUTCLIFFE, I.; CHUN, J. **New Approaches to Prokaryotic Systematics**. 1. ed. Academic Press, 2014. Cap. 13. p. 275-306. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/new-approaches-to-prokaryotic-systematics/goodfellow/978-0-12-800176-9>. Acesso em: 27 mar. 2022.

SCOCCHERA, E.; WRIGHT, D. L. The antifolates. In: BERNSTEIN, P. R.; GARNER, A. L.; GEORG, G. I.; LAUFER, S. A.; LOWE, J. A.; MEANWELL, N. A.; SAXENA, A. K.; SUPURAN, C. T.; ZHANG, A.; TSCHAMMER, N.; POULSEN, S-A. **Topics in Medical Chemistry**. Springer, 2017. p. 123-149. Disponível em: <https://www.springer.com/series/7355>. Acesso em: 21 ago. 2021.

SENG, P.; ABAT, C.; ROLAIN, J. M.; COLSON, P.; LAGIER, J-C.; GOURIET, F.; FOURNIER, P. E.; DRANCOURT, M.; SCOLA, B. L.; RAOULT, D. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2182-2194, 2013.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 5, 2010.

SILVA, R. R.; TOMACHEWSKI, D.; GALVÃO, C. W.; KARAS, L. P.; ETTO, R. M. PUCHUY – BANCO DE DADOS DE MASSA MOLECULAR DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS BASEADO EM GENOMAS BACTERIANOS. 2019. Patente: Programa de Computador. Número do registro: BR512019002529-6, data de registro: 12/11/2019, título: “PUCHUY – BANCO DE DADOS DE MASSA MOLECULAR DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS BASEADO EM GENOMAS BACTERIANOS”, Intuição de registro: INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

SILVA, R. R. **Classificação bacteriana baseada em proteínas ribossomais oriundas de dados genômicos**. 2021. Dissertação (Mestrado em Computação Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2021.

SUN, J.; RUTHERFORD, S. T.; SILHAVY, T. J.; HUANG, K. C. Physical properties of the bacterial outer membrane. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, p. 236-248, 2022.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and Polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151-153, 1988.

TENOVER, F. C.; MCGOWAN, J. E. Antimicrobial resistance. In: HEGGENHOUGEN, H. K. **International Encyclopedia of Public Health**. 1 ed. Elsevier, 2008. p. 211-219, 2008. Disponível em: https://openlibrary.org/books/OL24447853M/International_encyclopedia_of_public_health. Acesso em: 29 jun. 2021.

TOMACHEWSKI, D. **Utilização de aprendizado de máquina para classificação de bactérias através de proteínas ribossomais**. 2017. Dissertação (Mestrado em Computação Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.

TOMACHEWSKI, D.; GALVÃO, C. W.; DE CAMPOS JÚNIOR, A.; GUIMARÃES, A. M.; DA ROCHA, J. C. F.; ETTO, R. M. Ribopeaks: a web tool for bacterial classification through m/z data from ribosomal proteins. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. 3058-3060, 2018.

TORRES-SANGIAO, E.; RODRIGUEZ, C. L.; GÁRCIA-RIESTRA, C. Application and perspectives of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1539, 2021.

TRAN, N. K.; HOWARD, T.; WALSH, R.; PEPPER, J.; LOEGERING, J.; PHINNEY, B.; SALEMI, M. R.; RASHIDI, H. H. Novel application of automated machine learning with MALDI-TOF-MS for rapid high-throughput screening of COVID-19: a proof of concept. **Scientific reports**, v. 11, n. 8219, 2021.

TSUCHIDA, Sachio. Application of MALDI-TOF for bacterial identification. In: COBO, Fernando. **The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology**. 1. ed. Spain: Academic Press, 2018. Cap. 7. p. 101-112. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128144510/the-use-of-mass-spectrometry-technology-maldi-tof-in-clinical-microbiology>. Acesso em: 1 nov. 2021.

