

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Ana Paula Alves do Nascimento

**POLUENTES EMERGENTES E SEUS POSSÍVEIS IMPACTOS NA  
DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM  
EFLUENTES DE INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**

Rio de Janeiro

2022

Ana Paula Alves do Nascimento

**POLUENTES EMERGENTES E SEUS POSSÍVEIS IMPACTOS NA  
DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM EFLUENTES  
DE INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Coorientador: Kayo Cesar Bianco Fernandes

Rio de Janeiro

2022

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Nascimento, Ana Paula Alves do

Poluentes emergentes e seus possíveis impactos na disseminação da resistência aos antimicrobianos em efluentes de indústria farmacêutica. / Ana Paula Alves do Nascimento. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

93 f.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Coorientador: Kayo Cesar Bianco Fernandes.

1. Efluentes Industriais. 2. Resistência Microbiana a Medicamentos. 3. Genômica. 4. Poluentes Químicos da Água.. I. Título.

Emerging pollutants and their possible impacts on the spread of antimicrobial resistance in pharmaceutical industry effluents

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Ana Paula Alves do Nascimento

**POLUENTES EMERGENTES E SEUS POSSÍVEIS IMPACTOS NA  
DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM EFLUENTES  
DE INDÚSTRIA FARMACÊUTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

---

Paulo Rubens Guimarães Barrocas (Doutor)  
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

---

Vânia Lúcia Carreira Merquior (Doutora)  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

**ORIENTADOR(ES)**

---

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutora) – Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

---

Kayo Cesar Bianco Fernandes (Doutor) – Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

Dedicado à minha família, em especial “*in memorium*” a minha Mãe, Severina, que sempre me incentivou e apoiou para que eu realizasse meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente dando a força que preciso para enfrentar os obstáculos encontrados no caminho;

Em especial, *in memorium*, à minha mãe que não está presente fisicamente, mas sei que sempre está ao meu lado;

Ao meu pai Juvenal e minha irmã por estarem sempre ao meu lado;

Ao meu amor maior, meu filho Miguel, para quem quero dar o melhor exemplo;

Ao meu marido Adriano, pelo apoio, paciência e compreensão;

À minha sogra Josefa, meu cunhado Rafael e minha concunhada Milena por todo apoio e incentivo;

À Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino pela plena orientação desde o meu estágio de nível médio até o futuro doutorado, pela amizade, pelo exemplo de dedicação, pelo estímulo a pesquisa, pela persistência e paciência com todos os alunos, e principalmente, por acreditar no meu trabalho, agradeço;

Ao Kayo Bianco, amigo e orientador, que sempre está disposto a ajudar, tirar dúvidas, orientar e ouvir nossos problemas, obrigada pela paciência e disponibilidade;

A Beatriz, Mariana, Andressa, Kaylanne, Rafaela e todos do setor Arqueas pela ajuda e pela descontração, fazendo meus dias mais agradáveis;

Ao Dr. Ivano de Filippis pelo auxílio na revisão deste trabalho;

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária e ao Departamento de Microbiologia que possibilitaram a realização deste estudo.

A CAPES e a FAPERJ pela concessão da bolsa de mestrado.

Por fim, obrigado a todos que contribuíram direta e indiretamente para conclusão deste trabalho.

O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.

Isaac Newton

## RESUMO

Apesar de ser reconhecida a importância de preservar dos recursos hídricos, inúmeras descargas de efluentes industriais, domésticos e hospitalares são depositadas nos ecossistemas aquáticos. Com isso, a deterioração da qualidade das águas naturais compromete a saúde desses ecossistemas e gera riscos à saúde humana. O acelerado crescimento industrial e agrícola e o lançamento de resíduos sem tratamento nos corpos hídricos vêm provocando o aumento dos níveis de metais pesados e fármacos nos ambientes aquáticos. Os antimicrobianos, utilizados por seres humanos e animais, são, em sua maioria, excretados para o meio ambiente, cerca de 90% dessas substâncias não são metabolizadas pelos organismos. Esses poluentes em contato com a microbiota, humana e aquática, geram uma pressão seletiva que promove a transferência horizontal de genes e a disseminação de organismos e genes de resistência. O objetivo desse estudo foi investigar a presença de contaminantes químicos e biológicos, e seus possíveis impactos, na disseminação e persistência do resistoma em efluentes de indústrias farmacêuticas submetidos ao tratamento. Para isso, foram selecionadas duas plantas de tratamento de efluente industrial. A detecção de antibióticos e metais pesados foi feita pelo sistema LC-MS/MS e ICP-OES, respectivamente. Não foram encontrados resíduos de antimicrobianos na ETEI de Farmanguinhos. Enquanto isso, foram detectados claritromicina, azitromicina e amoxicilina em todos os pontos da ETEI de Bio-manguinhos. Foram recuperados 70 isolados da ETEI de Farmanguinhos, sendo em maioria pertencentes ao gênero *Enterococcus* (n=23), seguido dos gêneros *Proteus* (n=8), *Staphylococcus* (n=7) e *Klebsiella* (n=5). Enquanto isso, na ETEI de Bio-manguinhos foram recuperados 43 isolados, sendo em maioria pertencentes ao gênero *Enterococcus* (n=13), seguido dos gêneros *Proteus* (n=11) e *Elizabethkingia* (n=8). Os isolados do gênero *Proteus* apresentaram perfil de resistência MDR (11%), XDR (84%), e PDR (5%), enquanto 86,2% dos *Enterococcus* sp. classificados como perfil MDR, dois como XDR e dois como non-MDR, sendo resistentes apenas à levofloxacina e nitrofurantoína. Os isolados de *Elizabethkingia* sp. foram classificados como XDR (75%) e PDR (25%). Através da ERIC-PCR, verificou-se uma alta variabilidade genética entre os *Proteus* sp., mostrando que, muito provavelmente, não há uma relação clonal entre eles. A análise MLST de oito isolados de Efm portadores do gene *vanA* revelou um novo alelo e cinco STs diferentes, três previamente descritos

(ST32, ST168 e ST253) e dois novos (ST1893 e ST1894). O novo alelo “*gyd*” também foi descrito em um novo ST. Vale destacar que todos os STs pertencem ao CC17, com exceção de dois. Outros STs não foram atribuídos a nenhum complexo clonal de acordo com o banco de dados. Todos os isolados identificados como da *E. anophelis* se agrupam em um único clado com alta similaridade com cepas de origem clínica (E6809 e 40313151). Esse clado deriva de um outro, onde, também, se encontram cepas de origem clínica (6499925, CNS\_3000516074), que por sua vez, tem como ancestral comum isolados ambientais (EA18, EA2, EA19 e EA21). Nossos resultados revelaram a presença de poluentes químicos e biológicos nos efluentes analisados, o que pode comprometer a qualidade dos corpos hídricos receptores dessas águas. Foi revelada a presença de microrganismos multidroga resistentes dos gêneros, *Proteus* sp. (MDR, XDR e PDR), *Enterococcus* sp. (MDR) e *Elizabethkingia* sp. (XDR e PDR) ao longo do tratamento. A análise de sequenciamento dos genomas provou ser uma ferramenta útil para estudar fatores de resistência, virulência e patogenicidade antimicrobianos, bem como a disseminação de linhagens com relevância clínica em ambientes aquáticos. Esses dados indicam a necessidade de futuros estudos sobre a disseminação de BRA por meio águas residuais para corpos hídricos receptores e possivelmente seu retorno ao ambiente clínico.

Palavras-chave: Efluentes, Resistência aos antimicrobianos, Esgoto industrial, Resistoma, Genômica.

## ABSTRACT

Despite being a recognized importance of preserving water resources, numerous discharges of industrial, environmental and hospital effluents. With this, human health of the quality of natural waters to these ecosystems and generates risks to human health. Industrial and agricultural growth and the development of treatment on bodies, bringing increased levels of heavy metals and drugs into industrial environments. Antimicrobials, used by humans and animals, are mostly excreted into the environment, about 90% of these substances are not metabolized by organisms. These pollutants in contact with the microbiota, human and aquatic, produce a selective pressure that promotes the horizontal transfer of genes and the dissemination of resistance organisms and genes. The objective is to investigate the use of chemical and biological contaminants and their possible impacts on the dissemination and persistence of resistome and target tributaries of use of specific pharmaceutical products for treatment. For this, two industrial effluent treatment plants were selected. Antibiotic and metal detection was performed by the LC-MS/MS and ICP-OES systems, respectively. No antimicrobial residues were found in the ETEI of Farmanguinhos. Meanwhile, amoxicillin, clarithromycin and azithromycin were detected at all points of Bio-manguinhos ETEI. Seventy isolates from Farmanguinhos ETEI were recovered, most of them belonging to the genus *Enterococcus* (n=23), followed by the *Proteus* sp. (n=8). Meanwhile, in the Bio-manguinhos ETEI, 43 isolates were recovered, most of them belonging to the genus *Enterococcus* (n=13), followed by the *Proteus* (n=11) and *Elizabethkingia* (n=8) genus. The isolates of *Proteus* sp. presented MDR (11%), XDR (84%), and PDR (5%) resistance profile, while 86.2% of *Enterococcus* sp. were classified as MDR, two as XDR and two as non-MDR, being resistant only to levofloxacin and nitrofurantoin. The isolates of *Elizabethkingia* sp. were classified as XDR (75%) and PDR (25%). ERIC-PCR, through a relationship between them. The MLST analysis of eight different *Efm* genes revealed five *vanA* alleles and three new STs, previously described (ST32, ST253) and two (ST1893 and ST1894). The new '*gyd*' gene allele was also described in a new ST. It is worth noting that all ST belong to CC17, except for two. Other STs were not assigned to any clonal complexes according to the database. All isolates identified as *E. anophelis* are grouped into a single clade with high similarity to clinical source strains (E6809 and 4313151). This clade derives from another clade, where strains of clinical origin are

also found (6499925, CNS\_3000516074), which in turn have common environmental ancestors (EA18, EA2, EA19 and EA21). Our waters showed the presence of chemical and chemical substances in the fluent results under analysis, which may represent a quality of the receiving bodies of our products. The presence of multidrug resistant microorganisms of the genera, *Proteus* sp. (MDR, XDR and PDR), *Enterococcus* sp. (MDR) and *Elizabethkingia* sp. (XDR and PDR) throughout the treatment. The sequencing analysis of the genomes developed to be a useful tool to study factors, virulence of antimicrobial resistance, as well as the spread of clinical sequencing in pathogenic strains. These indicate a need for future studies on the spread of ARB through wastewater to receiving water bodies and possibly its return to the clinical environment.

Keywords: Effluents, Antimicrobial resistance, Industrial sewage, Resistome, Genomics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pontos de coleta da ETE de Biomanguinhos/FIOCRUZ. ....	33
Figura 2. Pontos de coleta da ETE de Farmanguinhos/FIOCRUZ. ....	33
Figura 3. Teor de metais nas amostras de efluentes. ....	41
Figura 4. Gêneros bacterianos recuperados relacionados ao local de isolamento. ..	42
Figura 5. Perfil de resistência do gênero <i>Proteus</i> sp. ....	42
Figura 6. Perfil de multirresistência do gênero <i>Proteus</i> sp. ....	43
Figura 7. Diversidade dos isolados do gênero <i>Proteus</i> sp. ETEI Farmanguinhos.....	44
Figura 8. Resistencia aos antimicrobianos de <i>Enterococcus faecium</i> isolados ETEs. .....	45
Figura 9. Perfil de resistência do gênero <i>Elizabethkingia</i> sp. ....	48
Figura 10. Perfil de multirresistência do gênero <i>Elizabethkingia</i> sp. ....	49
Figura 11. Árvore filogenômica da análise do gene 16S rRNA .....	50
Figura 12: Árvore filogenômica da análise dos genomas disponíveis nos bancos de dados e dos isolados deste estudo. Azul: Sublinhagem 11; Vermelho: Linhagens descritas neste estudo e com similaridade de mais de 95% do genoma. ....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais mecanismos de ação e de resistência aos antimicrobianos. ....	25
Tabela 2. Antimicrobianos pesquisados nas amostras de efluentes industriais. ....	34
Tabela 3. Conjuntos de meios de cultura contendo antimicrobianos .....	36
Tabela 4. Perfil de resistência, virulência e patogenicidade de <i>Enterococcus faecium</i> carreando o gene <i>vanA</i> . ....	47
Tabela 5. Perfil do MLST dos Efm carreando o gene <i>vanA</i> . ....	48
Tabela 6. A concentração inibitória mínima e suscetibilidade aos antimicrobianos de <i>E. anophelis</i> neste estudo. ....	51
Tabela 7. Os genes de resistência previstos nos genomas de quatro isolados de <i>E. anophelis</i> neste estudo. ....	52

## LISTA DE SIGLAS

Ag	Prata
Al	Alumínio
As	Arsênio
Ba	Bário
BHI	<i>Brain Heart infusion</i>
BRA	Bactérias Resistentes a Antimicrobianos
CC	Complexo Clonal
Cd	Cádmio
CNS	Conselho Nacional de Saúde
Co	Cobalto
COFAB	Coordenação de Vigilância e Controle dos Fatores de Risco Biológicos
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CONB	Coordenação de Vigilância e Controle dos Fatores de Risco Não Biológicos
Cr	Cromo
CTV	Complexo Tecnológica de Vacinas
Cu	Cobre
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Efm	<i>Enterococcus faecium</i>
EGM	Elementos Genéticos Móveis
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- Polimerase Chain Reaction</i>
ESBL	Beta-Lactamase de espectro Estendido
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ETEI	Estação de Tratamento de Efluente Industrial
Fe	Ferro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GRA	Genes de Resistência a Antimicrobianos
Hg	Mercúrio
ICP-OES	Espectrometria de Emissão óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
IS	Sequência de Inserção

LC-MS/MS Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a espectrometria de Massas sequencial

LD	Limite de Detecção
Li	Lítio
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Ni	Níquel
non-MDR	<i>non Multidrug-Resistant</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PDR	<i>Pandrug-Resistant</i>
Pb	Chumbo
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNVS	Política Nacional de Vigilância Sanitária
RAFA	Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendentes
Se	Selênio
SUS	Sistema Único de Saúde
U	Urânio
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
<i>vanA-Efm</i>	<i>Enterococcus faecium</i> carreando o gene <i>vanA</i>
VSA	Vigilância em Saúde Ambiental
VE	Vigilância Epidemiológica
VISA	Vigilância Sanitária
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistente à Vancomicina
VS	Vigilância em Saúde
XDR	<i>Extensively Drug-Resistant</i>
Zn	Zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1	Vigilância em Saúde .....	17
1.2	Vigilância em Saúde Ambiental .....	18
1.3	Água residual .....	19
1.3.1	Efluente Industrial.....	20
1.4	Micropoluentes emergentes .....	22
1.4.1	Antimicrobianos e Resistência .....	24
1.5	Bactérias resistentes aos antimicrobianos e genes de resistencia aos antimicrobianos .....	27
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>31</b>
4.1	Local de estudo.....	31
4.2	Amostragem .....	32
4.3	Detecção de antimicrobianos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS)...	33
4.4	Determinação dos níveis de metais traço por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES).....	35
4.5	Isolamento e identificação .....	35
4.6	Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos .....	37
4.7	Detecção do gene <i>vanA</i> .....	37
4.8	Sequenciamento genoma Completo e análise bioinformática .....	38
4.9	Avaliação da relação clonal dos isolados .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
5.1	Detecção de antimicrobianos nas amostras .....	40
5.2	Detecção de metais traços nas amostras .....	40

<b>5.3</b>	<b>Isolamento, identificação E determinação dos perfis de susceptibilidade.....</b>	<b>41</b>
5.3.1	<i>Proteus</i> sp. ....	42
5.3.2	<i>Enterococcus</i> sp. ....	44
5.3.3	<i>Elizabethkingia</i> spp.....	48
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
6.1	<i>Proteus</i> sp. ....	56
6.2	<i>Enterococcus</i> sp. ....	57
6.3	<i>Elizabethkingia</i> sp.....	61
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Vigilância em Saúde

A Vigilância em Saúde (VS) tem por objetivo a observação e análise permanentes da situação de saúde da população, articulando ações destinadas a controlar determinantes riscos e danos à saúde de populações que vivem em determinados territórios sob a ótica da integralidade do cuidado, o que inclui tanto a abordagem individual quanto a coletiva dos problemas de saúde. Além disso, integra diversas áreas de conhecimento e aborda diferentes temas, tais como política e planejamento, territorialização, epidemiologia, processo saúde-doença, condições de vida e situação de saúde das populações, ambiente e saúde e processo de trabalho (BRASIL, 2010).

Atualmente as ações da VS incluem: análises da situação de saúde, promoção da saúde, vigilância epidemiológica, vigilância sanitária, vigilância da saúde do trabalhador e vigilância em saúde ambiental. A análise da situação de saúde propicia ações de monitoramento contínuo no país, por meio de estudos e análises que identifiquem e expliquem problemas de saúde e o comportamento dos principais indicadores de saúde, contribuindo para um planejamento mais abrangente na área (BRASIL, 2010; TEXEIRA et al.; 2018).

A promoção da saúde é uma política que tem como objetivo promover a qualidade de vida através de um conjunto de intervenções individuais, coletivas e ambientais responsáveis pela atuação sobre os determinantes sociais da saúde. A Vigilância Epidemiológica (VE) reconhece as principais doenças de notificação compulsória e investiga epidemias que ocorrem em territórios específicos. Além disso, age com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças e agravos (BRASIL, 2010; TEXEIRA et al.; 2018).

Enquanto isso, as ações de Vigilância Sanitária (VISA) dirigem-se, geralmente, ao controle de bens, produtos e serviços que oferecem riscos à saúde da população, como alimentos, produtos de limpeza, cosméticos e medicamentos. Realizam também a fiscalização de serviços de interesse da saúde, como escolas, hospitais, clubes, academias, parques e centros comerciais, e ainda inspecionam os processos produtivos que podem pôr em riscos e causar danos ao trabalhador e ao meio ambiente (BRASIL, 2010; TEXEIRA et al.; 2018).

A Vigilância em Saúde Ambiental (VSA) visa um conjunto de ações que propiciam o conhecimento e a detecção de mudanças nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou a outros agravos (BRASIL, 2010; BRASIL, 2018; TEXEIRA et al.; 2018).

Em 12 de junho de 2018, por meio da Resolução n. 588/2018 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), foi instituída a Política Nacional de Vigilância em Saúde (PNVS). Se trata um documento norteador do planejamento das ações de vigilância em saúde nas três esferas de gestão do Sistema Único de Saúde (SUS), caracterizado pela definição das responsabilidades, princípios, diretrizes e estratégias dessa vigilância.

## **1.2 Vigilância em Saúde Ambiental**

A VSA é um campo da Saúde Pública relativamente recente, em fase de construção, mas que tem avançado na sua estruturação e constituição (DEGGERONI et al, 2021). Tem como definição um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou outros agravos à saúde (BRASIL, 2009). Os avanços técnicos e operacionais, impulsionados pela relevância das doenças e agravos à saúde, o foco das ações de prevenção, e a urgência de respostas rápidas diante de emergências de saúde pública, fazem parte do processo de sua consolidação dentro da estrutura do SUS (ROHLFS et al., 2011).

Sendo assim, as áreas de vigilância da qualidade da água, de vigilância e controle de fatores biológicos e de contaminantes ambientais estão englobados no Sistema de Vigilância Ambiental em Saúde que se organiza em duas coordenações: Coordenação de Vigilância e Controle de Fatores de Risco Biológico (COFAB) e a de Coordenação de Vigilância e Controle dos Fatores de Risco Não Biológicos (CONAB) (BARCELLOS E QUITÉRIO, 2006; DEGGERONI et al, 2021).

Os padrões de consumo da sociedade industrial a partir da segunda metade do século XX, fez com que a produção de rejeitos aumentasse de maneira contínua em

ritmo superior à capacidade de absorção da natureza, obrigando todos os setores da sociedade a rever conceitos e valores. Essa geração de resíduos pelas diversas atividades antrópicas constitui-se atualmente em um grande desafio a ser enfrentado pelas administrações municipais, sobretudo nos grandes centros urbanos, causando destruição de ecossistemas, o aquecimento global, bem como a contaminação crescente da atmosfera, solo e água (LEFF, 2002).

### **1.3 Água residual**

O Brasil possui umas das maiores reservas de água do planeta, aproximadamente 15% do total dos recursos hídricos do, tanto na superfície como em reservas subterrâneas, por isso a importância de se fazer uma boa gestão dos recursos hídricos que temos (RIBEIRO, 2005). Conforme a Constituição Federal (BRASIL, 1988), o art. 225 dispõe sobre o direito que é de todos em ter um ambiente equilibrado ecologicamente, de uso comum de toda a população e, que de forma coletiva, devemos preservar e defender para que as gerações seguintes possam fazer uso. No parágrafo 1º, indica formas que o poder público tem de assegurar que esse direito seja cumprido, sendo dito no inciso V que o poder público tem poder de “controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comprometem risco para a vida, a qualidade de vida e ao meio ambiente”. Apesar de ser reconhecida a importância da qualidade da água, na prática, ocorrem inúmeros lançamentos de resíduos contendo antimicrobianos, metais traços, entre outros poluentes (BAKER-AUSTIN et al., 2006).