TSUCHIDA, S.; UMEMURA, H.; NAKAYAMA, T. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4775, 2020.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Disponível em:

https://bibliotecadebiomedicina.blogspot.com/2019/01/livro-microbiologia-tortora-funke-case_10.html. Acesso em: 10 dez. 2021.

UDDIN, T. M.; CHAKRABORTY, A. J.; KHUSRO, A.; ZIDAN, BM. R. M.; MITRA, S.; EMRAN, T. B.; DHAMA, K.; RIPON, Md. K. H.; GAJDÁCS, M.; SAHIBZADA, M. U. K.; HOSSAIN, Md. J.; KOIRALA, N. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1750-1766, 2021.

VRIONI, G.; TSIAMIS, C.; OIKONOMIDIS, G.; THEODORIDOU, K.; KAPSIMALI, V.; TSAKRIS, A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. **Annals of Translational Medicine**, v. 6, n. 12, 2018.

WEIS, C.V.; JUTZELER, C.R.; BORGWARDT, K. Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, p. 1310-1317, 2020.

WEIS, C.; CUÉNOD, A.; RIECK, B.; DUBUIS, O.; GRAF, S.; LANG, C.; OBERLE, M.; BRACKMANN, M.; SOGAARD, K. K.; OSTHOFF, M.; BORGWARDT, K.; EGLI, A. Direct antimicrobial resistance prediction from clinical MALDI-TOF mass spectra using machine learning. **Nature medicine**, v. 28, p. 164-174, 2022.

WHO, World Health Organization. Who Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2016-2018 Early implementation. 2018. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277359/9789241514880-eng.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2022.

WHO, World Health Organization. Sepsis. 26 August 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>. Acesso em: 10 dez. 2021.

WIESER, A.; SCHNEIDER, L.; JUNG, J.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics – identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 965-974, 2012.

WILSON, D. N.; HARMS, J. M.; NIERHAUS, K. H.; SCHLÜNZEN, F.; FUCINI, P. Species-specific antibiotic-ribosome interactions: implications for drug development. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 12, p. 1239-1252, 2005.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 35-48, 2014.

WOLK, D. M.; CLARK, A. E. Matrix-assisted laser desorption time off light mass spectrometry. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 38, n. 3, p. 471-486, 2018.

YIN, J.; MENG, Q.; CHENG, D.; FU, J.; LUO, Q.; LIU, Y.; YU, Z. Mechanisms of bactericidal action and resistance of polymyxins for Gram-positive bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 9, p. 3771-3780, 2020.

YOON, E-J.; JEONG, S. H. MALDI-TOF mass spectrometry technology as a tool for the rapid diagnosis of antimicrobial resistance in bacteria. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 982, 2021.

ZAMAN, S. B.; HUSSAIN, M. A.; NYE, R.; MEHTA, V.; MAMUN, K. T.; HOSSAIN, N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. **Cureus**, v. 9, n. 6, e:1403, 2017.

ZHAO, Y.; SHADRICK, W. R.; WALLACE, M. J.; WU, Y.; GRIFFITH, E. C.; QI, J.; YUN, M-K.; WHITE, S. W.; LEE, R. E. Pterin-sulfa conjugates as dihydropteroate synthase inhibitors and antibacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 16, p. 3950-3954, 2016.

ZHOU, W.; SCOCCHERA, E. W.; WRIGHT, D. L.; ANDERSON, A. C. Antifolates as effective antimicrobial agents: new generations of trimethoprim analogs. **MedChemComm**, v. 4, p. 908-915, 2013.

ZHU, Y.; HUANG, W. E.; YANG, Q. Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 735-746, 2022.

ZIEGLER, D.; POTHIER, J. F.; ARDLEY, J.; FOSSOU, R. K.; PFLÜGER, V.; MEYER, S.; VOGEL, G.; TONOLLA, M.; HOWIESON, J.; REEVE, W.; PERRET, X. Ribosomal protein biomarkers provide root nodule bacterial identification by MALDI-TOF MS. **Applied genetics and molecular biotechnology**, v. 99, p. 5547-5562, 2015.