Água residual, esgoto ou efluente é o produto de utilização da água para fins domésticos ou comerciais, hospitalares, e industriais onde o tamanho da população e as atividades incidentes sobre esta água determinam o tipo e o volume do esgoto (DECENTRALIZED WASTEWATER GLOSSARY, 2009). Efluentes são classificados em quatro tipos principais segundo a origem da atividade: urbano, agrícola, hospitalar e industrial. O esgoto urbano é basicamente constituído de água, microrganismos e matéria orgânica, sendo que a matéria orgânica lançada no ambiente possibilita um desequilíbrio ecológico (LUCENA, 2008). Os efluentes hospitalares caracterizam-se como possíveis veículos de disseminação de inúmeros microrganismos patogênicos, além de apresentar uma variedade de substâncias tais como fármacos, antimicrobianos, desinfetantes, anestésicos, metais pesados e drogas não

metabolizadas por pacientes (AREND et al., 2013; EMMANUEL et al, 2005; HERNANDO et al, 2006; BOILLOT et al, 2008). Já o efluente industrial é normalmente composto por águas de lavagem das linhas de produção, resíduos da produção e sobras de substâncias removidas de máquinas e equipamentos. Ele apresenta características específicas que podem variar em função dos produtos que são fabricados pela unidade industrial (GIORDANO E SURERUS, 2015; ROCHA et al., 2019). Sendo assim, todos os tipos de efluentes, quando não tratados, são importantes contaminantes dos recursos hídricos.

### 1.3.1 Efluente Industrial

Efluente industrial é todo o resíduo líquido gerado nas diversas etapas de um processo produtivo, além do esgoto sanitário produzido pelos funcionários. Mais precisamente, de acordo com a norma brasileira da ABNT – NBR 9800/1987, efluentes industriais são “despejos líquidos provenientes das áreas de processamento industrial, incluindo os de origem nos processos de produção, águas de lavagens de máquinas, de operação de limpeza e outras fontes, que comprovadamente apresentem resíduos de produtos utilizados ou produzidos no estabelecimento industrial”.

A coleta e tratamento desses efluentes industriais é de responsabilidade da empresa geradora, mas esta atividade pode ser transferida para outras empresas especializadas. Esse efluente tratado pode ser lançado diretamente nos corpos receptores e/ou na rede coletora de esgoto sanitário, dependendo da atividade industrial e dos acordos firmados nas licenças ambientais, com a diferenciação de parâmetros para lançamento na rede coletora ou em corpos hídricos (HAMMER, 1996).

A legislação ambiental que corrobora com a realização da correta gestão ambiental referente a este assunto, está na resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357/2005, que definia padrões e condições para lançamento de efluentes em corpos hídricos. Posteriormente alterada e complementada pela CONAMA nº 430/2011 que enfatiza o correto destino dos efluentes dispendo sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para lançamento de efluentes em corpos de água, além de fixar padrões para lançamentos de efluentes oriundos de sistemas

de tratamento de esgotos sanitários e lançamento de esgotos sanitários por meio de emissários submarinos (efluentes lançados no mar) (GIORDANO, 2020).

A resolução CONAMA n° 430/2011 aponta ainda uma lista com parâmetros físicos, químicos e biológicos, cujos valores não devem ter seus limites ultrapassados. As indústrias ou empresas só poderão lançar diretamente os seus efluentes no corpo d'água receptor, quando estes estiverem dentro dos padrões estabelecidos pela resolução, sendo alguns deles (BRASIL, 2011; DIAS E GIORDANO, 2020):

- pH entre 5 a 9;
- temperatura: inferior a 40°C;
- materiais sedimentáveis: até 1 mL/L em teste de 1 hora em cone Imhoff. Porém, para lançamento em lagos e lagoas, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;
- regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vez a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor;
- óleos e graxas: óleos minerais até 20 mg/L; óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L;
- ausência de materiais flutuantes;
- Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO 5 dias a 20°C): remoção mínima de 60% de DBO.

Diante das possíveis contaminações hídricas, ações de proteção à água têm sido estabelecidas e uma estratégia crescente em todo o mundo é a instalação de estações de tratamento de esgotos (ETEs), tendo como objetivo remoção de matéria orgânica e microrganismos, devolvendo ao ambiente uma água de melhor qualidade (NAIDOO E OLANIRAN, 2014). O processo de tratamento de efluentes instituído em uma ETE, geralmente é realizado pela utilização de processos físicos, químicos e biológicos, e acontece em estágios, iniciando com a coleta, tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar consiste na remoção de sólidos grosseiros, enquanto no tratamento primário são removidos os sólidos de maiores dimensões e decantáveis além de uma parte da matéria orgânica como óleos e gorduras (VON SPERLING, 2005). O tratamento secundário, possibilita a decomposição dos sólidos suspensos remanescentes e uma grande diminuição da carga microbiana, utilizando principalmente sistemas biológicos (VON SPERLING,

2005; NAIDOO E OLANIRAN, 2014). Neste estágio, reatores biológicos são empregados e utilizam bactérias aeróbias ou anaeróbias, respectivamente, empregando sistema de aeração de lodos ativados ou sistemas anaeróbios, tipo RAFA (Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente) (VON SPERLING, 2005). No tanque de aeração, a demanda contínua de matéria orgânica favorece o crescimento e a reprodução dos microrganismos, o que deve ser controlado uma vez que o excesso de biomassa pode interferir na eficácia do sistema bem como comprometer a sedimentação no decantador secundário com consequente liberação de efluente de baixa qualidade. O tratamento terciário é empregado para remoção de nutrientes, metais pesados, organismos patogênicos e de outros poluentes específicos remanescentes do tratamento secundário (VON SPERLING, 2005). A escolha do processo para ser utilizado vai depender do tipo de efluente que se pretende tratar, de sua biodegradabilidade, da produção de lodos e presença de compostos tóxicos (AMARAL et al, 2013). Por serem sistemas simples, de baixo custo de funcionamento, e eficientes na eliminação de poluição secundária, os processos biológicos têm sido o mais usado para o tratamento secundário de efluentes domésticos, urbanos e para a maioria dos despejos industriais (AMARAL et al, 2013; GIORDANO E SURERUS, 2015; HE et al, 2017).

A comunidade microbiana de uma ETE é formada principalmente de enterobactérias (presente no trato intestinal de humanos), e patógenos capazes de 'escapar' da ação biocida e de antimicrobianos (eliminados pelas fezes) (VERBURG et al, 2021). Além disso estão continuamente expostas a diversos compostos antrópicos destacando-se dentre estes os antimicrobianos, oriundos de excretas de seres humanos, animais, esgotos hospitalares e resíduos de indústrias (SUZUKI E HOA, 2012). Sendo assim, estas comunidades tendem a sofrer pressão seletiva, o que pode levar a disseminação de patógenos.

#### **1.4 Micropoluentes emergentes**

A ocorrência de micropoluentes emergentes ganhou destaque na década passada e vem sendo continuamente relatada em diferentes aspectos por pesquisadores do mundo todo. A Agência de Proteção Ambiental Americana (*United States Environmental Protection Agency* - USEPA) define poluentes emergentes como

novos compostos químicos não legislados, que podem apresentar impactos sobre o meio ambiente e a saúde humana.

Tratam-se de centenas de substâncias detectadas nos mais diferentes ambientes como solo, ar e água. Ocorrem em concentrações extremamente baixas, principalmente em matrizes aquáticas, na ordem de nanograma a picograma por litro, o que torna ainda mais complexa sua análise ou avaliação de risco (MONTAGNER et al., 2017). Podem ser tanto de origem antrópica, quanto de ocorrência natural e geralmente incluem produtos como os de cuidados pessoais e farmacêuticos, desreguladores endócrinos, poluentes orgânicos persistentes, subprodutos de desinfecção, produtos químicos industriais, microplásticos, metais pesados, toxinas de algas, genes de resistência e alguns microrganismos (MONTAGNER et al, 2017; LIU, B.; et al., 2019; ARYAL, et al., 2020).

Os metais pesados são responsáveis pela poluição dos ecossistemas em resposta aos despejos de resíduos industriais e domésticos sem tratamento prévio (ZENG E CHENG, 2013). Muitos são essenciais para as células e podem ser encontrados naturalmente no ambiente. No entanto, níveis excessivos podem resultar na degradação do meio ambiente provocando riscos significativos à saúde humana, animal e ao ecossistema (YANG et al., 2005; ZENG; CHENG, 2013; MAHMOOD; MALIK, 2014). Sua presença em águas residuais e ou efluentes representa um risco à longo prazo, pois não são biodegradáveis e apresenta uma tendência à bioacumulação (KOBYA et al., 2008; HEC DA SILVA, 2011). Além de induzir diversas alterações relacionadas às comunidades microbianas, como reduzir o número e a diversidade, e selecionar populações microbianas resistentes ou tolerantes (EZZOUHRI et al., 2009).

Já os fármacos são os poluentes emergentes que mais têm chamado a atenção dos pesquisadores devido ao aumento crescentes no consumo mundial (SILVA E COLLINS, 2011). Dentre eles, a classe que mais vêm se destacando são as dos antimicrobianos, considerados como os de maiores ameaças à saúde pública pela Organização Mundial da Saúde, que excedeu o uso em 100.000 toneladas por ano (ZAD, ASTUTI E PADHYE, 2018).

Com o objetivo de fortalecer a política de uso racional de antimicrobianos e, conseqüentemente, contribuindo para a redução da resistência bacteriana na população a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) implementou a RDC 44/2010, atualizada pela RDC 20/2011, estas novas resoluções determinaram que os

antimicrobianos vendidos em farmácias e drogarias do país apenas poderão ser entregues ao consumidor mediante receita de controle especial em duas vias, e somente poderão ser comercializados mediante escrituração obrigatória no Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010, 2011).

Esse cenário vem aumentando a preocupação com o destino e disseminação dessas substâncias que geram pressão seletiva promovendo a transferência horizontal de genes e a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos (BRA) e genes de resistência a antimicrobianos (GRA) em ambientes terrestres e, principalmente, aquáticos (ZAD, ASTUTI E PADHYE, 2018; DANNER et al, 2019).

#### 1.4.1 Antimicrobianos e Resistência

Antimicrobianos são drogas que matam ou inibem o crescimento e proliferação de bactérias. Existem vários tipos, e podem ser classificados de acordo com sua estrutura química ou seus mecanismos de ação (Tabela 1). Eles têm sido usados em grandes quantidades por algumas décadas e a resistência bacteriana aos antimicrobianos tem sido grande foco da pesquisa em ambientes clínicos, e nos últimos anos, na pesquisa ambiental. Os compostos originais dos antimicrobianos, ou seus metabólitos, podem ser estáveis o suficiente para contornar os processos de tratamento de águas residuais e vazarem para o meio ambiente (KÜMMERER, 2009), e embora diluído por um fator de mais de um milhão em relação às concentrações no corpo humano (JJEMBA, 2006), os antimicrobianos dispersos no ambiente podem levar a consequências muito importantes para a saúde humana e para os ecossistemas (DANNER et al, 2019).

Tabela 1. Principais mecanismos de ação e de resistência aos antimicrobianos.

Classe	Exemplos	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
<b>β-lactâmicos</b>	Penicilinas	Inibição da síntese de peptidoglicano, através da ação das PBPs	-Hidrólise enzimática do anel β-lactâmico (β-lactamases)
	Cefalosporinas		-Mutações nas PBPs
	Carbapenêmicos		-Alteração da permeabilidade transmembrana -Efluxo
<b>Quinolonas e Fluoroquinolonas</b>	Ciprofloxacina	Bloqueio da ação das topoisomerases do tipo II, DNA girase e topoisomerase IV	-Mutações nos genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> (DNA girase), <i>parC</i> e <i>parE</i> (topoisomerase IV) -Alteração da permeabilidade transmembrana -Efluxo
<b>Tetraciclínas</b>	Tetraciclina	Inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 30S dos ribossomos	-Proteção do ribossomo por proteínas citoplasmáticas -Alteração da permeabilidade transmembrana -Efluxo
<b>Aminoglicosídeos</b>	Gentamicina	Inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 30S dos ribossomos	-Inativação enzimática -Mutações ribossomais -Efluxo
<b>Glicopeptídeos</b>	Vancomicina	Inibição da síntese de peptidoglicano	-Alteração enzimática dos ribossomos -Efluxo
<b>Macrolídeos</b>	Eritromicina	Inibição da síntese proteica ao nível da subunidade 50S dos ribossomos	-Mutações ribossomais -Efluxo
<b>Sulfonamidas</b>	Sulfametoxazol	Inibição competitiva da dihidrofolato redutase (DHFR), bloqueando a síntese de DNA e RNA	-Aumento da produção de DHFR -Mutações no gene estrutural da DHFR -Efluxo
<b>Lincosamidas</b>	Clindamicina	Atuação ao nível da subunidade 50S dos ribossomos	-Mutações ribossomais -Alteração da permeabilidade transmembrana -Efluxo
<b>Polipeptídeos</b>	Polimixina B e E	Desestabilização da membrana, deslocando competitivamente os íons Ca e Mg ao se ligarem a fosfolipídeos e lipopolisacáridos (LPS)	-Alterações no LPS
			-Efluxo

Fonte: (VÁZQUEZ-LASLOP; MANKIN, 2018).

Embora os antimicrobianos sejam administrados para fins humanos, veterinários e agrícola, organismos da microbiota ambiental, são inevitavelmente expostos quando entram em contato com seus compostos (FLAHERTY E DODSON, 2005). A concentração resultante de antimicrobianos que entra nos sistemas

aquáticos pode interagir com os organismos nativos gerando uma pressão seletiva que pode mudar a genética e a estrutura da comunidade microbiana (SINGER et al., 2016). As Cianobactérias, por exemplo, podem ser particularmente vulneráveis aos antimicrobianos (CABELLO, 2006) e a exposição contínua do meio ambiente pode potencializar a seleção de genes de resistência e microrganismos resistentes, que incluem potenciais patógenos (KÜMMERER, 2004).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode ser um atributo intrínseco (inerente ao organismo, que o torna naturalmente resistente), ou pode ser adquirida por transferência horizontal de genes que codificam a resistência (elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons) (NADEEM et al., 2020).

A transferência horizontal de genes é um mecanismo importante para a disseminação de resistência aos antimicrobianos em bactérias, responsável por transferir material genético ou elementos genéticos móveis (EGM) entre bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes (BECEIRO et al., 2013; GUPTA E BIRDI 2017). Os três processos clássicos de troca genética em bactérias, são transformação com DNA livre, transdução por bacteriófagos e conjugação envolvendo plasmídeos. No ambiente, a conjugação é considerada a mais importante na transferência horizontal de genes (MASSOUDIEH et al., 2007). No entanto, a transformação natural e a transdução não podem ser negligenciadas, porque esses dois mecanismos podem transferir plasmídeos e genes de resistência a antimicrobianos (SUN, 2018).

A pressão de seletiva causada pelos antimicrobianos ou a combinação deles com outros agentes co-seletivos (metais, biocidas, fitoquímicos e microplásticos), torna o resistoma ambiental aquático enriquecido com bactérias resistentes a antimicrobianos e genes de resistência que são capazes de persistir e se espalhar no ambiente de forma global (DANNER et al., 2019; HERNANDO-AMADO et al., 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), e todos principais órgãos reguladores econômicos e políticos, incluindo o Fundo Monetário Internacional, o Banco Mundial e o G8, a resistência antimicrobiana é reconhecida como um dos principais desafios de saúde global do século 21. Todos concordam com a visão científica de que a resistência antimicrobiana não pode mais ser tratada simplesmente estudando o problema nas unidades de saúde, uma vez que a maioria dos ecossistemas contribui para o seu surgimento, aquisição e disseminação. Esse problema é, portanto, visto atualmente a partir de dois conceitos complementares, *One Health* (Saúde Única) e *Global Health* (Saúde Global), que têm sido usados para

tratar de problemas associados a doenças infecciosas em geral, e em particular, da resistência antimicrobiana. Ambos os conceitos são holísticos e interdisciplinares e se baseiam na ideia de que a saúde humana e a saúde animal são interdependentes, além de estarem ligadas à saúde dos ecossistemas dos quais fazem parte. Sem essa visão e a implementação de medidas efetivas, a perspectiva é de grande agravamento nos próximos anos (DANNER et al., 2019; RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2020).

### **1.5 Bactérias resistentes aos antimicrobianos e genes de resistência aos antimicrobianos**

Os antimicrobianos são medicamentos que revolucionaram a maneira de lidar com as doenças de origem bacteriana e reduziram no mundo todo os índices de doenças e mortes causadas por essas. No entanto, sabe-se que a produção e o descarte indevido desses agentes poluem o ambiente com resíduos ativos, selecionando BRA (BENGTSSON-PALME et al., 2019).

A resistência e a presença de organismos resistentes é uma crise de saúde global emergente, impulsionada em grande parte pelo uso excessivo e indevido de antimicrobianos (BENGTSSON-PALME et al., 2019; WATKINSON et al., 2009). Estimativas revelam que até 2050, a mortalidade mundial terá um aumento significativo. A previsão é de 10 milhões de mortes causadas pela resistência aos antimicrobianos. Infecções bacterianas irão causar mais mortes que câncer e diabetes, o que tem gerado grande apreensão entre autoridades de saúde (ARANCIBIA, 2019).

Sendo assim, BRA têm a capacidade de impedir a ação de um agente antimicrobiano específico comprometendo o tratamento de doenças infecciosas. Os mecanismos que a bactéria utiliza como autoproteção são múltiplos, devido às novas mutações e aos mecanismos de resistência obtidos principalmente de GRA, que são transferidos de uma para outra através de plasmídeos e transposons, devido à pressão seletiva exercida pelo meio (BRITO E TREVISAN, 2021).

Nas últimas décadas o surgimento de BRA encontradas nos ambientes aquáticos cresceu notavelmente (SERAFIM et al., 2018; MIYAKE et al., 2003). Esses microrganismos foram encontrados, por exemplo, em estações de tratamento de esgoto (RIBEIRO, 2011) e águas de rios e mares (SALLOTO et al., 2012). A larga contaminação dos ambientes aquáticos vem se agravando ao longo dos anos. Um

estudo de PEAK et al., de 2007 exemplifica isso demonstrando o isolamento de bactérias resistentes às fluoroquinolonas e a identificação destes genes de resistência neste ambiente. Isso acontece porque no ambiente aquático a troca de genes ocorre mais frequentemente devido à fácil movimentação de microrganismos e de EGM (PEIXOTO et al., 2012). Estudos indicam que a microbiota ambiental se adapta rapidamente à presença de contaminantes, através da dispersão de genes entre espécies e, principalmente, pela transferência plasmidial. Além disso, genes podem ser acumulados em EGM, possibilitando assim, a disseminação não só da resistência aos antimicrobianos, mas também de fatores de virulência, fixação de nitrogênio e da degradação de compostos tóxicos (DI CESARE et al., 2016; SEILER E BERENDONK, 2012).

Portanto, o meio ambiente, principalmente o aquático, pode constituir um grande reservatório dos GRA e BRA que estão amplamente distribuídos nos vários compartimentos ambientais e apresentam grande potencial de disseminação (BAQUERO et al., 2008; DANTAS et al., 2008; PRUDEN et al., 2006). Esse cenário vem demonstrando a necessidade de prevenir o surgimento e a disseminação da resistência bacteriana ambiental que potencialmente pode chegar aos patógenos humanos e aos ambientes hospitalares.

## 2 JUSTIFICATIVA

A temática de contaminantes emergentes ou micropoluentes emergentes ganhou destaque na década passada e vem sendo abordada em diferentes aspectos por pesquisadores do mundo todo. Trata-se de centenas de compostos que têm sido detectados em diferentes ambientes como solo e água, tanto de origem antrópica como efluentes domésticos, industriais, hospitalares e aqueles de atividades agrícola e pecuária, quanto de ocorrência natural (MONTAGNER et al., 2017).

A presença desses poluentes gera uma pressão seletiva que resulta no aumento e na disseminação de microrganismos multidroga resistentes, bem como de genes de resistência, nos mais diversos ambientes. Uma abordagem integrativa na qual todos os ecossistemas que contribuem para essa evolução são estudados; uma abordagem “One Health”, que é um conceito derivado da ideia proposta por Rudolph Virchow no século XIX, afirmando que “entre a medicina animal e a humana não existem linhas divisórias, nem deveria haver”. A ideia subjacente é que, pelo menos no caso de doenças infecciosas, diferentes ecossistemas, não apenas o hospedeiro humano, podem contribuir para a disseminação dos agentes infecciosos. Isso é particularmente relevante no caso da resistência a antimicrobianos, pois é geralmente aceito que os genes de resistência a antimicrobianos, atualmente presentes nos patógenos humanos, são originários de organismos ambientais e, portanto, os ecossistemas naturais podem ser reservatórios e participar da disseminação (JEAN, 2017; ROBINSON et al., 2016; DAVIES, J., 1994; MARTINEZ, 2008).

Doenças infecciosas comuns, atualmente tratáveis com antimicrobianos podem, em breve, tornarem-se intratáveis e com riscos de vida, até mesmo nos países desenvolvidos. Essa crise é global, refletindo o uso excessivo mundial dessas drogas, a disseminação de genes de resistência e a falta de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos pelas empresas farmacêuticas para enfrentar o desafio. Os esforços coordenados para implementar novas políticas, renovar os esforços de pesquisa e buscar medidas para administrar a crise são extremamente necessários.

Em função desta problemática, neste projeto realizamos estudos voltados à determinação de poluentes químicos, como metais traços e antimicrobianos em conjunto com a determinação da resistência bacteriana em efluentes industriais no Rio de Janeiro. Os dados obtidos nos permitiram revelar o resistoma microbiano e suas alterações frente aos poluentes químicos.

### **3 OBJETIVO**

#### **Geral**

Investigar a presença de contaminantes químicos e biológicos, e seus possíveis impactos, na disseminação e persistência do resistoma ao longo do tratamento de efluentes de indústrias farmacêuticas submetidos ao tratamento.

#### **Específicos**

- Detectar resíduos de antimicrobianos e metais traços nos afluentes e efluentes das Estações de tratamento;
- Isolar e identificar bactérias multirresistentes aos antimicrobianos;
- Avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados e determinar seus perfis de resistência;
- Sequenciar o genoma completo de isolados que estavam presentes ao longo do tratamento dos efluentes;
- Avaliar o resistoma, viruloma e mobiloma dos isolados;
- Analisar as relações filogenéticas através da comparação dos genomas anotados.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Local de estudo

- **Estações de tratamento de efluente industrial (ETEI) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos – FIOCRUZ.**

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) é a unidade da FIOCRUZ responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, reagentes para diagnósticos e biofármacos voltados prioritariamente às questões e demandas da saúde pública no Brasil. Produz biofármacos como alfaeopetina, alfainterferona 2b, alfataliglicerase, betainterferona 1<sup>a</sup>, etanercepte, golemumabe, infliximabe, entre outros. Também é responsável pela produção de kits de diagnóstico, como os teste rápidos (COVID-19, dengue, HIV/Sífilis, entre outros), testes moleculares (Febre amarela, ZDC, NAT HIV/HCV/HBV, e SARS-CoV-2), além de ensaios parasitológicos e sorológicos. Também é responsável pela produção das vacinas Tríplice viral, Tetravalente viral, Rotavírus humano, Poliomielite oral, Poliomielite inativada, Pneumocócica, Meningite A e C, *Haemophilus influenzae* B, Febre amarela, DTP e Hib, e mais recentemente a vacina da COVID-19 (recombinante). O Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV) é um dos maiores e mais modernos centros de produção de imunobiológicos da América Latina e possui a responsabilidade de suprir o calendário básico do Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde. Desde sua fundação, em 1976, Bio-Manguinhos vem se destacando no cenário internacional não só pelas exportações de vacinas através da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), mas porque está qualificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para atender ao fornecimento das vacinas de febre amarela e meningite AC para as agências das Nações Unidas em mais de 70 países (<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/home/quem-somos>).

A Estações de tratamento de efluente industrial de Bio-Manguinhos tem a capacidade de vazão média de 5,4 L/s, evitando que o esgoto produzido pelo complexo seja despejado sem tratamento nos rios da região. O tratamento é classificado como secundário, ou seja, realiza a fase primária (remoção de sólidos flutuantes) e a fase secundária (controle biológico) que é através do lodo ativado com

aeração prolongada e decantação. Após a decantação o lodo é desidratado por centrifugação e incinerado.

- **Estações de tratamento de efluente industrial (ETEI) do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos – FIOCRUZ.**

Fundado em 1976, o Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) é uma unidade técnico-científica da FIOCRUZ responsável pelo desenvolvimento tecnológico e produção de medicamentos, está localizado em Curicica no município do Rio de Janeiro. Ocupa posição estratégica como maior laboratório farmacêutico oficial do Poder Executivo Federal vinculado ao Ministério da Saúde do Brasil, desenvolvendo medicamentos de alto valor agregado e/ou estratégico que garante o acesso da população pelo SUS. O Instituto possui capacidade instalada de produção de mais de 2,5 bilhões de unidades de medicamentos por ano, e possui registro em 33 tipos de medicamentos diferentes produzindo antimicrobianos, anti-inflamatórios, anti-infecciosos, antiulcerosos, analgésicos, medicamentos para doenças endêmicas, como malária e tuberculose, antirretrovirais para tratamento do HIV e hepatites virais. Também fabrica fármacos para o sistema cardiovascular e o Sistema Nervoso Central (<https://far.fiocruz.br/index.php/br/home/quem-somos>).

A Estações de tratamento de efluente industrial de Farmanguinhos tem até 95% de eficiência no tratamento de todo o efluente da unidade, evitando que o esgoto produzido pelo complexo seja despejado sem tratamento no Rio Arroio Pavuna. O tratamento é classificado como terciário, pois possui uma etapa físico-química que é de neutralização do resíduo líquido industrial, seguido do processo biológico aeróbio, através do lodo ativado, que é incinerado ao final.

## **4.2 Amostragem**

Foram coletados cinco litros de amostra dos seguintes pontos de cada ETE, em galões estéreis: ETEI Bio-manguinhos: Divididas em 5 pontos: entrada (BIO1); mistura/equalização (BIO2); aeração (BIO3); decantação (BIO4); saída (BIO5) (Figura 1). Enquanto isso, na ETEI Farmanguinhos foram coletadas amostras da entrada de esgoto industrial (FAR1); esgoto industrial equalizado (FARE); entrada de esgoto sanitário (FAR2); mistura (FAR3); aeração (FAR4); Decantação (FARL); saída

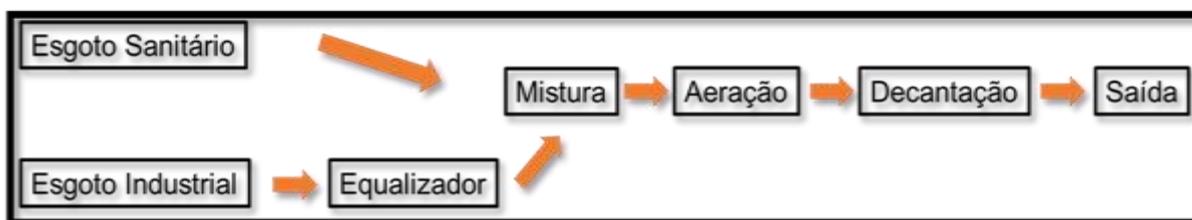
(FAR5); e lodo (L10) (Figura 2). As amostras coletadas foram transportadas para o laboratório sob refrigeração e processadas logo em seguida.

Figura 1. Pontos de coleta da ETE de Biomanguinhos/FIOCRUZ.

Fonte: r3engenhariaeconstrucoes.com.br



Figura 2. Pontos de coleta da ETE de Farmanguinhos/FIOCRUZ.



Fonte: Do autor,2022.

#### 4.3 Detecção de antimicrobianos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial (LC-MS/MS)

Os padrões de  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas, macrolídeos, sulfonamidas e tetraciclins foram obtidos no setor de Substâncias Químicas de Referência (SQRFB) do INCQS e preparados a fim de obter uma concentração de aproximadamente  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  (Tabela 4). As soluções estoques de  $\beta$ -lactâmicos foram preparadas em água, as de fluoroquinolonas em solução de  $0,03 \text{ mol}/\text{L}^{-1}$  de NaOH e de macrolídeos, sulfonamidas e tetraciclins em MeOH. A massa teórica pesada para cada padrão foi calculada considerando correções de pureza, teor de água e ácido livre. As soluções

foram transferidas para microtubos e estocadas em freezer a temperaturas igual ou inferior a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 2. Antimicrobianos pesquisados nas amostras de efluentes industriais.

<b>Classe de antimicrobianos</b>	<b>Antimicrobianos</b>
$\beta$ -lactâmicos	Amoxicilina, ampicilina, benzilpenicilina, cefaclor, cefadroxila, cefalexina, cefapirina, cefazolina, cefoperazona, cefquinoma, ceftiofur, cloxacilina, desacetilcefapirina, dicloxacilina, fenoximetilpenicilina, oxacilina e nafcilina
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina e ofloxacina
Macrolídeos	Azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina, oleandomicina, roxitromicina, tilmicosina, tilosina e troleandomicina.
Sulfonamidas	Dapsona, sulfacetamida, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina e sulfatiazol
Tetraciclinas	Clortetraciclina, doxiciclina, metaciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, 4-epiclorotetraciclina, 4-epioxitetraciclina e 4-epitetraciclina

Fonte: (Do autor, 2022).

Foram adicionados 25 mg de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  em uma alíquota de 25 mL de amostra filtrada. Em seguida o pH foi ajustado a 2,5 com HCl concentrado para promover uma melhor adsorção dos analitos na etapa de extração por fase sólida, empregando-se cartuchos Oasis HLB 500 mg/6 mL (Waters, EUA), previamente condicionados com 5 mL de metanol, 5 mL de água ultrapura e 5 mL de água acidificada com HCl concentrado a pH 2,5. Após uma lavagem com duas porções de 2,5 mL de água ultrapura para eliminação de interferentes, os analitos foram eluídos com duas porções de 3 mL de metanol e em seguida com duas porções de 2 mL de solução de metanol: acetona (1:1, v/v). O eluato foi separado em dois tubos de centrífuga, um para análise de tetraciclinas e sulfonamidas, e o outro para análise de  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos e quinolonas. Os eluatos foram evaporados à secura com  $\text{N}_2$  à temperatura de no máximo  $47,5^{\circ}\text{C}$ . O extrato seco contido no tubo de centrífuga referente a tetraciclinas e sulfonamidas foi reconstituído com 1 mL do solvente de reconstituição (80:20 (v/v) de 0,1% v/v de ácido fórmico em água e metanol) e o outro tubo de centrífuga referente a  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos e quinolonas foi reconstituído com 1 mL do solvente de reconstituição (65% de metanol em água), em seguida homogeneizado em agitador tipo vórtex, filtrado em filtros de fibra de vidro/nylon 0,2

$\mu\text{m}$  e transferido para um frasco, para injeção no sistema de LC-MS/MS (ENGLERT, 2007).

O sistema de LC-MS/MS é composto de cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence (com os seguintes módulos: bomba quaternária LC-20AD, desgaseificador de membrana DGU-20A5, autoamostrador SIL-20AC, forno de coluna CTO-20AC e controladora CBM-20A) e detector API5000 Applied Biosystems/MDS Sciex com fonte Turbo V<sup>®</sup> e sonda TurbolonSpray<sup>®</sup>, controlado pelo software Analyst versão 1.4.2 do mesmo fabricante. Os antimicrobianos foram separados a 25 °C em coluna C18 (Pursuit<sup>™</sup> RS, 2,0 mm x 100 mm x 3  $\mu\text{m}$  – Agilent), com coluna de guarda do mesmo tipo (2,0 mm x 3  $\mu\text{m}$ ). Foram utilizados para produzir um programa de eluição gradiente 0,1% v/v de ácido fórmico em água (fase móvel A), 0,1% v/v de ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B) e 0,1% v/v de ácido fórmico em metanol (fase móvel C).

#### **4.4 Determinação dos níveis de metais traço por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)**

Foram pesquisados 16 metais traço em todas as amostras de água residuais: alumínio (Al), bário (Ba), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), lítio (Li), manganês (Mn), mercúrio (Hg), níquel (Ni), prata (Ag), selênio (Se), urânio (U) e zinco (Zn). As soluções de calibração foram preparadas diariamente através de diluições em série da solução de padrões multi-elemento (1000 mg/L<sup>-1</sup> de cada padrão) para ICP-OES. As amostras foram diluídas 10 vezes com água desionizada. Todas as amostras foram analisadas com o ICP-OES, modelo Optima<sup>®</sup> 8300 (PerkinElmer, EUA), equipado com WinLab32<sup>™</sup> para o software ICP Versão 4.0 para a medição simultânea de todos os comprimentos de onda dos analíticos investigados.

#### **4.5 Isolamento e identificação**

As amostras foram concentradas em membrana 0,22  $\mu\text{M}$ , e inoculadas, em duplicata, em meios de cultura contendo antimicrobianos (Tabela 3) e incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas.

Tabela 3. Conjuntos de meios de cultura contendo antimicrobianos

Conjunto	Meio de cultura	Conjunto de antimicrobianos
A	Brain Heart Infusion (BHI)	Ceftazidima (4 mg/L) + meropenem (8 mg/L)
B	BHI	Ceftazidima (4 mg/L) + meropenem (8 mg/L) + polimixina (2 mg/L)
C	BHI	Polimixina (2 mg/L)
D	Manitol salgado	Vancomicina (2 mg/L)
E	Manitol salgado	Oxacilina (2 mg/L)
F	Manitol salgado	Vancomicina (2 mg/L) + Oxacilina (2 mg/L)

Fonte: (Do autor, 2022).

Após esse período, os caldos com crescimento foram plaqueados em agar BHI para isolamento bacteriano. Posteriormente, os isolados obtidos foram submetidos à identificação fenotípica por meio da coloração de Gram e sistema VITEK II.

Os isolados não identificados pelo sistema VITEK II foram identificados através do sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA. A extração de DNA foi realizada utilizando *Purelink Genomic mini Kit* (ThermoFisher, EUA). Foram utilizados os iniciadores 27BF (5' - AGAGTTTGATCATGGCTCAG - 3') e 1492ABr (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') que proporcionam a amplificação de um fragmento de 1465 pb (LANE *et. al.*, 1991). A mistura da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi composta por água deionizada; 1X PCR MasterMix (Promega, EUA) e 15 pmol de cada iniciador. A esta mistura foram adicionados aproximadamente 10 ng do gDNA a ser analisado e a amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 1 minuto; anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto por 35 ciclos, com uma extensão adicional a 72 °C por 15 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1,5% (p/v); revelado com *GelRed™* 1X (Biotium, EUA) e analisado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (Loccus Biotechnology, Brasil). Após confirmar a amplificação, os produtos foram purificados utilizando *Purelink Quick PCR Purification* (ThermoFisher, EUA) de acordo com o manual do fabricante.

Os fragmentos foram sequenciados tanto no sentido *forward* como no *reverse* e em duplicatas utilizando o kit *Big Dye Terminator* por eletroforese capilar em aparelho SeqStudio (ThermoFisher Scientific™, EUA) o sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq disponível no INCQS (Rede Genômica da Fiocruz). A qualidade dos cromatogramas obtidos foi analisada através do software

*Sequencher 5.0* (Gene Codes Corporation, EUA). A análise de similaridade das sequências foi realizada pelos programas BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no GenBank (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI) e EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/>) (KIM et al., 2012).

Logo após o isolamento, as cepas foram preservadas em glicerol 20% e estocadas a -70°C. Após a identificação, os isolados foram preservados por liofilização e armazenados na Coleção de Micro-organismos do INCQS/FIOCRUZ.

#### 4.6 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado pelo Sistema VITEK II (CLSI 2018). Os isolados que apresentaram resistência a no máximo um antimicrobiano, foram classificados como *non Multidrug-resistant* (non-MDR), resistência a pelo menos um antimicrobiano de três classes distintas como *Multidrug-resistant* (MDR), resistência a pelo menos um antimicrobiano em todas as classes, exceto  $\leq 2$  como *Extensively drug-resistant* (XDR) e resistência a todos os antimicrobianos testados como *Pandrug-resistant* (PDR) (MARGIORAKOS et al., 2011).

#### 4.7 Detecção do gene *vanA*

A extração do DNA genômico (gDNA) foi realizada usando o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). O volume final de PCR foi de 25  $\mu$ L, incluindo 1 mM de cada primer (A1+ 5'-GGGAAAACGACAATTGC-3' e A2- 5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3') (DUTKA-MALEN et al., 1995) 1X GotTaq G2 Mastermix (Promega). A esta mistura foram adicionados aproximadamente 10 ng do gDNA a ser analisado e a amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 1 minuto; anelamento a 54 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto por 30 ciclos, com uma extensão adicional a 72 °C por 10 minutos. O gDNA das cepas de referência *E. faecium* CBRVS 00653 ( ATCC 51559) e *Enterococcus faecalis* CBRVS 00654 (ATCC 51575) como controle positivo e controle negativo, respectivamente.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1,5% (p/v); revelado com *GelRed™* 1X (Biotium, EUA) e analisado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (Loccus Biotechnologia, Brasil). Após confirmar a

amplificação, os produtos foram purificados utilizando Purelink Quick *PCR Purification* (ThermoFisher, EUA) de acordo com o manual do fabricante.

#### 4.8 Sequenciamento genoma Completo e análise bioinformática

As bactérias identificadas como *Enterococcus faecium* e *Elizabethkingia* spp. foram selecionados para sequenciamento completo do genoma. A biblioteca foi preparada utilizando Nextera XT kit (Illumina Inc, EUA) e o sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq disponível no INCQS (Rede Genômica da Fiocruz). Os nucleotídeos ambíguos com base no índice de qualidade e nas sequências do adaptador foram então aparados usando a ferramenta *Fastp* (Chen et al., 2018), as sequências com um Phredscore inferior a 30 foram removidas. A montagem de novo de leituras aparadas e sequências de alta qualidade foi realizada em Unicycler (WICK et al., 2017). A qualidade dos genomas montados foi avaliada usando QUAST 2.0. A avaliação genômica da resistência antimicrobiana foi realizada utilizando o RGI do CARD para investigar a presença de GRA adquiridos e o ResFinder para avaliar as mutações que induzem a resistência. Os plasmídeos foram avaliados usando PlasmidFinder v2.1 (CARATTOLI E HASMAN, 2020) e ViralVerify (ANTIPOV et al., 2020). Elementos genéticos móveis também foram avaliados usando MobileElementFinder v1.0.3 (JOHANSSON et al., 2021). Para verificar os fatores de patogenicidade e virulência (VFs), foram utilizados PathogenFinder v1.1 (COSENTINO et al., 2013) e VirulenceFinder 2.0 (MALBERG et al., 2020), respectivamente.

#### 4.9 Avaliação da relação clonal dos isolados

A *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC)-PCR foi utilizada no estudo para a análise do polimorfismo do DNA das amostras bacterianas de *Proteus* spp. da ETEI Farmanguinhos, com o objetivo de avaliar a similaridade genética entre os isolados. Para esta técnica foram utilizados os iniciadores ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'), e ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') com protocolo previamente descrito (VERSALOVIC et al., 1991). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, a 1,5% (p/v); revelado com GelRed (BIOTIUM) e analisado pelo

sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (Loccus Biotechnologia, Brasil). Os padrões de bandas foram analisados através do Programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). O dendograma foi construído com a utilização do índice de Dice e o método “*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average*” (UPGMA) (VAN BELKUM et al., 2007). Os isolados que apresentarem perfis de bandas com similaridade  $\geq 80\%$  foram classificados no mesmo grupo genético (KHALIL et al., 2017).

Enquanto isso, o *Multilocus sequence typing* (MLST) dos genomas de *E. faecium* e *Elizabethkingia* sp. foi avaliado por meio dos bancos de dados PubMLST e Pasteur Institute's MLST database.

## **5 RESULTADOS**

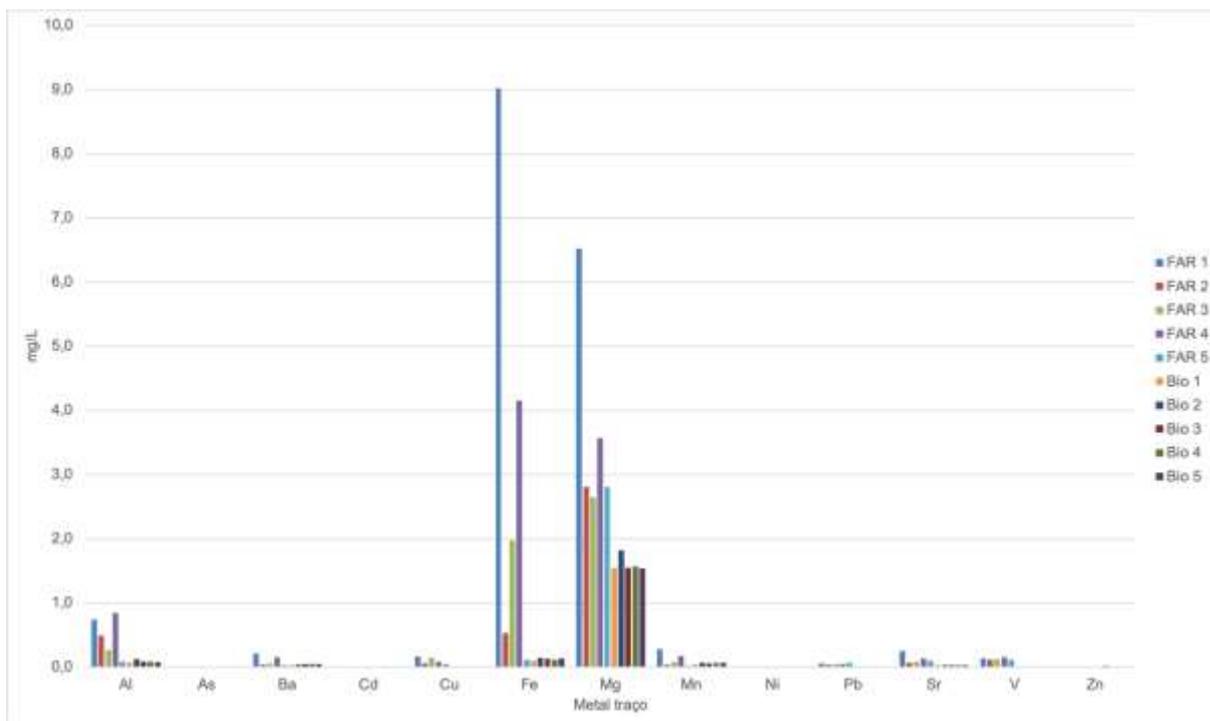
### **5.1 Detecção de antimicrobianos nas amostras**

O limite de detecção (LD) da curva de quantificação de antimicrobianos foi de 25 ng/L<sup>-1</sup>. Não foram encontrados resíduos das substâncias pesquisadas em nível igual ou maior que os LD na ETEI de Farmanguinhos. Enquanto isso, em todas as amostras da ETEI de Bio-manguinhos foram detectados, porém não quantificados, traços de claritromicina (macrolídeo) e amoxicilina (beta-lactâmico), e valores acima de 100 ng/L de azitromicina (macrolídeo).

### **5.2 Detecção de metais traços nas amostras**

Foram detectados 13 metais traços nas amostras de efluentes de Farmanguinhos, o arsênio foi o único metal encontrado apenas nos pontos FAR1 (entrada de esgoto industrial) e FAR2 (entrada de esgoto sanitário), variando entre 0,0008 e 0,002 mg/L. Enquanto isso, os outros metais estiveram presentes até o ponto de saída. Por outro lado, foram detectados 9 metais nas amostras de efluentes de Bio-manguinhos, presente em todos os pontos da ETEI. O ferro e o magnésio foram os metais que apresentaram concentrações mais altas em todos os pontos, variando de 0,0900 a 0,1470 mg/L e 1,5400 a 1,8170 mg/L, respectivamente (Figura 3).

Figura 3. Teor de metais nas amostras de efluentes.



Fonte: (Do autor, 2022).

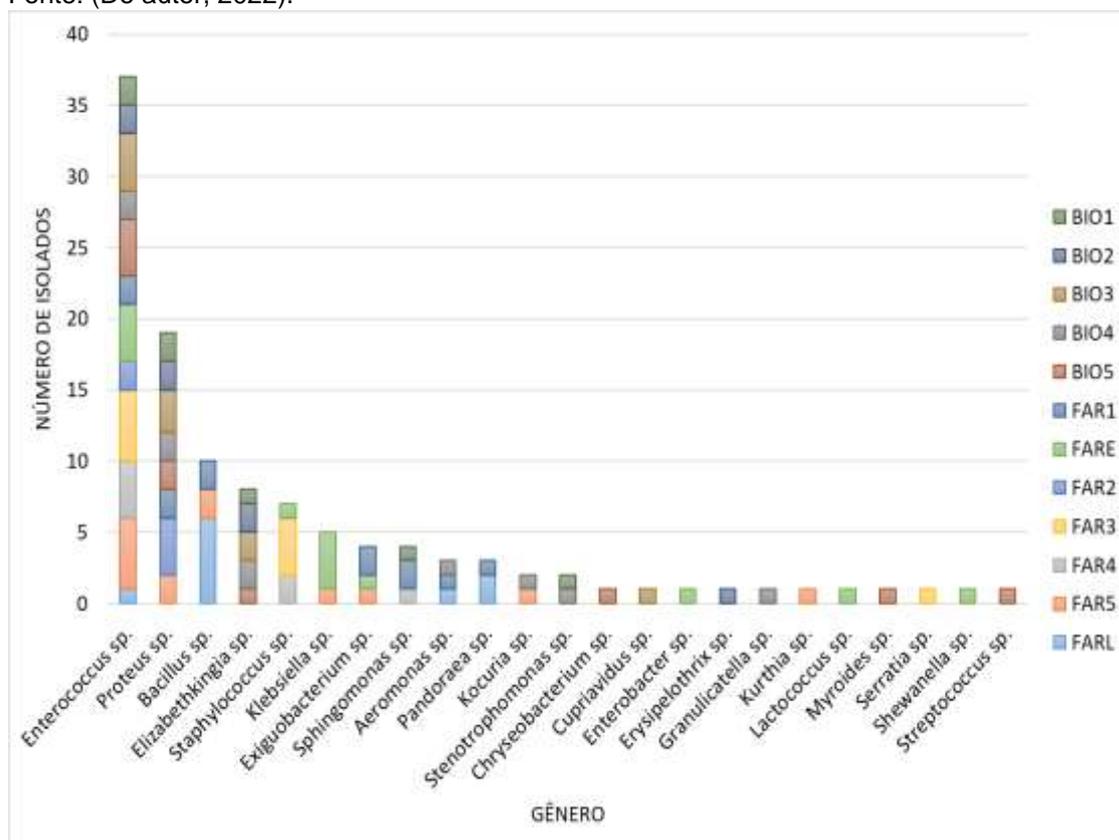
### 5.3 Isolamento, identificação E determinação dos perfis de susceptibilidade

Foram recuperados 70 isolados da ETEI de Farmanguinhos, sendo em maioria pertencentes ao gênero *Enterococcus* (n=23), seguido dos gêneros *Proteus* (n=8), *Staphylococcus* (n=7) e *Klebsiella* (n=5). Vale destacar que o gênero *Enterococcus* foi o único recuperado de todos os pontos de coleta.

Enquanto isso, foram recuperados 43 isolados da ETEI de Bio-manguinhos, sendo em maioria pertencentes ao gênero *Enterococcus* (n=13), seguido dos gêneros *Proteus* (n=11) e *Elizabethkingia* (n=8). Isolado dos três gêneros, foram recuperados em todos os pontos de coleta da ETEI (Figura 4).

Figura 4. Gêneros bacterianos recuperados relacionados ao local de isolamento.

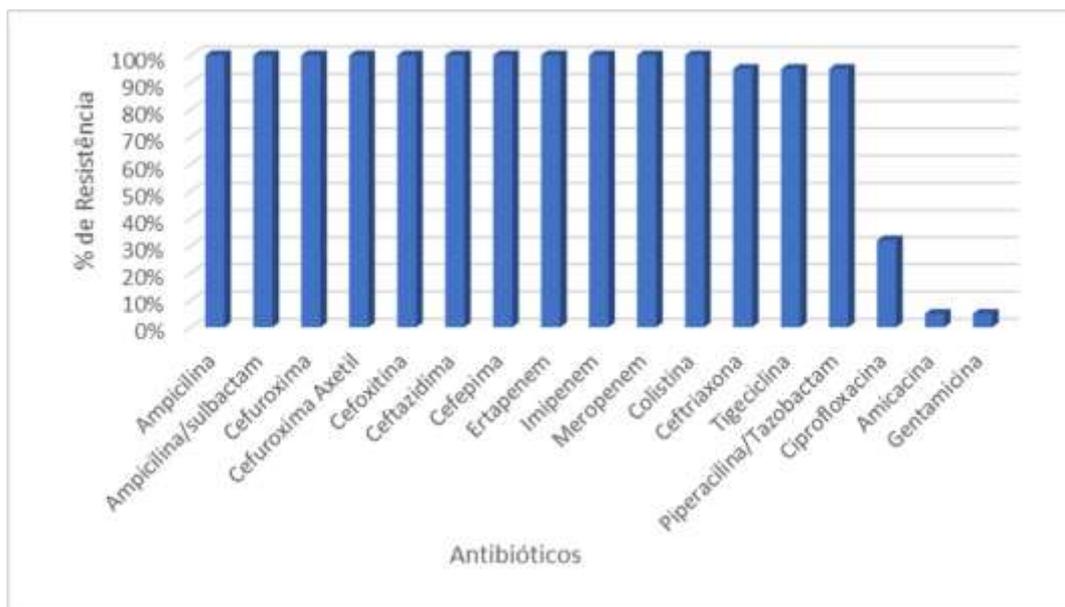
Fonte: (Do autor, 2022).



### 5.3.1 *Proteus* sp.

Os 19 isolados de *Proteus* sp. apresentaram 100% de resistência a 11 dos 17 antimicrobianos utilizados (Ampicilina, Ampicilina/sulbactam, Cefuroxima, Cefuroxima Axetil, Cefoxitina, Ceftazidima, Cefepima, Ertapenem, Imipenem, Meropenem e Colistina) seguido por Ceftriaxona, Tigeciclina e Piperacilina/Tazobactam (95% cada, 18/19); Ciprofloxacina (32%, 6/19) e Amicacina e Gentamicina (5% cada, 1/19) (Figura 5).

Figura 5. Perfil de resistência do gênero *Proteus* sp.



Fonte: (Do autor, 2022).

Os isolados do gênero *Proteus* apresentaram perfil de resistência MDR (11%), XDR (84%), e PDR (5%) (Figura 6).

Figura 6. Perfil de multirresistência do gênero *Proteus* sp.



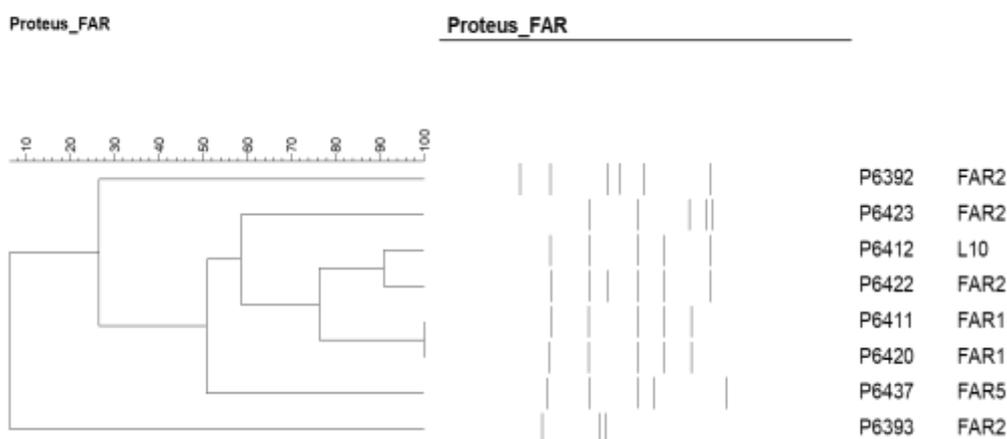
Fonte: (Do autor, 2022).

A avaliação da diversidade genética pela técnica da ERIC-PCR foi realizada somente nos isolados de *Proteus* sp. da ETEI de Farmanguinhos, onde se obteve isolados somente nos pontos da entrada de esgoto industrial (FAR1); entrada de esgoto sanitário (FAR2); Decantação (FARL); e saída (FAR5).

No nosso estudo, através da ERIC-PCR, verificou-se uma alta variabilidade genética entre os isolados, mostrando que, muito provavelmente, não há uma relação clonal entre eles. Os isolados P6411 e P6420 do ponto FAR1 que possui 100% de similaridade, sendo, portanto, do mesmo clone. Já os isolados P6412 e P6422 dos

pontos FARL e FAR2, respectivamente, apresentaram percentual de identidade acima de 90% de similaridade. Apesar desses dois últimos isolados possuírem similaridade de 90%, mostraram características distintas em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos, sendo um MDR e o outro PDR (Figura 7).

Figura 7. Diversidade dos isolados do gênero *Proteus* sp. ETEI Farmanguinhos



Fonte: (Do autor, 2022).

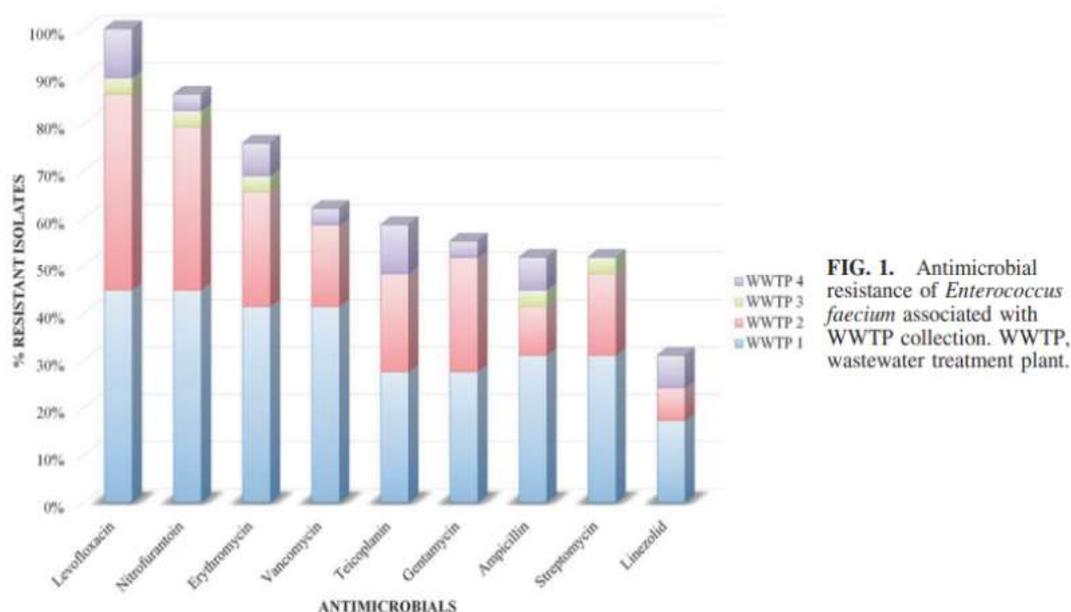
### 5.3.2 *Enterococcus* sp.

Dos 36 isolados de *Enterococcus* sp. das duas ETEIs, 25 foram identificados como *Enterococcus faecium* (Efm) que foram analisados juntamente com isolados de outras estações de tratamento de efluentes. Seus resultados foram publicados em artigo científico, onde foi realizada a análise genômica da multirresistência relacionada a presença do gene *vanA*.

Neste estudo Isolados Gram-positivos de 16 amostras (n = 67) foram identificados fenotipicamente por VITEK 2, resultando em 46 *Enterococcus* spp., dos quais 63% (29/46) foram identificados como *E. faecium*. Um total de 44,8% (13/29) dos isolados de Efm foram da **ETE 1**, 41,4% (12/29) da **ETE 2**, 3,4% (1/29) da ETE 3 e 10,4% (3/29) da ETE 4. Nenhum isolado de Efm foi recuperado da ETE 5. Entre os isolados recuperados, 41,4% (12/29) foram obtidos de efluentes tratados.

A suscetibilidade antimicrobiana do VITEK 2 verificou a resistência a 10 antimicrobianos de diferentes classes (Figura 8). Todos os isolados foram sensíveis à tigeciclina.

Figura 8. Resistencia aos antimicrobianos de *Enterococcus faecium* isolados ETEs.



(Fonte: Farias et al., 2022).

Observou-se que 86,2% (25/29) dos isolados foram classificados como perfil MDR, dois como XDR e dois como não MDR, sendo resistentes apenas à levofloxacina e nitrofurantoína.

Todos os isolados resistentes à vancomicina (n = 18) foram considerados para pesquisa do gene *vanA*. Destes isolados, 12 (66,7%) expressaram o fenótipo VanA (alto nível de resistência à vancomicina e teicoplanina) e eram da ETE 1 (8/12), ETE 2 (3/12) e ETE 4 (1/12). Não houve isolados de Efm resistente à vancomicina da ETE 3.

A PCR do gene *vanA* revelou oito cepas (27,5%; 8/29) portadoras deste gene. Dentre eles, cinco eram de efluente tratado: dois da ETE 1, dois da ETE 2 e um da ETE 4. Os outros três isolados da ETE 1 e ETE 2 foram recuperados em pontos intermediários durante o tratamento do efluente. Entre os isolados portadores do gene *vanA*, todos demonstraram perfil de resistência MDR e apenas metade deles (4/8) expressou o fenótipo *vanA*. Assim, os oito MDR-Efm portadores do gene *vanA* foram submetidos ao sequenciamento de genoma completo (Tabela 2 artigo).

Os genomas em isolados de Efm apresentaram baixo teor de C + G variando de 37,7% a 38%, e o comprimento médio dos genomas foi de 2,77 Mb, com 2.755 a 3.113 genes previstos.

A resistência aos glicopeptídeos foi representada pelo cluster de genes resistentes à vancomicina *vanHAX*, além de três isolados da ETE 1 também apresentarem *vanG*. Genes de resistência a aminoglicosídeos foram encontrados em todos os isolados. Cinco isolados apresentaram genes capazes de fornecer alto nível de resistência a aminoglicosídeos, como *aph(3')-IIIa* e *ant(6')-Ia*. O gene de resistência a macrolídeos *erm(B)* foi encontrado em cinco isolados, três dos quais em plasmídeos.

Bomba de efluxo de macrolídeos, como *msrC*, foi encontrada em todos os isolados, assim como *efrA* e *efrB*, que codificam duas subunidades da bomba de efluxo EfrAB, também relacionadas à resistência a drogas. Além disso, *IsaA* esteve presente em todas os isolados. Ele codifica uma bomba de efluxo ABC e confere resistência à clindamicina, quinupristina/dalfopristina e dalfopristina.

O gene *tet(M)* foi encontrado em três isolados e *tet(L)* em dois isolados, conferindo resistência às tetraciclinas. Mutações cromossômicas nos genes *gyrA* e *parC* foram detectadas em um isolado da ETE 4, atribuindo o fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico e ciprofloxacina. Mutações em *pbp5* estiveram presentes em todos os isolados, sendo possível conferir resistência à ampicilina. Todos os isolados carregavam o gene correspondente à adesão fator *efaAfm*. No entanto, sete isolados apresentaram outro fator de adesão (*acm*). O gene *hylEfm* estava presente em uma cepa da ETE4 (Dados não mostrados). De acordo com as análises do PathogenFinder, sete isolados foram previstos como patógenos humanos com probabilidade variando de 0,582 a 0,869, indicando a presença de proteínas patogênicas, e um isolado da ETE 2 não foi previsto como patógeno com probabilidade de 0,489 (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil de resistência, virulência e patogenicidade de *Enterococcus faecium* carreando o gene *vanA*.

Strains	WWTP	MIC		Antimicrobial resistance genes							Virulence genes			Probability of being a human pathogen
		VAN	TEI	Aminoglycoside	Macrolide	Tetracycline	$\beta$ -lactam	Fluoroquinolone	Multidrug resistance	<i>acm</i>	<i>efaA/efn</i>	<i>hylEfn</i>		
P6398	1	8	<0.5	AAC(6')-II, APH(3')-IIIa*, ANI(6)-Ia*	<i>msrC, efmA, erm(B)</i>	<i>tet(M), tet(L)*</i>	<i>pbp5</i>	—	<i>efrA, efrB</i>	+	+	—	0.856	
P6406	1	>32	>32	AAC(6')-II, ANI(6)-Ia, ANI(9)-Ia*	<i>msrC, efmA, erm(B)*</i>	<i>tet(M), tet(L)*</i>	<i>pbp5</i>	—	<i>efrA, efrB</i>	—	+	—	0.582	
P6407	1	>32	>32	AAC(6')-II, APH(3')-IIIa, ANI(6)-Ia*, ANI(9)-Ia*	<i>msrC, efmA, erm(B)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>pbp5</i>	—	<i>efrA, efrB</i>	+	+	—	0.748	
P6727	2	8	>32	AAC(6')-II	<i>msrC, efmA</i>	—	<i>pbp5</i>	—	<i>isaA, efrA, efrB</i>	+	+	—	0.869	
P6739	2	ND	<0.5	AAC(6')-II, ANI(6)-Ia*, ANI(9)-Ia*	<i>msrC, efmA, erm(B)*</i>	—	<i>pbp5</i>	—	<i>isaA, efrA, efrB</i>	+	+	—	0.489	
P6745	2	8	>32	AAC(6')-II	<i>msrC, efmA</i>	—	<i>pbp5</i>	—	<i>isaA, efrA, efrB</i>	+	+	—	0.869	
P6756	2	8	<0.5	AAC(6')-II	<i>msrC, efmA</i>	—	<i>pbp5</i>	—	<i>isaA, efrA, efrB</i>	+	+	—	0.869	
P6875	4	ND	>32	AAC(6')-II, APH(3')-IIIa, nod(6)	<i>msrC, efmA, erm(B)*</i>	—	<i>pbp5</i>	<i>gyrA, parC</i>	<i>isaA, efrA, efrB</i>	+	+	+	0.799	

\*Genes found in plasmids.

MIC; ND, not determined; TEI, teicoplanin; VAN, vancomycin.

(Fonte: Farias et al., 2022).

As áreas conservadas dos plasmídeos rep foram reveladas em todos os isolados, com 11 plasmídeos diferentes, dentre os quais rep2 [orf1 (pRE25)] foi o mais presente em seis cepas, seguido por repUS15 [repA (pNB2354p1)] que esteve presente em cinco isolados. Os plasmídeos rep1 [repE (pIP816)] e rep1 [repE (pAMbeta)] estavam presentes em quatro isolados. Em menor grau, repUS43 [CDS12738 (DOp1)] foi encontrado em dois isolados, assim como rep17 [CDS29 (pRUM)] e rep1 [repE (pKL0018)]. Além disso, outros plasmídeos foram encontrados em apenas um isolado: repUS12 [rep (pUB110)], rep11c [repA (pJS33)], rep14a [CDS2 (pEFNP1)] e rep18brepA (pEF418). O isolado P6398, da ETE 1, apresentou o maior número de plasmídeos (n = 8), seguido por três isolados (P6407, P6739 e P6875) que apresentaram cinco plasmídeos.

As sequências de inserção (ISs) encontradas nos isolados foram predominantemente das famílias IS3, IS6, IS30, IS200/IS605, IS256, IS982 e ISL3. Houve um isolado da ETE 2 que não apresentou nenhuma ISs.

A análise MLST de oito isolados portadores do gene *vanA* revelou um novo alelo e cinco STs diferentes, três previamente descritos (ST32, ST168 e ST253) e dois novos (ST1893 e ST1894). O novo alelo “*gyd*” também foi descrito em um novo ST. Vale destacar que todos os STs pertencem ao CC17, com exceção de dois. Outros STs não foram atribuídos a nenhum complexo clonal de acordo com o banco de dados PubMLST (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil do MLST dos Efm carreando o gene vanA.

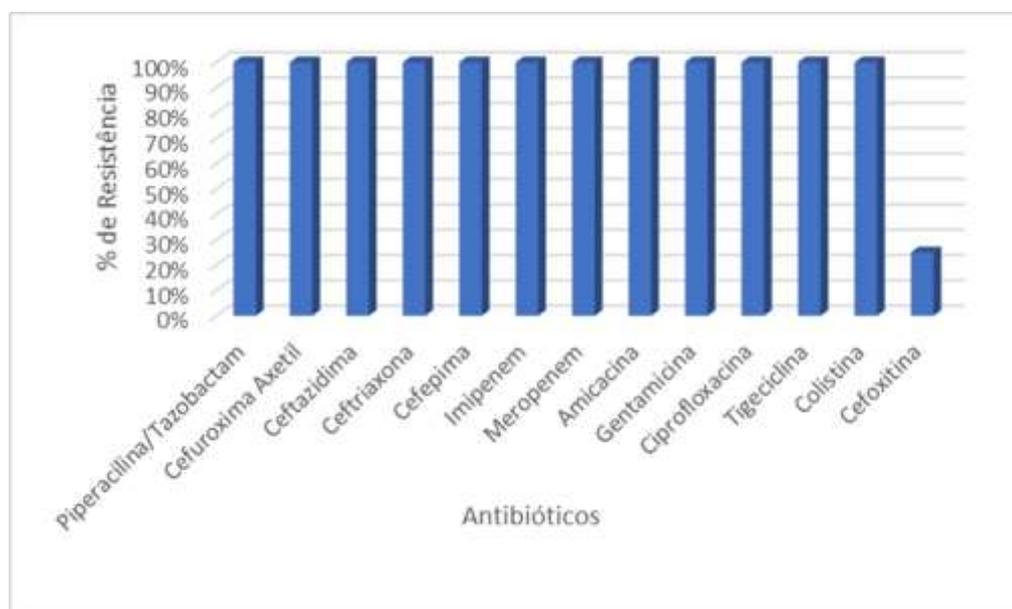
Strains	MLST allele genes							ST	CC
	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>		
P6398	14	5	1	1	1	1	1	168	17
P6407	14	5	1	1	1	1	1	168	
P6727	3	3	1	2	1	1	1	32	
P6745	3	3	1	2	1	1	1	32	
P6756	3	3	1	2	1	1	1	32	
P6875	9	2	1	44	1	1	1	1,893	ND
P6406	3	7	3	35	1	1	1	253	
P6739	35	3	25	2	78	1	1	1,894	

Light gray represents the two news STs described; Dark gray represents the new allele described.  
CC, clonal complex; ND, not defined; ST, sequence type.

(Fonte: Farias et al., 2022).

### 5.3.3 *Elizabethkingia* spp.

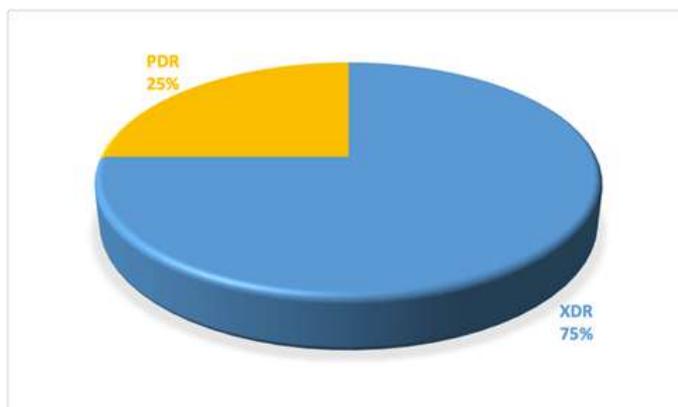
Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados do gênero *Elizabethkingia* spp. (n=8) apresentaram 100% de resistência a 12 dos 13 antimicrobianos utilizados (Piperacilina/Tazobactam, Cefuroxima Axetil, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefepima, Imipenem, Meropenem, Amicacina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Tigeciclina e Colistina), seguido da Cefoxidina (25%, 2/8) (Figura 9).

Figura 9. Perfil de resistência do gênero *Elizabethkingia* sp.

Fonte: (Do autor, 2022).

Os isolados do gênero *Elizabethkingia* sp. foram classificados como XDR (75%) e PDR (25%) (Figura 10).

Figura 10. Perfil de multirresistência do gênero *Elizabethkingia* sp.



Fonte: (Do autor, 2022).

Os 8 isolados de *Elizabethkingia* sp da ETEI de Biomanguinhos foram selecionados para a realização do sequenciamento de genoma completo. São isolados que foram recuperados ao longo de todo o tratamento do efluente.

Ao analisarmos o genoma desses 8 isolados, foi verificado que 4 deles são bem distintos entre eles e em relação ao que está descrito na literatura. Portanto, os deixamos para melhor estudá-los o mais breve possível. Os outros 4 isolados foram identificados com *Elizabethkingia anophelis* (*E. anophelis*) e as suas análises estão na forma de artigo científico que está sendo redigido para submissão.

Ao longo das etapas da ETE foram recuperados quatro isolados de *Elizabethkingia* sp. A análise do gene 16S rRNA em comparação com cepas publicamente disponíveis de *E. meningoseptica*, *E. occulta*, *E. bruuniana*, *E. ursingii*, *E. argenteiflava* e *E. miricola* mostrou uma identificação clara dos quatro isolados como *E. anophelis* (Figura 11).



Tabela 6. A concentração inibitória mínima e suscetibilidade aos antimicrobianos de *E. anophelis* neste estudo.

Antimicrobianos	MIC (mg/mL)			
	P6730	P6732	P6738	P6744
Piperacilina/Tazobactam	>=128	>=128	>=128	>=128
Cefuroxima Axetil	>=64	>=64	>=64	>=64
Cefoxitina	<=4	8 l	<=4	<=4
Ceftazidima	>=64	>=64	>=64	>=64
Ceftriaxona	>=64	>=64	>=64	>=64
Cefepime	>=64	>=64	>=64	>=64
Impeneem	>=16	>=16	>=16	>=16
Meropenem	>=16	>=16	>=16	>=16
Amicacina	>=64	>=64	>=64	>=64
Gentamicina	>=16	>=16	>=16	>=16
Ciprofloxacina	>=4	>=4	>=4	>=4
Tigecyclina	4	>=8	4	4

Fonte: (Do autor, 2022).

Na análise de resistoma todos os nossos isolados compartilharam o mesmo perfil genético de resistência antimicrobiana, apresentando os genes *abeS*, *ranA*, *ranB*, *aadS*, *catB11*, *GOB-48*, *GOB-4*, *BlaB-3*, *BlaB-33*, *CME-1*, *Tet(X6)* (Tabela 7). Vários genes de carbapenemase e genes de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) foram encontrados em todos os nossos isolados. O gene *catB11*, que codifica uma O-acetiltransferase que confere resistência ao cloranfenicol, foi detectado em todos os nossos isolados.

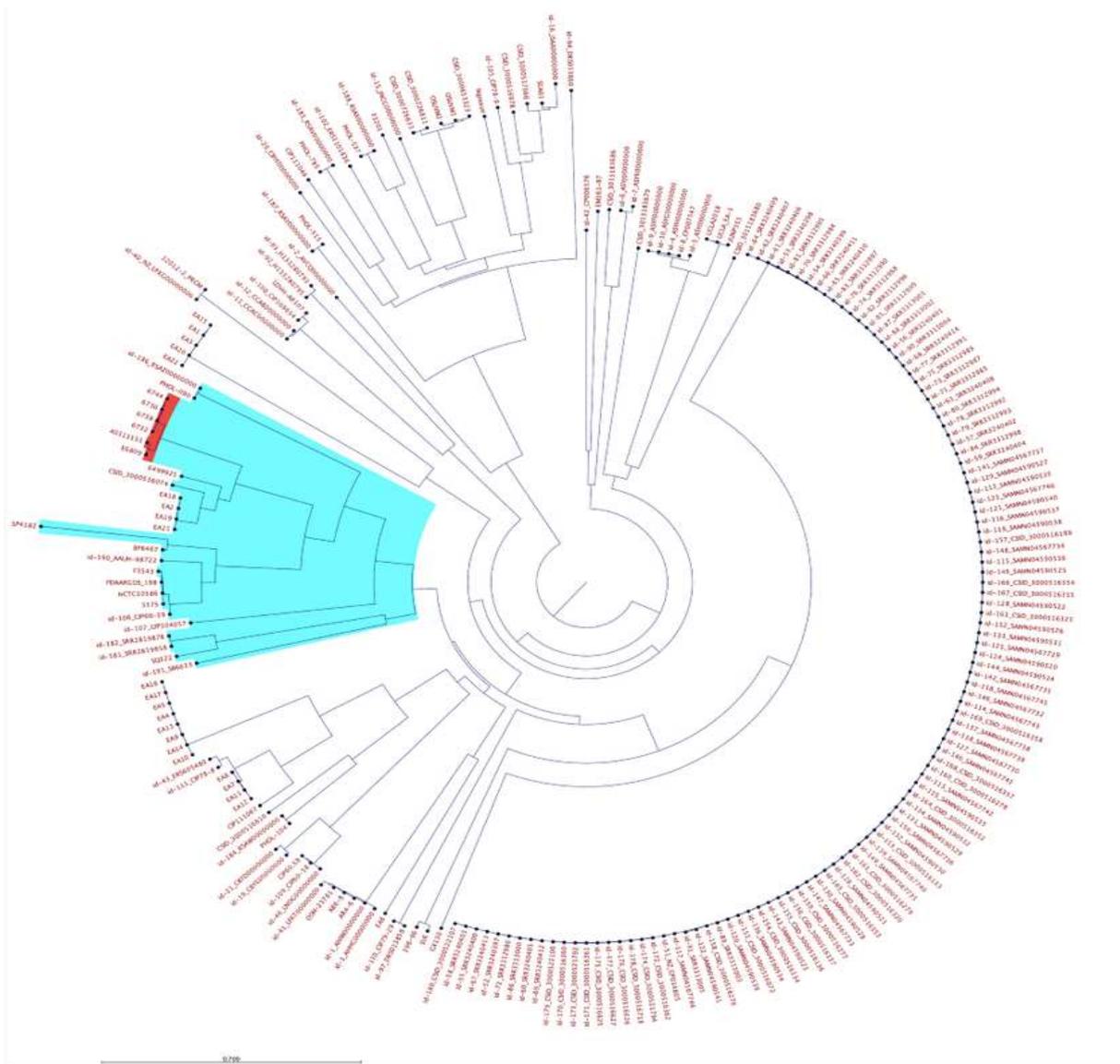
Tabela 7. Os genes de resistência previstos nos genomas de quatro isolados de *E. anophelis* neste estudo.

Categoria de antimicrobianos	Determinante da resistência antimicrobiana				Mecanismo de resistência antimicrobiana
	P6730	P6732	P6738	P6744	
Agentes múltiplos	<i>abeS</i>	<i>abeS</i>	<i>abeS</i>	<i>abeS</i>	Efluxo de antibiótico
	<i>RanA</i>	<i>RanA</i>	<i>RanA</i>	<i>RanA</i>	
	<i>RanB</i>	<i>RanB</i>	<i>RanB</i>	<i>RanB</i>	
Aminoglicosídeos	<i>aadS</i>	<i>aadS</i>	<i>aadS</i>	<i>aadS</i>	
Fenicol	<i>catB11</i>	<i>catB11</i>	<i>catB11</i>	<i>catB11</i>	
β-lactâmicos	<i>GOB-48</i>	<i>GOB-48</i>	<i>GOB-48</i>	<i>GOB-48</i>	Inativação de antibiótico
	<i>GOB-4</i>	<i>GOB-4</i>	<i>GOB-4</i>	<i>GOB-4</i>	
	<i>BlaB-3</i>	<i>BlaB-3</i>	<i>BlaB-3</i>	<i>BlaB-3</i>	
	<i>BlaB-33</i>	<i>BlaB-33</i>	<i>BlaB-33</i>	<i>BlaB-33</i>	
	<i>CME-1</i>	<i>CME-1</i>	<i>CME-1</i>	<i>CME-1</i>	
Tetraciclina	<i>Tet(X6)</i>	<i>Tet(X6)</i>	-	-	
Isoniazida	<i>katG</i>	<i>katG</i>	<i>katG</i>	<i>katG</i>	Alteração do alvo antibiótico

Fonte: (Do autor, 2022).

Foi construída uma árvore filogenômica onde se observa que todos os nossos isolados identificados como da *E. anophelis* se agrupam em um único clado com alta similaridade com cepas de origem clínica (E6809 e 40313151), que estão inseridas na sublinhagem 11. Esse clado deriva de um outro, onde, também, se encontram cepas de origem clínica (6499925, CNS\_3000516074), que por sua vez, tem como ancestral comum isolados do mosquito *Anopheles* (EA18, EA2, EA19 e EA21) (Figura 12).

Figura 12: Árvore filogenômica da análise dos genomas disponíveis nos bancos de dados e dos isolados deste estudo. Azul: Sublinhagem 11; Vermelho: Linhagens descritas neste estudo e com similaridade de mais de 95% do genoma.



Fonte: (Do autor, 2022).

## 6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a detecção de micropoluentes emergentes ou poluentes emergentes no meio aquático tornou-se uma questão mundial de crescente preocupação ambiental. Micropoluentes não são necessariamente novas substâncias, são aquelas que há muito tempo estão presentes no meio ambiente, como medicamentos, produtos de uso veterinário, produtos de higiene, agrotóxicos, incluindo microrganismos resistentes. Sendo sua presença e significância só agora elucidadas através dos novos avanços tecnológicos sobre seus reais e potenciais impactos à saúde humana e ambiental. E, também, são compostos que ainda não tem uma legislação específica que regule a sua presença nos recursos hídricos, que é o caso dos fármacos como os antimicrobianos e hormônios (KUMMERER, 2009; LOCATELLI E JARDIM, 2011; MONTEIRO et al., 2016; BRANCO et al., 2021).

Segundo Luo et al. (2014) as águas residuais das estações de tratamento de efluentes (ETEs) têm sido identificados como as principais fontes de disseminação de micropoluentes emergentes (produtos de higiene pessoal, agrotóxico, químicos industriais, fármacos como os antimicrobianos, dentre outros) no ambiente aquático. As ETEs, normalmente de tratamento secundário, são projetadas para remover contaminantes convencionais tais como sólidos e matéria orgânica biodegradável, e não para remover micropoluentes emergentes (BILGEHAN et al., 2017).

A grande preocupação mundial está em torno do grupo dos antimicrobianos, que é a maior categoria de fármacos fornecida pela medicina humana e veterinária, com propósitos terapêuticos e/ou como promotores de crescimento, por serem consumidas em altas quantidades e pelo seu potencial de causar o surgimento de resistência bacteriana em contato com estas águas contaminadas, além do efeito tóxico aos organismos aquáticos (ANDRIEU et al., 2015; GALLER et al., 2018; MARTINS et al., 2019)

No nosso estudo não foram encontrados resíduos dos antimicrobianos pesquisados em nível igual ou maior do que os limites de detecção ( $LD=25 \text{ ng/L}^{-1}$ ) na ETEI de Farmanguinhos. Já nas amostras coletadas na ETEI de Bio-manguinhos foram detectados traços de claritromicina (macrolídeo) e amoxicilina (beta-lactâmico), com valores acima de 100 ng/L de azitromicina (macrolídeo).

Estudos conduzidos por GROS et al., 2010 e Luo et al., 2014 indicaram que os antimicrobianos avaliados como os da classe dos macrolídeos (eritromicina),

sulfonamidas (sulfadiazina), fluoroquinolonas (norfloxacina) apresentaram pouca ou nenhuma remoção nas ETEs secundárias consideradas convencionais (lodo ativado). Já uma outra pesquisa conduzida por Deschamps et al., 2012, revelou que mesmo utilizando duas rotas de tratamento (uma segrega o efluente gerado na linha de produção de antimicrobianos dos demais e o trata em lotes através da hidrólise do anel beta-lactâmico, alterando abruptamente seu pH passando de 3,5 para valores entre 9 e 12, após este tratamento, o pH é ajustado para pH 7,0 a 8,5, e assim lançado direto no rio; enquanto que a segunda não segrega os efluentes e os trata continuamente) adotada por duas empresas farmacêuticas de Minas Gerais não foi suficientemente eficaz, uma vez que resíduos de antimicrobianos foram detectados após o tratamento. Vale ressaltar que fatores externos (relacionados ao pH, temperatura, condições de tratamento e mistura de micropoluentes) e internos (hidrofobicidade, biodegradabilidade e volatilidade, por exemplo) determinam a conformação final dos micropoluentes nas ETEs (SARAIVA SOARES E LEÃO, 2015). Por se tratar de uma ETEI, esses estudos citados anteriormente corroboram com nossos resultados.

Neste estudo também foi detectado metais “pesados” nas ETEIs como esperado, pois a grande maioria dos metais que causam poluição ambiental são derivados, principalmente, dos efluentes industriais (VIJAYARAGHAVAN E YUN, 2008). Nas amostras de efluentes da ETEI de Farmanguinhos, o As foi o único metal encontrado apenas nos pontos FAR1 (entrada de esgoto industrial) e FAR2 (entrada de esgoto sanitário). Vale destacar que o As não existe naturalmente em nenhum organismo, sendo sua presença prejudicial em qualquer concentração (CESÁRIO SILVA et al., 2001; SOARES, 2004). Já nas amostras de efluentes da ETEI de Bio-manguinhos, o Fe e o Mg foram os metais que apresentaram concentrações mais altas em todos os pontos, respectivamente. Apesar do Fe e Mg serem micronutrientes essenciais às reações bioquímicas dos microrganismos são identificados também como tóxicos em concentrações poucas vezes superiores às requeridas para o metabolismo. Os níveis de toxicidade de cada metal variam de acordo com a espécie de organismo, a natureza do metal e o pH (BALDRIAN, 2003; VALIX E LOON, 2003; GADD E FOMINA, 2011; KUMAR et al., 2013).

A presença de metais pesados no ambiente representa um risco à longo prazo, pois apresenta uma tendência à bioacumulação e não são biodegradáveis, permanecendo ao longo do tempo nos diversos níveis tróficos (KOBAYA et al., 2008;

HEC DA SILVA, 2011). Além disso, ambientes contendo metal exercem pressões seletivas, que eventualmente, levam à expressão de mecanismos de resistência a praticamente a todos os metais pesados, além da co-resistência e resistência cruzada (SUNDAR et al., 2011; CHAPMAN, 2003; PAL et al., 2017).

As ETEs são compostas principalmente por bactérias fecais, permitindo o monitoramento de vigilância da microbiota fecal de grandes populações, além de ser consideradas ambientes ideais para investigar a dinâmica da resistência antimicrobiana (SANDERSON et al., 2020; ZAHEER et al., 2020).

Neste estudo foram recuperados 113 isolados multidroga resistentes nos diferentes pontos das ETEs. Os gêneros com maior representatividade foram: *Proteus* (n=19), seguido dos *Enterococcus* (n=36) e *Elizabethkingia* (n=8). Todos com grande importância clínica.

### 6.1 *Proteus* sp.

As bactérias do gênero *Proteus* sp. são bastonetes Gram-negativos pertencentes à ordem *Enterobacterales* e à família *Morganellaceae*. Essas espécies fazem parte da flora bacteriana normal do trato intestinal de humanos e animais, sendo também disseminadas no meio ambiente como solo e água, onde sua presença é considerada resultante de contaminação fecal (O'Hara et al., 2000; GIRLICH et al., 2020).

Neste estudo 19 isolados de *Proteus* sp. mostraram alta resistência aos antimicrobianos testados que incluem: penicilinas, cefalosporinas (de 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, e 4<sup>a</sup> geração), carbapenêmicos, polimixina e glicilciclina. Apenas 6 dos isolados apresentaram resistência a fluoroquinolona, e 1 isolado a aminoglicosídeos. Algumas espécies como *P. mirabilis* e *P. vulgaris* apresentam resistência intrínseca a algumas classes de antimicrobianos como polimixina (colistina), nitrofuranos, tigeciclina e tetraciclina (ESTOQUE, 2003). Mas, geralmente, *Proteus* spp. apresentam susceptibilidade a fluoroquinolonas. No entanto, cepas resistentes a antimicrobianos são cada vez mais relatadas, o que complica o tratamento de infecções causadas por este microrganismo (GIRLICH et al., 2020). Atualmente, os isolados *Proteus mirabilis* vêm sendo descritos carreando múltiplos genes de resistência, mediados principalmente por plasmídeos, como por exemplo bla<sub>TEM</sub> (DE CHAMPS et al., 2000), cefalosporinases adquiridas (BIDET et al., 2005), e

carbapenemases (GIRLICH et al., 2015). Em um estudo realizado em águas residuais de indústrias farmacêuticas foram isoladas 254 bactérias sendo, dentre a grande maioria, identificada como *P. mirabilis*. Nesse estudo 85,8% dos isolados eram multidroga resistentes, corroborando com os nossos resultados. Além disso, alguns isolados bacterianos abrigavam os genes *Sul1*, *Sul2* e *Int1*, que conferem resistência a sulfonamida e compõem o *integron* de classe 1, relacionado a multirresistência, respectivamente (OBAYIUWANA et al., 2018). Sendo assim, efluentes industriais de um modo geral podem ser considerados potenciais reservatórios de BRA e GRA.

## 6.2 *Enterococcus* sp.

Os *Enterococcus* são microrganismos comensais da microbiota humana e animal, sendo excretados nas fezes e na urina. Esses resíduos, em sua maioria, são transportados e tratados em ETEs antes de serem lançados em águas superficiais (SANDERSON et al., 2020). Gouliouris et al., 2019 descrevem a associação de linhagens de Efm resistente à vancomicina circulante em hospitais, também presentes em efluentes, como exemplo.

Nossos resultados revelaram que de 18 isolados de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), 12 tinham o fenótipo *vanA*, mas apenas 8 apresentavam o gene *vanA*. Isso pode estar relacionado a outros genes de resistência à vancomicina, como *vanM*, que compartilham o mesmo fenótipo (AHMED E BAPTITE, 2018; SABENÇA et al., 2020). Além disso, pode ser possível que, uma vez que os genes de resistência não sejam expressos, a suscetibilidade aos antimicrobianos esteja frequentemente relacionada ao metabolismo bacteriano e aos reguladores metabólicos que modulam esse fenótipo (CORONA E MARTINEZ, 2013). Vale ressaltar que esses oito isolados foram recuperados de efluentes, o que é preocupante, pois são descartados em ambientes aquáticos, cinco desses oito isolados foram recuperados de efluentes tratados, o que é preocupante, pois são descartados em ambientes aquáticos.

Considerando a importância de Efm vancomicina resistente abrigar o cluster *vanHAX*, o determinante de resistência a glicopeptídeos mais prevalente em ambientes clínicos e associado a muitas falhas no tratamento do VRE, o foco do nosso estudo foi obter o sequenciamento de genoma completo desses isolados. Espera-se que a presença do cluster do gene *vanHAX* em nossos oito genomas analisados esteja relacionado ao Tn1546, frequentemente associado à resistência à vancomicina

entre os enterococos (FREITAS et al., 2013). É frequentemente carregado por plasmídeos, sendo responsável por sua disseminação (FOUCAULT, et al., 2010).

Plasmídeos descritos como possíveis portadores de resistência a *vanA*, como repUS15 repA (pNB2354p1) e rep17 [CDS29 (pRUM)], também foram observados em alguns desses isolados analisados em nosso estudo, tornando-se importantes contribuintes para a disseminação da resistência a glicopeptídeos (FREITAS et al., 2013; CLEWELL et al., 2014; ROSVOLL et al., 2010). Além disso, sete de nossos isolados de efluentes industriais apresentaram o gene *tcrB*, que confere resistência ao cobre. O plasmídeo portador de *tcrB* também mostrou carregar genes de resistência a macrolídeos [*erm(B)*] e glicopeptídeos (*vanA*) e pode contribuir para a co-seleção de bactérias resistentes à vancomicina e eritromicina (CAPPS et al., 2020; HASMAN et al., 2006).

O gene *erm(B)* foi encontrado em cinco de nossos isolados, inclusive em plasmídeos. A resistência aos macrolídeos em enterococos está mais frequentemente associada a uma modificação do alvo ribossômico por 23S rRNA metilases codificadas pelos genes da metilase resistente à eritromicina (*erm*), proporcionando resistência cruzada ao grupo de antimicrobianos macrolídeos, lincosamida e estreptogramina (MLS) (PORTILLO et al., 2000; ZALIPOUR et al., 2019). A disseminação do gene *erm* pertencente à classe *erm(B)* é responsável pela maior parte da resistência causada pela metilação ribossômica em enterococos (LECLERCQ, 2002).

Além disso, a presença de Tn1546 com o gene *vanA* além de *ermB*, como ocorreu em alguns isolados do nosso estudo, já foi associada a este gene de resistência a macrolídeos em *Staphylococcus aureus*, possivelmente originado de *Efm* (WAN et al., 2016), sinalizando a transferência e disseminação de genes de resistência a antimicrobianos entre bactérias. Outro mecanismo de resistência a macrolídeos conferido pelo gene *msrC* e esperado para *Efm* esteve presente em todos os nossos isolados. Esse gene codifica uma bomba de efluxo que é uma proteína da subfamília cromossômica ABC-F que confere resistência à eritromicina e outros macrolídeos, bem como aos antimicrobianos estreptogramina B (Ekwanzala et al., 2020; BEUKERS et al., 2017).

No presente estudo, o gene *aph(3')-IIIa*, encontrado em três dos oito isolados, codifica a enzima aminoglicosídeo fosfotransferase APH(3')-IIIa, conferindo alta resistência à estreptomicina e canamicina em enterococos. O gene *ant(6')-Ia* também

foi encontrado em nossos isolados e está associado à níveis elevados de resistência ao aminoglicosídeo (HLA) (LI, et al., 2015). Já se sabe que os enterococos são intrinsecamente resistentes aos aminoglicosídeos de baixo nível e a presença do *aac(6')-II* em todos os nossos isolados não é surpreendente, uma vez que *E. faecium* produz uma 6'-N-aminoglicosídeo acetiltransferase cromossomicamente codificada (COSTA et al., 1993; GARCÍA-SOLACHE E RICE, 2019).

No entanto, atualmente o HLA mediado pela aquisição de genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos está se tornando mais frequente. Além disso, nossos resultados indicam que alguns desses genes de resistência a aminoglicosídeos foram encontrados em plasmídeos. É relevante destacar que elementos genéticos móveis, como rep2 [orf1 (pRE25)], rep18b [repA (pEF418)] e repUS15 [repA (pNB2354p1)], encontrados em nosso estudo, são descritos como importantes determinantes para a transferência horizontal de resistência antimicrobiana em enterococos (Ekwanzala et al., 2019; CLEWELL et al., 2014; DELPECH et al., 2019).

Três dos nossos oito isolados apresentaram o gene *tet(M)* que atua através da ligação das proteínas de proteção ribossomal (JIA E WANG, 2014). O gene *tet(M)* é amplamente distribuído entre as bactérias e isso provavelmente se deve à associação do gene com elementos conjugativos (AGERSØ et al., 2014). Além disso, tem sido um dos genes de resistência à tetraciclina mais estudados em bactérias gram-positivas e o mais prevalente em enterococos (SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2013). Dois de nossos isolados também apresentaram o gene *tet(L)*, que confere resistência através da mecanismos de bomba de efluentes (Tatsing Foka E Ateba, 2019).

A mutação encontrada em *gyrA* e *parC* presente em um de nossos isolados já foi relatada em Efm e confere resistência à ciprofloxacina (GARCÍA-SOLACHE E RICE, 2019; EL AMIN E WRETLIND, 1999; BRISSE et al., 1999). Entretanto, é importante ressaltar que *efrA* e *efrB* também foram encontrados neste isolado e naqueles genes codificam subunidades de EfrAB, que é uma bomba de efluxo de múltiplas drogas que contribui para a extrusão de fluoroquinolonas em enterococos (MONTEALEGRE et al., 2017; LEIMANIS et al., 2006.). Vale ressaltar também que o gene *pbp5* demonstrou ser transferível como parte de grandes regiões cromossômicas e sua transferência horizontal pode ser relevante para que cepas clínicas adquiram resistência a beta-lactâmicos (GARCÍA-SOLACHE E RICE, 2019).

No presente estudo, foi demonstrada a presença de genes de virulência em enterococos multirresistentes. O gene *efaAfm* esteve presente em todos os nossos isolados, sendo responsável pela codificação das adesinas da parede celular. Há muitos relatos de *efaAfm* em amostras clínicas ambientais, animais e humanas (ZAHEER et al. 2020; ISEPPI et al., 2020; SOHEILI et al., 2014; TREMBLAY et al., 2013). Assim como o gene *efaAfm*, o gene *acm* também está envolvido na adesão de Efm e foi encontrado em todos os genomas isolados analisados, exceto um. Ambos os genes *acm* e *efaAfm* foram relatados em isolados clínicos no Brasil (DA SILVA et al., 2012; Marchi et al., 2018). Esses genes provavelmente desempenham um papel na adaptação de enterococos tanto no trato digestivo humano quanto em ETEs, tornando-se genes ubíquos (Casadevall E Pirofski. 2001). O gene *hylEfm*, encontrado em um de nossos isolados, codifica um glicosídeo hidrolase, que parece facilitar a colonização intestinal e a invasão peritoneal. Esse fator de virulência, no entanto, apresenta uma perspectiva preocupante, uma vez que foi documentado um aumento no número de cepas Efm do complexo clonal (CC) 17 portadoras do gene *hylEfm* em hospitais de diferentes países (ARIAS et al., 2009; FREITAS et al., 2010). O aumento da resistência antimicrobiana está frequentemente associado à diminuição da virulência, embora isso possa variar de acordo com os gêneros e espécies bacterianas (BECEIRO E BOU, 2013).

Os enterococos são comumente considerados microrganismos de baixa virulência e muitos determinantes da virulência da Efm ainda são desconhecidos, embora possam contribuir para aumentar a capacidade da Efm de causar infecção (BILLSTROM et al., 2008; STRATEVA et al., 2016). Em nosso estudo, das oito cepas de Efm analisadas, seis pertencem a CC17. Esses dados são relevantes porque a maioria dos isolados multirresistentes de Efm associados a surtos hospitalares pertencem a CC17 (SPARO et al., 2018; Galloway-peña et al., 2009). Entretanto, no meio ambiente, águas residuais também têm sido frequentemente relatadas como reservatório de CC17 Efm1. Nesse sentido, Leclercq et al., 2013 relataram em seu estudo a associação entre Efm pertencente ao CC17 de um centro médico e sua respectiva ETE, demonstrando que não houve diferenças significativas nas proporções de Efm entre o afluente e o efluente e, portanto, o esgoto tratamento não resulta na remoção específica de Efm. Além disso, o estudo de Freitas et al., 2011 descreve o compartilhamento de clones CC17 entre animais e humanos, revelando a

importância de rotas alternativas para a disseminação de bactérias comensais e oportunistas.

No Brasil, dados sobre Efm em águas residuais e seu potencial de disseminação de resistência antimicrobiana em ambientes aquáticos são escassos, uma vez que estudos relacionados a esta espécie são mais direcionados a amostras clínicas e alimentares (Sacramento et al., 2017; Rosa et al., 2014; Camargo et al., 2014) Até onde sabemos, não há estudos genômicos de *vanA*-Efm recuperados de ETEs revelaram a presença de isolados pertencentes a CC17 no Brasil. Considerando que este CC está associado a linhagens hospitalares amplamente disseminadas e responsáveis por infecções humanas, nossos dados apontam para a disseminação ambiental de Efm carregando múltiplos genes de resistência, como genes de resistência à vancomicina e HLA. De fato, alguns desses isolados estavam presentes em águas residuais tratadas.

### 6.3 *Elizabethkingia* sp.

O gênero *Elizabethkingia* é composto por bactérias Gram-negativas, aeróbias e não móveis, pertencentes à família Flavobacteriaceae. Suas espécies são consideradas onipresentes na natureza, mas muito pouco se sabe sobre as vias de sua transmissão para humanos (NIELSEN et al., 2018; LIN et al., 2019). Alguns membros deste gênero são considerados patógenos oportunistas sendo capazes de causar infecções graves em humanos, principalmente em neonatos e pacientes imunocomprometidos (REED et al., 2020). Atualmente, três espécies são conhecidas por causar infecções humanas, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Elizabethkingia miricola* e *Elizabethkingia anophelis*.

As infecções causadas por *Elizabethkingia* estão associadas a altas taxas de mortalidade, provavelmente devido ao fenótipo de resistência aos antimicrobianos expresso por esses microrganismos (HAN et al., 2016). Fluoroquinolonas, sulfametoxazol-trimetoprim e piperacilina-tazobactam (TZP) foram administrados como terapia de primeira linha para esta infecção (TENG et al., 2021; LAU et al., 2016). A terapia empírica usando TZP em combinação com quinolonas, rifampicina ou minociclina é recomendada, enquanto a vancomicina tem sido usada em infecções graves, especialmente meningite (FIGUEROA et al., 2017). No entanto, a resistência

emergente tornou o tratamento mais desafiador recentemente (WANG et al., 2019; BARUAH et al., 2020).

*Elizabethkingia* sp. exibem alto nível multidroga resistência (FIGUEROA et al., 2017; KUO et al., 2021). No estudo de Kuo et al., 2021 os seus 108 isolados foram resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, devido aos genes intrínsecos da MBL *blaB* e *blaGOB*. Assim como nos nossos isolados que apresentaram 100% de resistência aos 11 dos 12 antimicrobianos testados.

Nos isolados identificados como *Elizabethkingia anophelis*, a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos é esperada pois já foi relatada em outros estudos (WANG et al., 2019). No entanto, três de nossos isolados foram suscetíveis à cefoxitina, embora fossem resistentes aos outros  $\beta$ -lactâmicos testados.

A resistência à TZP é motivo de preocupação, pois este medicamento é usado para tratar infecções causadas por *E. anophelis*. Isolados responsáveis por surtos, como isolados da Coreia do Sul e Wisconsin, demonstraram suscetibilidade à TZP (PERRIN et al., 2017; HAN et al., 2017). Assim, nossos isolados apresentam um perfil de resistência diferenciado que inclui menor suscetibilidade a antimicrobianos.

A combinação de genes de  $\beta$ -lactamases encontrada foi *GOB-4*, *GOB-48*, *BlaB-3*, *BlaB-33* e *CME-1*. *BlaB* e *GOB* são responsáveis pela resistência observada ao carbapenêmicos, enquanto *CME* confere resistência às cefalosporinas. Esse resultado corrobora os achados do estudo realizado por Chang et al., 2021, que detectou cepas de *E. anophelis* co-transportando os genes *blaGOB*, *blaBlaB* e *blaCME*  $\beta$ -lactamase, sendo a *CME-1* uma das mais prevalentes também como nossos achados.

O gene *catB11* codifica uma cloranfenicol O-acetiltransferase que confere resistência a antimicrobianos. Muitos genes semelhantes a *cat* são transposons e cassetes de genes em *integrons* de classe 1 e classe 2 em bactérias Gram-negativas (SZMOLKA E NAGY, 2013; SCHWARZ et al., 2006). Este gene está associado à resistência ao anfenicol em *Acinetobacter baumannii*, um importante patógeno emergente (KYRIAKIDIS et al., 2021). Uma variedade de genes semelhantes a *cat* já foi relatada em isolados de *E. anophelis* por Wang et al., 2019, porém nenhum deles foi especificamente identificado como *catB11*.

*AbeS* é uma bomba de efluxo pertencente a exportadores do tipo SMR que são codificadas cromossomicamente, exibindo homologia com o sistema *EmrE* de *Escherichia coli* (COYNE et al., 2011). O gene *abeS* confere resistência a vários

compostos antimicrobianos (como cloranfenicol, fluoroquinolonas, eritromicina, por exemplo) por meio de um mecanismo de efluxo (SRINIVASAN et al., 2009; LI et al., 2015).

A resistência aos aminoglicosídeos pode ser devido à inativação enzimática por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), uma vez que o gene *aadS*, encontrado em todos os nossos isolados, codifica um aminoglicosídeo adenilil transferase (CAMERON et al., 2018). Os AMEs inativam o aminoglicosídeo ligando um radical fosfato, adenil ou acetil à molécula do antibiótico e, portanto, os antimicrobianos modificados têm afinidade de ligação diminuída ao seu alvo na célula bacteriana (subunidade ribossômica 30S) (PACHORI et al., 2019).

Dois de nossos isolados tinham o gene *tet(X6)* que confere resistência às tetraciclinas, incluindo a tigeciclina. *tet(X)* é uma monooxigenase dependente de flavina, catalisa a clivagem da tigeciclina através de um mecanismo dependente de oxigênio (HSIEH et al., 2021). O gene *tet(X6)* já foi descrito em outros Gram-negativos e foi relatado tanto em plasmídeos quanto em cromossomos (JIANG et al., 2021; CHENG et al., 2021). Os achados apontados por Hsieh et al., 2021 revelaram evidências de disseminação clonal de *A. baumannii* resistente à tigeciclina carregando *tet(X6)* em um hospital, indicando a possibilidade de disseminação desse gene entre bactérias e suas possíveis implicações de danos no cenário de resistência antimicrobiana.

Uma mutação no gene *katG* que poderia conferir resistência à isoniazida (CLICK et al., 2020) foi encontrada em todos os isolados. Esse gene é conhecido em *Mycobacterium tuberculosis* por codificar a enzima *katG* (catalase-peroxidase) que ativa a pró-droga isoniazida (PURKAN et al., 2018). *katG* desempenha um papel importante na fisiologia e patogênese bacteriana, catabolizando peróxidos formados durante a explosão oxidativa de fagócitos, antagonizando assim o mecanismo imunológico do hospedeiro (REINGEWERTZ et al., 2020).

Através da análise filogenômica dos nossos isolados comparados com 220 genomas disponíveis nos bancos de dados, se pode evidenciar que os nossos isolados ambientais estão claramente relacionados com cepas clínicas, assim como no estudo de Hem et al., 2022 onde foi verificado que isolados *E. anophelis* de pântano e barragens estavam intimamente relacionados com cepas causadoras de sepse em pacientes da Austrália. Xu et al., 2019 evidencia que dados do genoma central do seu estudo (13 genomas completos e 23 genomas de *E. anophelis* de todo o mundo)

sugerem que as infecções por *E. anophelis* foram causadas por diversas cepas adquiridas do meio ambiente. Essas evidências corroboram com nossa análise e nos faz sugerir que os corpos d'água podem ser um importante reservatório para *Elizabethkingia* sp.

## 7 CONCLUSÕES

Nossos resultados revelaram a presença de poluentes químicos e biológicos nos efluentes analisados, o que pode comprometer a qualidade dos corpos hídricos receptores dessas águas.

Resíduos de antimicrobianos foram encontrados no efluente de Bio-Manguinhos ao longo de todo tratamento.

Altas concentrações de Fe e Mg foram detectadas em todas as amostras analisadas nas duas ETEIs.

Foi revelada a presença de microrganismos multidroga resistentes dos gêneros, *Proteus* sp. (MDR, XDR e PDR), *Enterococcus* sp. (MDR) e *Elizabethkingia* sp. (XDR e PDR) ao longo do tratamento.

A análise de sequenciamento dos genomas provou ser uma ferramenta útil para estudar fatores de resistência, virulência e patogenicidade antimicrobianos, bem como a disseminação de linhagens com relevância clínica em ambientes aquáticos.

Nossos resultados podem contribuir com dados enriquecedores para o cenário de escassez do país. Também indica a necessidade de futuros estudos sobre a disseminação de BRA por meio águas residuais para corpos hídricos receptores e possivelmente seu retorno ao ambiente clínico.

## 8 REFERÊNCIAS

AGERSØ, Y., A.G. PEDERSEN, AND F.M. AARESTRUP. 2006. Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) in enterococci from humans, pigs and poultry. **J. Antimicrob. Chemother.** 57:832–839.

AHMED, M.O., AND K.E. BAPTISTE. 2018. Vancomycin resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. **Microb. Drug Resist.** 24:590–606.

ANDRIEU, M. ET AL. Ecological risk assessment of the antibiotic enrofloxacin applied to Pangasius catfish farms in the Mekong Delta, Vietnam. **Chemosphere** 119, 407e 414 (2015).

AMARAL, A. L.; MESQUITA, D. P.; FERREIRA, E. C. Automatic identification of activated sludge disturbances and assessment of operational parameters. **Chemosphere**, v. 91, p. 705-710, 2013.

ANDREWS S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010 <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

ANTIPOV D, RAIKO M, LAPIDUS A, PEVZNER PA. Metaviral SPAdes: assembly of viruses from metagenomic data. **Bioinformatics.** 2020 Aug 15;36(14):4126-4129. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa490. PMID: 32413137.

ARANCIBIA JM. Estratégias de uso de antimicrobianos em pacientes graves. **Revista Médica Clínica Las Condes**, 2019; 30(2): 151-159

AREND, R.G., HENKES, J.A. Efluentes Hospitalares: Avaliação da forma de disposição dos efluentes hospitalares em quatro municípios da região do vale dos Sinos, no estado do Rio Grande do Sul. R. **Gest. Sust. Ambient.**, Florianópolis, v. 2, n. 2, p. 263-308, 2013.

ARYAL, N.; WOOD, J.; ISHARA RIJAL, I.; DENG, D.; JHA, M. J.; OFORI-BOADU, A. Fate of environmental pollutants: A review. **Water Environment Research** v 92: 1587–1594, 2020.

ARIAS, C.A., D. PANESSO, K.V. SINGH, L.B. RICE, AND B.E. MURRAY. 2009. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53:4240–4246.

BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M.S.; STEPANAUSKAS, R.; MCARTHUR, J.V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends Microbiol.** Apr;14(4):176-82, 2006

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-hot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, **New York**, v. 32, 78-91, 2003

BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, GUREVICH AA, DVORKIN M, KULIKOV AS, LESIN VM, NIKOLENKO SI, PHAM S, PRJIBELSKI AD, PYSHKIN AV, SIROTKIN AV, VYAHHI N, TESLER G, ALEKSEYEV MA, PEVZNER PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **J Comput Biol.** May;19(5):455-77, 2012.

BAQUERO F, MARTÍNEZ JL, CANTÓN R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Curr Opin Biotechnol.** 2008 Jun;19(3):260-5. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006. Epub Jun 4. PMID: 18534838, 2008.

BARCELLOS, C.; QUITERIO, L. A. D. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 170-177, Feb. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102006000100025>.

BARUAH FK, BORKAKOTY B, AHMED A, BORA P. Neonatal Meningitis and Septicemia Caused by Multidrug-Resistant *Elizabethkingia anophelis* Identified by 16s Ribosomal RNA: An Emerging Threat. **J Glob Infect Dis.** 2020 Nov 30;12(4):225-227. doi: 10.4103/jgid.jgid\_126\_19. PMID: 33888964; PMCID: PMC8045540.

BECEIRO A, TOMÁS M, BOU G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? **Clin Microbiol Rev.** Apr;26(2):185-230, 2013.

BENGTSSON-PALME J, MILAKOVIC M, ŠVECOVÁ H, GANJTO M, JONSSON V, GRABIC R, UDIKOVIC-KOLIC N. Industrial wastewater treatment plant enriches antibiotic resistance genes and alters the structure of microbial communities. **Water Res.** 2019 Oct 1;162:437-445. doi: 10.1016/j.watres.2019.06.073. Epub 2019 Jul 4. PMID: 31301473.

BEUKERS, A.G., R. ZAHEER, N. GOJI, et al. Comparative genomics of *Enterococcus* spp. isolated from bovine feces. **BMC Microbiol.** 17:1–18, 2017.

BIDET, P., VERDET, C., GAUTIER, V., BINGEN, E., AND ARLET, G. First description of DHA-1 AmpC beta-lactamase in *Proteus mirabilis*. **Clin. Microbiol. Infect.** 2005, 11, 591–592. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01178.x

BILLSTROM, H., B. LUND, A. SULLIVAN, AND C.E. NORD. 2008. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. Int. **J. Antimicrob. Agents** 32

BOILLOT, C. et al. Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. **Sci Total Environ**, v.15, p .113-29, sep. 2008.

BRANCO, N. M. C.; ALBERT, A. L. M.; ROMÃO, C. M. C. P. Emerging Pollutants: Antimicrobials in the environment, environmental education and the national and international regulatory aspect. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. e16910817083, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i8.17083.

BRASIL. **Constituição Federal.** Brasília, 1988.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União** 20 set 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2008: 20 anos de Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância à Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Diretrizes Nacionais da Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2010

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, 2011.

BRASIL. Resolução MS/CNS nº 588, de 12 de julho de 2018. Fica instituída a Política Nacional de Vigilância em Saúde (PNVS), aprovada por meio desta resolução. **Diário Oficial da União**. 13 Ago 2018.

BRISSE, S., A.C. FLUIT, U. WAGNER, et al. 1999. Association of alterations in parC and gyrA proteins with resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecium* to nine different fluoroquinolones. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43: 2513–2516

BRITO GB E TREVISAN M. The improper use of antibiotics and the eminent risk of bacterial resistance. **Revista Artigos. Com** | ISSN 2596-0253, Vol. 30 | e7902, 2021.

CABELLO FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environ Microbiol.** Jul;8(7):1137-44, 2006.

CAMARGO, C.H., A. BRUDER-NASCIMENTO, S.H.I. LEE, A.F. JU´NIOR, R. KANENO, AND V.L.M. RALL. 2014. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. **Braz. J. Microbiol.** 45:111– 115

CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, FIERER N, PEÑA AG, GOODRICH JK, GORDON JI, HUTTLEY GA,

KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, MCDONALD D, MUEGGE BD, PIRRUNG M, REEDER J, SEVINSKY JR, TURNBAUGH PJ, WALTERS WA, WIDMANN J, YATSUNENKO T, ZANEVELD J, KNIGHT R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**. May;7(5):335-6, 2010.

CARATTOLI A, HASMAN H. PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). **Methods Mol Biol**. 2020; 2075:285-294. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7\_20. PMID: 31584170.

CESÁRIO SILVA, S. M.; FERNANDES, F.; SOCCOL, V. T.; MORITA, D. M. Principais contaminantes do lodo. In: VON SPERLING, M.; ANDREOLI, C. V.; FERNANDES, F. (Ed.) Lodo de Esgotos: tratamento e disposição final. Belo Horizonte: **DESA-UFMG**, 2001. p. 69-121. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v. 6).

CHANG Y, ZHANG D, NIU S, CHEN Q, LIN Q, ZHANG X. MBLs, Rather Than Efflux Pumps, Led to Carbapenem Resistance in Fosfomycin and Aztreonam/Avibactam Resistant *Elizabethkingia anophelis*. **Infect Drug Resist**. 2021 Jan 29;14:315-327. doi: 10.2147/IDR.S294149. PMID: 33551643; PMCID: PMC7856348.

CHENG Y, CHEN Y, LIU Y, SONG J, CHEN Y, SHAN T, XIAO Y, ZHOU K. Detection of a new tet(X6)-encoding plasmid in *Acinetobacter towneri*. **J Glob Antimicrob Resist**. 2021 Jun;25:132-136. doi: 10.1016/j.jgar.2021.03.004. Epub 2021 Mar 21. PMID: 33762210.

CASADEVALL, A., AND L. PIROFSKI. 2001. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **J. Infect. Dis**. 184: 337–344.

CLEWELL, D.B., K.E. WEAVER, G.M. DUNNY, T.M. COQUE, M.V. FRANCIÀ, AND F. HAYES. Extrachromosomal and mobile elements in enterococci: transmission, maintenance, and epidemiology. In *Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection*. pp. 1–112, 2014.

CLICK ES, KURBATOVA EV, ALEXANDER H, DALTON TL, CHEN MP, POSEY JE, ERSHOVA J, CEGIELSKI JP. Isoniazid and Rifampin-Resistance Mutations Associated

With Resistance to Second-Line Drugs and With Sputum Culture Conversion. **J Infect Dis.** 2020 Jun 11;221(12):2072-2082. doi: 10.1093/infdis/jiaa042. PMID: 32002554; PMCID: PMC7289556.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S24CLSI, Wayne, PA, 2018.

COSENTINO S, VOLDBY LARSEN M, MØLLER AARESTRUP F, LUND O. PathogenFinder--distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. **PLoS One.** 2013 Oct 28;8(10):e77302. doi: 10.1371/journal.pone.0077302. Erratum in: **PLoS One.** 2013;8(12). doi:10.1371/annotation/b84e1af7-c127-45c3-be22-76abd977600f. PMID: 24204795; PMCID: PMC3810466.

COSTA, Y., M. GALIMAND, R. LECLERCQ, J. DUVAL, AND P. COURVALIN. 1993. Characterization of the chromosomal aac(6')-ii gene specific for *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 37:1896–1903.

COYNE S, COURVALIN P, PÉRICHON B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother.** 2011 Mar;55(3):947-53. doi: 10.1128/AAC.01388-10. **Epub** 2010 Dec 20. PMID: 21173183; PMCID: PMC3067115.

DANNER, M. C., ROBERTSON, A., BEHRENDTS, V., REISS, J. Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. **Science of the Total Environment**, 664, 793–804, 2019.

DANTAS G.; SOMMER, M.O.A.; OLUWASEGUN, R.D.; CHURCH, G.M. Bacteria Subsisting on Antibiotics. **Science.** v. 320, p. 100 – 103, 2008

DA SILVA, L.P.P., A. PITONDO-SILVA, R. MARTINEZ, AND A.L. DA COSTA DARINI. 2012. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 74:267– 271.

DAVIES J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science.** Apr 15;264(5157):375-82, 1994.

DAVIES, J. E. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. **Ciba Foundation symposium** 207, 15–27, 1997.

**Decentralized Wastewater Glossary**, 2009. Acesso em 01 maio 2021: <http://www.onsiteconsortium.org/glossary.html>.

DE CHAMPS, C., BONNET, R., SIROT, D., CHANAL, C., AND SIROT, J. Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: a two year survey. **J. Antimicrob. Chemother.** 2000, 45, 537–539. doi: 10.1093/jac/45.4.537

DEGGERONI, A. F.; LUTINSKI, J. A.; BUSATO, M. A. VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE: UMA DÉCADA DE EXPERIÊNCIA NO ATENDIMENTO DE AGRAVOS À SAÚDE EM CHAPECÓ-SC. **Temas em saúde**. Volume 21, Número 2 ISSN 2447-2131 João Pessoa, 2021.

DHARIWAL A, CHONG J, HABIB S, KING IL, AGELLON LB, XIA J. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Res.** Jul 3;45(W1):W180-W188, 2017.

DI CESARE A, ECKERT E, CORNO G. Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. **J Limnol** [Internet]. 2016 Apr. 13 [cited 2021 ep. 10];75(s2).Availablefrom: <https://www.jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2016.1198>

DIAS, K. M. DO N.; GIORDANO, G. Proposta de Ferramenta Estatística para Controle de Estações de Tratamento de Efluentes Industriais. **Revista Internacional de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 01, p. 56 - 72, 2020.

DINSDALE EA, EDWARDS RA, HALL D, ANGLY F, BREITBART M, BRULC JM, FURLAN M, DESNUES C, HAYNES M, LI L, MCDANIEL L, MORAN MA, NELSON KE, NILSSON C, OLSON R, PAUL J, BRITO BR, RUAN Y, SWAN BK, STEVENS R, VALENTINE DL, THURBER RV, WEGLEY L, WHITE BA, ROHWER F. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature.** Apr 3;452(7187):629-32, 2008.

EDUARDO, M. B. P.; MIRANDA, I. C. S. **Vigilância Sanitária**. 1. ed. São Paulo: Petrópolis, v. 1. 465 p, 1998.

EKWANZALA, M.D., J.B. DEWAR, I. KAMIKA, AND M.N.B. MOMBA. Comparative genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. revealed common resistome determinants from hospital wastewater to aquatic environments. **Sci. Total Environ.** 719:137275, 2020.

EMMANUEL, E. et al. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. **Journal of Hazardous Materials**, v. 117, n.1, p.1-11, jan. 2005.

ENGLERT B.C. Nanomaterials and the environment: uses, methods and measurement. **J Environ Monit.** Nov;9(11):1154-61, 2007.

EL AMIN, N., S. JALAL, AND B. WRETLIND. 1999. Alterations in *gyrA* and *parC* associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43:947–949.

FIGUEROA CASTRO CE, JOHNSON C, WILLIAMS M et al. *Elizabethkingia anophelis*: clinical experience of an academic health system in southeastern Wisconsin. **Open Forum Infect Dis** 2017; 4: ofx251.

FLAHERTY CM, DODSON SI. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. **Chemosphere.** Oct;61(2):200-7, 2005.

FOUCAULT, M.L., F. DEPARDIEU, P. COURVALIN, AND C. GRILLOT COURVALIN. Inducible expression eliminates the fitness cost of vancomycin resistance in enterococci. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 107:16964–16969 2010.

FREITAS, A.R., C. NOVAIS, A.P. TEDIM, et al. Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in enterococcus populations. **PLoS One** 8:e60589, 2013.

FREITAS, A.R., A.P. TEDIM, C. NOVAIS, et al. 2010. Global spread of the hylEfm colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. **Antimicrob. Agents Chemother.** 54: 2660–2665

FREITAS, A.R., T.M. COQUE, C. NOVAIS, et al. 2011. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. **J. Clin. Microbiol.** 49:925–931.

GADD, G.M.; FOMINA, M. Uranium and fungi. **Geomicrobiology Journal**, v. 28, p.471–482, Jul. 2011.

GALLER, H. ET AL. Multiresistant Bacteria Isolated from Activated Sludge in Austria. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 15(3), 479 (2018).

GALLOWAY-PEÑA, J.R., S.R. NALLAPAREDDY, C.A. ARIAS, M. B AU10 GEORGE, AND B.E. MURRAY. 2009. **NIH Public Access**. 200: 1566–1573

GARCÍA-SOLACHE, M., AND L.B. RICE. 2019. The enterococcus: a model of adaptability to its environment. **Clin. Microbiol. Rev.** 32:1–28.

GILLINGS, M. R., GAZE, W. H., PRUDEN, A., SMALLA, K., TIEDJE, J. M., and ZHU, Y.-G. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. **The ISME Journal**, 9(6), 1269–1279, 2015.

GIORDANO, G.; SURERUS, V. **Efluentes Industriais – Estudo de Tratabilidade. Rio de Janeiro: Publit.** v.1, p. 196, 2015.

GIRLICH, D., DORTET, L., POIREL, L., AND NORDMANN, P. Integration of the blaNDM-1 carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. **J. Antimicrob. Chemother.** 2015, 70, 98–102. doi: 10.1093/jac/dku371

GIRLICH D, BONNIN RA, DORTET L, NAAS T. Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. **Front Microbiol.** 2020 Feb 21;11:256. doi: 10.3389/fmicb.2020.00256. PMID: 32153540; PMCID: PMC7046756.

GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENE, A.; NAGINIENE, R. et al.;. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. **Medicina** (Kaunas), v.47(3), p.137-46, 2011.

GOULIOURIS, T., K.E. RAVEN, D. MORADIGARAVAND, et al. 2019. Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* hospital-adapted lineages in municipal wastewater treatment plants indicates widespread distribution and release into the environment. **Genome Res.** 29:626–634.

GROS M, PETROVIĆ M, GINEBREDA A, BARCELÓ D. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. **Environ Int.** 2010 Jan;36(1):15-26. doi: 10.1016/j.envint.2009.09.002. Epub 2009 Oct 12. PMID: 19819553.

GUPTA P.D., BIRDI T.J. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. **J Ayurveda Integr Med.** Oct-Dec;8(4):266-275, 2017.

HAN MS, KIM H, LEE Y, KIM M, KU NS, CHOI JY, YONG D, JEONG SH, LEE K, CHONG Y. Relative Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Clinical Isolates of *Elizabethkingia* Species Based on 16S rRNA Gene Sequencing. **J Clin Microbiol.** 2016 Dec 28;55(1):274-280. doi: 10.1128/JCM.01637-16. PMID: 27847376; PMCID: PMC5228240.

HAMMER, M. J. **Water and wastewater technology.** 3. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall; 1996.

HASMAN, H., I. KEMPF, B. CHIDAINÉ, et al. Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcrB* gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate. **Appl. Environ. Microbiol.** 72:5784–5789, 2006.

HE, H.; CHEN, Y.; LI, X.; CHENG, Y.; YANG, C.; ZENG, G.; Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.119, p. 520-527, 2017.

HEC DA SILVA, K. Avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos e metais pesados em bactérias isoladas de processo de compostagem. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011, 109p.

HEM S, JAROCKI VM, BAKER DJ, CHARLES IG, DRIGO B, AUCOTE S, DONNER E, BURNARD D, BAUER MJ, HARRIS PNA, WYRSCH ER, DJORDJEVIC SP. Genomic analysis of *Elizabethkingia* species from aquatic environments: Evidence for potential clinical transmission. **Curr Res Microb Sci**. 2021 Nov 26;3:100083. doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100083. PMID: 34988536; PMCID: PMC8703026.

HERNANDO-AMADO, S., TERESA M. COQUE, T. M., FERNANDO BAQUERO, F., MARTÍNEZ, J. L. Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. **Nature Microbiology**, VOL 4, 1432–1442, 2019.

HERNANDO, M.D. et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v. 69, n.2, p.334-342, apr. 2006.

HSIEH YC, WU JW, CHEN YY, QUYEN TLT, LIAO WC, LI SW, CHEN YC, PAN YJ. An Outbreak of *tet(X6)*-Carrying Tigecycline-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with a New Capsular Type at a Hospital in Taiwan. **Antibiotics** (Basel). 2021 Oct 12;10(10):1239. doi: 10.3390/antibiotics10101239. PMID: 34680819; PMCID: PMC8532604.

ISEPPI, R., A. DI CERBO, P. MESSI, AND C. SABIA. 2020. Antibiotic resistance and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci (VRE) and extended spectrum-lactamase/AmpC-producing (ESBL/AmpC) Enterobacteriaceae from humans and pets. **Antibiotics** 9:1–14.

JÄGER, T., HEMBACH, N., ELPERS, C., WIELAND, A., ALEXANDER, J., HILLER, C., SCHWARTZ, T. Reduction of antibiotic resistant bacteria during conventional and advanced wastewater treatment, and the disseminated loads released to the environment. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2599, 2018.

JEAN, B. P. One Health and the Politics of Antimicrobial Resistance. **Emerging Infectious Disease journal** 23, 724, 2017. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161871>.

JIA B, RAPHENYA AR, ALCOCK B, WAGLECHNER N, GUO P, TSANG KK, LAGO BA, DAVE BM, PEREIRA S, SHARMA AN, DOSHI S, COURTOT M, LO R, WILLIAMS LE, FRYE JG, ELSAYEGH T, SARDAR D, WESTMAN EL, PAWLOWSKI AC, JOHNSON TA, BRINKMAN FS, WRIGHT GD, MCARTHUR AG. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Res.** Jan 4;45(D1):D566-D573, 2017.

JIA, W., G. LI, AND W. WANG. 2014. Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species: a hospital based study in China. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 11: 3424–3442

JIANG L, CAI W, TANG F, WANG Z, LIU Y. Characterization of Fitness Cost Caused by Tigecycline-Resistance Gene *tet(X6)* in Different Host Bacteria. **Antibiotics** (Basel). 2021 Sep 27;10(10):1172. doi: 10.3390/antibiotics10101172. PMID: 34680753; PMCID: PMC8532885.

JJEMBA P.K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. **Ecotoxicol Environ Saf.** Jan;63(1):113-30, 2006.

JOHANSSON M.H.K., BORTOLAIA V., TANSIRICHAIIYA S., AARESTRUP F.M., ROBERTS A.P., PETERSEN T.N. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: Mobile Element Finder. **J. Antimicrob. Chemother.** 2021;76:101–109. doi: 10.1093/jac/dkaa390.

KEEGAN KP, GLASS EM, MEYER F. MG-RAST, a Metagenomics Service for Analysis of Microbial Community Structure and Function. **Methods Mol Biol.** 1399:207-33, 2016.

KHALIL MAF, ELGAML A, EL-MOWAFY M. Emergence of Multidrug-Resistant New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Egypt. **Microb Drug Resist.** Jun;23(4):480-487, 2017.

KIEFFER N, ROYER G, DECOUSSER JW, BOURREL AS, PALMIERI M, ORTIZ DE LA ROSA JM, JACQUIER H, DENAMUR E, NORDMANN P, POIREL L. mcr-9, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. **Antimicrob Agents Chemother**, 2019.

KOBYA, M.; DEMIRBAS, E.; SENTURK, E.; INCE, M. Adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions by activated carbon prepared from apricot stone. **Bioresources & Technology**, v. 96, n. 13, 1518-1521, 2008.

KOZICH, J.J.; WESTCOTT, S.L.; BAXTER, N.T.; HIGHLANDER, S.K.; SCHLOSS, P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Appl Environ Microbiol.** Sep;79(17):5112-20, 2013.

KUMAR, V.; SUDHAMANI, M.; MALLU, U.R. Heavy metal resistance and bioremediation activity of microorganisms from polluted water and soil environment. **International Journal of Science Innovations and Discoveries**, v.3,n.1, , p.49-57, January-February, 2013.

KUMMERER, K. Resistance in the environment. **J. Antimicrob. Chemother.** 54, 311–320, 2004. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh325>.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. **Chemosphere** 75, 417–434, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>.

KUMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **Journal of Environmental Management.** 90, 2354-2366, 2009.

KUO SC, TAN MC, HUANG WC, WU HC, CHEN FJ, LIAO YC, WANG HY, SHIAU YR, LAUDERDALE TL. Susceptibility of *Elizabethkingia* spp. to commonly tested and novel antibiotics and concordance between broth microdilution and automated testing methods. **J Antimicrob Chemother**. 2021 Feb 11;76(3):653-658. doi: 10.1093/jac/dkaa499. PMID: 33258923; PMCID: PMC8600004.

KYRIAKIDIS I, VASILEIOU E, PANA ZD, TRAGIANNIDIS A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens**. 2021 Mar 19;10(3):373. doi: 10.3390/pathogens10030373. PMID: 33808905; PMCID: PMC8003822.

LANE D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Wiley, New York, pp 115–175, 1991.

LAU SK, CHOW WN, FOO CH, CURREEM SO, LO GC, TENG JL, CHEN JH, NG RH, WU AK, CHEUNG IY, CHAU SK, LUNG DC, LEE RA, TSE CW, FUNG KS, QUE TL, WOO PC. *Elizabethkingia anophelis* bacteremia is associated with clinically significant infections and high mortality. **Sci Rep**. 2016 May 17;6:26045. doi: 10.1038/srep26045. PMID: 27185741; PMCID: PMC4868968.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin. Infect. Dis**. 34:482– 492, 2002.

LECLERCQ, R., K. OBERLE´, S. GALOPIN, V. CATTOIR, H. BUDZINSKI, AND F. PETIT. 2013. Changes in enterococcal populations and related antibiotic resistance along a medical center-wastewater treatment plant-river Continuum. **Appl. Environ. Microbiol**. 79:2428–2434.

LEFF, E. **Epistemologia Ambiental**. 3. ed. São Paulo: Cortez, 2002.

LE-MINH, N.; KHAN, S. J.; DREWES, J. E.; STUETZ, R. M. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. **Water Research**, 44(15), 4295–4323, 2010.

LEIMANIS, S., N. HOYEZ, S. HUBERT, M. LASCHET, E. SAUVAGE, R. BRASSEUR, AND J. COYETTE. 2006. PBP5 complementation of a PBP3 deficiency in *Enterococcus hirae*. *J. Bacteriol.* 188:6298–6307.

LI, A.-D.; LI, L.-G.; ZHANG, T. Exploring antibiotic resistance genes and metal resistance genes in plasmid metagenomes from wastewater treatment plants. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1025, 2015.

LI XZ, PLÉSIAT P, NIKAIDO H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Rev.** 2015 Apr;28(2):337-418. doi: 10.1128/CMR.00117-14. PMID: 25788514; PMCID: PMC4402952.

LIN JN, LAI CH, YANG CH, HUANG YH. CORRECTION: JIUN-NONG LIN; CHUNG-HSU LAI; CHIH-HUI YANG AND YI-HAN HUANG. Comparison of Clinical Manifestations, Antimicrobial Susceptibility Patterns, and Mutations of Fluoroquinolone Target Genes between *Elizabethkingia meningoseptica* and *Elizabethkingia anophelis* Isolated in Taiwan. *Journal of Clinical Medicine* 2018, 7, 538. **J Clin Med.** 2019 Apr 22;8(4):546. doi: 10.3390/jcm8040546. Erratum for: J Clin Med. 2018 Dec 11;7(12): PMID: 31013674; PMCID: PMC6517962.

Li, W., J. Li, Q. Wei, et al. 2015. Characterization of aminoglycoside resistance and virulence Genes among *Enterococcus* spp. Isolated from a hospital in China. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 12:3014–3025.

LIU, B.; ZHANG, S.; CHANG, C. Emerging Pollutants-Part II: Treatment. **Water Environment Research** v91: 1390–1401, 2019.

LOCATELLI, M. A. F., SODRÉ, F. F., JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60 (2011) 385–393.

LUCENA, R.M. **Identificação molecular da diversidade microbiana em reator UASB de estação de tratamento de esgoto.** Dissertação – Universidade Federal Pernambuco, 2008.

LUO Y, GUO W, NGO HH, NGHIEM LD, HAI FI, ZHANG J, LIANG S, WANG XC. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Sci Total Environ.** 2014 Mar 1;473-474:619-41. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.065. Epub 2014 Jan 4. PMID: 24394371.

MAGIORAKOS AP, SRINIVASAN A, CAREY RB, CARMELI Y, FALAGAS ME, GISKE CG, HARBARTH S, HINDLER JF, KAHLMETER G, OLSSON-LILJEQUIST B, PATERSON DL, RICE LB, STELLING J, STRUELENS MJ, VATOPOULOS A, WEBER JT, MONNET DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect.** 2012 Mar;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. Epub 2011 Jul 27.

MALBERG TETZSCHNER AM, JOHNSON JR, JOHNSTON BD, LUND O, SCHEUTZ F. *In Silico* Genotyping of Escherichia coli Isolates for Extraintestinal Virulence Genes by Use of Whole-Genome Sequencing Data. **J Clin Microbiol.** 2020 Sep 22;58(10):e01269-20. doi: 10.1128/JCM.01269-20. PMID: 32669379; PMCID: PMC7512150.

MARTINEZ, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science** (New York, N.Y.) 321, 365–367, 2008.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution** (Barking, Essex: 1987), 157(11), 2893–2902, 2009.

MARIN-MORALES, M. A.; ROBERTO M. M.; ANGELIS D. F. **Boletim das águas:** Importância da água para a vida e garantia de manutenção da sua qualidade: MPF/MP, 2016. Disponível em: <http://www.mpf.mp.br/atuacao-tematica/ccr4/dados-da-atuacao/projetos/qualidade-da-agua/boletim-das-aguas/artigos-cientificos/importancia-da-agua-para-a-vida-e-garantia-de-manutencao-da-sua-qualidade>. Acesso em: 01maio 2021.

MARTINS, ANDRÉ ET AL. Resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de águas destinadas ao abastecimento público na região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saúde, Ananindeua**, 10, e 201900065, [http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232019000100014&lng=pt&nrm=is](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232019000100014&lng=pt&nrm=is). (2019).

MASSOUDIEH A., MATHEW A., LAMBERTINI E., NELSON K.E., GINN T.R. Horizontal gene transfer on surfaces in natural porous media: conjugation and kinetics. **Vadose Zone J.** 6(2): 306–325, 2007.

MARCHI, A.P., L.V. PERDIGAˆO NETO, R.C.R. MARTINS, et al. 2018. Vancomycin-resistant enterococci isolates colonizing and infecting haematology patients: clonality, and virulence and resistance profile. **J. Hosp. Infect.** 99:346–355.

MIYAKE, D.; KASAHARA, Y.; MORISAKI, H. Distribution and Characterization of Antibiotic Resistant Bacteria in the Sediment of Southern Basin of Lake Biwa. **Microbes and Environments**, v. 18, n. 1, p. 24–31, 2003.

MONTAGNER, C.C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **D.Quim. Nova**, Vol. 40, No. 9, 1094-1110, Revisão, 2017.

MONTEIRO, M. A. ET AL. Occurrence of Antimicrobials in River Water Samples from Rural Region of the State of Rio d Janeiro, Brazil. **Journal of Environmental Protection**, 7, 230-241(2016).

MONTEALEGRE, M.C., J.H. ROH, M. RAE, et al. 2017. Differential penicillin-binding protein 5 (PBP5) levels in the *Enterococcus faecium* clades with different levels of ampicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61: 1–10.

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 bactéria. **Critical Reviews in Microbiology**, 2020. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1813687>.

NAIDOO, S.; OLANIRAN, A. O. Treated Wastewater Effluent as a Source of Microbial Pollution of Surface Water Resources. **Int. J. Environ. Res. Pub. Health**, 11, 249-270, 2014.

NICOLETTI AG, MARCONDES MF, MARTINS WM, ALMEIDA LG, NICOLÁS MF, VASCONCELOS AT, OLIVEIRA V, GALES AC. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. Sep; 59(9):5159-64, 2015.

NIELSEN HL, TARPGAARD IH, FUGLSANG-DAMGAARD D, THOMSEN PK, BRISSE S, DALAGER-PEDERSEN M. Rare *Elizabethkingia anophelis* meningitis case in a Danish male. **JMM Case Rep**. 2018 Aug 9;5(8):e005163. doi: 10.1099/jmmcr.0.005163. PMID: 30323938; PMCID: PMC6152398.

NORDMANN P, POIREL L, DORTET L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis**. 2012;18(9):1503–1507, 2012. doi:10.3201/eid1809.120355.

NURK S, MELESHKO D, KOROBAYNIKOV A, PEVZNER PA. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Res**. May;27(5):824-834, 2017.

OBAYIUWANA A, OGUNJOBI A, YANG M, IBEKWE M. Characterization of Bacterial Communities and Their Antibiotic Resistance Profiles in Wastewaters Obtained from Pharmaceutical Facilities in Lagos and Ogun States, Nigeria. **Int J Environ Res Public Health**. 2018 Jun 29;15(7):1365. doi: 10.3390/ijerph15071365. PMID: 29966226; PMCID: PMC6069043.

O'HARA, CM, BRENNER, FW, MILLER, JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clin. Microbiol. Rev**. 13, 534–546, 2000.

OVERBEEK R, BEGLEY T, BUTLER RM, CHOUDHURI JV, CHUANG HY, COHOON M, DE CRÉCY-LAGARD V, DIAZ N, DISZ T, EDWARDS R, FONSTEIN M, FRANK ED,

GERDES S, GLASS EM, GOESMANN A, HANSON A, IWATA-REUYL D, JENSEN R, JAMSHIDI N, KRAUSE L, KUBAL M, LARSEN N, LINKE B, MCHARDY AC, MEYER F, NEUWEGER H, OLSEN G, OLSON R, OSTERMAN A, PORTNOY V, PUSCH GD, RODIONOV DA, RÜCKERT C, STEINER J, STEVENS R, THIELE I, VASSIEVA O, YE Y, ZAGNITKO O, VONSTEIN V. The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Res.** Oct 7;33(17):5691-702, 2005.

PACHORI, P., GOTHALWAL, R., AND GANDHI, P. (2019) Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes Dis** 6:109–119

PAZDA M, KUMIRSKA J, STEPNOWSKI P, MULKIEWICZ E. Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems - A review. **Sci Total Environ.** 2019

PIOVESAN, M. F. **A Construção política da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.** 2002. 108 f. Dissertação Mestrado em Saúde Pública - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

PEAK, N.; KNAPP, C.W.; YANG, R.K.; HANFELT, M.M.; SMITH, M.S.; AGA, D.S.; GRAHAM, D.W. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. **Environmental Microbiology.** v. 9, n.1, p. 143 –151, 2007.

PERRIN A, LARSONNEUR E, NICHOLSON AC, EDWARDS DJ, GUNDLACH KM, WHITNEY AM, GULVIK CA, BELL ME, RENDUELES O, CURY J, HUGON P, CLERMONT D, ENOUF V, LOPAREV V, JUIENG P, MONSON T, WARSHAUER D, ELBADAWI LI, WALTERS MS, CRIST MB, NOBLE-WANG J, BORLAUG G, ROCHA EPC, CRISCUOLO A, TOUCHON M, DAVIS JP, HOLT KE, MCQUISTON JR, BRISSE S. Evolutionary dynamics and genomic features of the *Elizabethkingia anophelis* 2015 to 2016 Wisconsin outbreak strain. **Nat Commun.** 2017 May 24;8:15483. doi: 10.1038/ncomms15483. PMID: 28537263; PMCID: PMC5458099.

PORTILLO, A., F. RUIZ-LARREA, M. ZARAZAGA, A. ALONSO, J.L. MARTINEZ, AND C. TORRES. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.** 44: 967–971, 2000.

POIREL L, WALSH TR, CUVILLIER V, NORDMANN P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis.** May;70(1):119-23, 2011.

PRUDEN, A.; PEI, R.; STORTEBOOM, H.; CARLSON, K.H. Antibiotic resistance genes (ARG) as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. **Environ. Sci. Technol.** v.1;40 n. 23, p. 7445-7450, 2006.

PURKAN P, IHSANAWATI I, NATALIA D, SYAH YM, RETNONINGRUM DS, SISWANTO I. Molecular Analysis of *katG* Encoding Catalase-Peroxidase from Clinical Isolate of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **J Med Life.** 2018 Apr-Jun;11(2):160-167. PMID: 30140323; PMCID: PMC6101688.

REINGEWERTZ TH, MEYER T, MCINTOSH F, SULLIVAN J, MEIR M, CHANG YF, BEHR MA, BARKAN D. Differential Sensitivity of *Mycobacteria* to Isoniazid Is Related to Differences in *KatG*-Mediated Enzymatic Activation of the Drug. **Antimicrob Agents Chemother.** 2020 Jan 27;64(2):e01899-19. doi: 10.1128/AAC.01899-19. PMID: 31767723; PMCID: PMC6985715.

REGITANO, J. B.; AND LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **R. Bras. Ci.Solo**, 34:601-616, 2010.

REED TAN, WATSON G, KHENG C, TAN P, ROBERTS T, LING CL, MILIYA T, TURNER P. *Elizabethkingia anophelis* Infection in Infants, Cambodia, 2012-2018. **Emerg Infect Dis.** 2020 Feb;26(2):320-322. doi: 10.3201/eid2602.190345. PMID: 31961289; PMCID: PMC6986841.

RIBEIRO, L. M. M., **Avaliação Quanto a Carga Poluidora dos Efluentes Líquidos de Quatro Hospitais de Diferentes Especialidades no Município de Porto Alegre.** 2005. 95 f. Trabalho de conclusão de Curso (Mestrado Profissionalizante em Engenharia –

Ênfase em Engenharia Ambiental e Tecnologias Limpas) – Escola de Engenharias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ROBINSON, T. P. et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 110, 377–380, 2016. [https:// doi.org/10.1093/trstmh/trw048](https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048) .

ROCHA, A.C.L.; KLIGERMAN, D.C.; OLIVEIRA, J.L.M. Panorama da pesquisa sobre tratamento e reúso de efluentes da indústria de antibióticos. **SAÚDE DEBATE**, RIO DE JANEIRO, V. 43, N. ESPECIAL 3, P. 165-180, 2019.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S., VAZ-MOREIRAC, I., GIUSTINA, S. V. D., LLORCA, M., BARCELÓ, D., SCHUBERT, S., BERENDONK, T. U., MICHAEL-KORDATOU, I., FATTA-KASSINOS, D., MARTINEZ, J. L., ELPERS, C., HENRIQUES, I., JAEGER, T., SCHWARTZ, T., PAULSHUS, E., O'SULLIVAN, K., PÄRNÄNEN, K. M. M., VIRTÄ, M., DO, T. T., WALSH, F., MANAIA, C. M. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. **Environment International** 140, 105733, 2020.

ROSVOLL, T.C.S., T. PEDERSEN, H. SLETVOLD, et al. PCRbased plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTb-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 58:254–268, 2010.

ROSA, R.G., A.V. SCHWARZBOLD, R.P.D. SANTOS, E.E. TURRA, D.P. MACHADO, AND L.Z. GOLDANI. 2014. Vancomycinresistant *Enterococcus faecium* bacteremia in a tertiary care hospital: epidemiology, antimicrobial susceptibility, and outcome. **Biomed Res. Int.** 2014:958469.

SABENÇA, C., T. DE SOUSA, S. OLIVEIRA, et al. Next generation sequencing and MALDI mass spectrometry in the study of multiresistant processed meat vancomycin resistant enterococci (VRE). **Biology (Basel)** 9:89, 2020.

SACRAMENTO, A.G., R.C. ZANELLA, F. ESPOSITO, et al. 2017. Changed epidemiology during intra and interhospital spread of high-risk clones of vanA-containing *Enterococcus* in Brazilian hospitals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 88:348–351

SANTIAGO-RODRIGUEZ, T.M., J.I. RIVERA, M. CORADIN, AND G.A. TORANZOS. 2013. Antibiotic-resistance and virulence genes in *Enterococcus* isolated from tropical recreational waters. **J. Water Health** 11:387–396.

SALLOTO, G. R. B; CARDOSO, A.M; COUTINHO, F.H; PINTO, L.H; VIEIRA, R.P; CHAIA, C; LIMA, J.L; ALBANO, R.M; MARTINS, O.B; CLEMENTINO, M.M. Pollution impacts on bacterioplankton diversity in a tropical urban coastal lagoon system. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e51175, jan. 2012.

SARAIVA SOARES, A.F.; LEÃO, M. M. D. Contaminação dos mananciais por micropoluentes e a precária remoção desses contaminantes nos tratamentos convencionais de água para potabilização. **De Jure** (Belo Horizonte), v. 14, p. 36-85, 2015.

SCHMIEDER R., EDWARDS R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. **Future Microbiol.** Jan;7(1):73-89, 2012.

SANDERSON, H., R. ORTEGA-POLO, R. ZAHEER, et al. Comparative genomics of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater treatment plants. **BMC Microbiol.** 20:1–17, 2020.

SERAFIM et al.,. Genes bacterianos de resistência no meio ambiente. **Revista UNILAGO**, 2018.

SEILER C, BERENDONK TU. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. **Front Microbiol.** 2012 Dec 14;3:399. doi: 10.3389/fmicb.2012.00399. PMID: 23248620; PMCID: PMC3522115.

SILVA, C.G.A.; COLLINS, C.H. Aplicações De Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Para O Estudo De Poluentes Orgânicos Emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SINGER AC, SHAW H, RHODES V, HART A. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. **Front Microbiol.** Nov 1;7:1728, 2016.

SRINIVASAN VB, RAJAMOHAN G, GEBREYES WA. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5312-6. doi: 10.1128/AAC.00748-09. **Epub** 2009 Sep 21. PMID: 19770280; PMCID: PMC2786332.

SZMOLKA A, NAGY B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. **Front Microbiol.** 2013 Sep 3;4:258. doi: 10.3389/fmicb.2013.00258. PMID: 24027562; PMCID: PMC3759790.

SOARES, M. R. Coeficiente de distribuição (KD) de metais pesados em solos do estado de São Paulo. Piracicaba, 2004, 214p. Tese (Doutorado em Agronomia) – **Universidade de São Paulo. Piracicaba**, 2004

SOHEILI, S., S. GHAFOURIAN, Z. SEKAWI, et al. 2014. Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates. **Sci. World J.** 2014:623174

SPARO, M., G. DELPECH, AND N.G. ALLENDE. 2018. Impact on public health of the spread of high-level resistance to gentamicin and vancomycin in enterococci. **Front. Microbiol.** 9:1–10.

STALDER, T.; ALRHMOUN, M.; CASELLAS, M. et al. Dynamic assessment of the floc morphology, bacterial diversity, and integron content of an activated sludge reactor processing hospital effluent. **Environmental Science and Technology**, v.47, p. 7909-7917, 2013.

STRATEVA, T., D. ATANASOVA, E. SAVOV, G. PETROVA, AND I. MITOV. 2016. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Brazilian J. Infect. Dis.* 20: 127–133

SUNDAR, K.; MUKHERJEE, A.; SADIQ, M.; CHANDRASEKARAN, N. Cr (III) bioremoval capacities of indigenous and adapted bacterial strains from Palar river basin. *Journal of Hazardous Materials.* 187, 553–561, 2011.

SUN D. Pull in and push out: mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Front Microbiol.* 9:2154, 2018.

SUZUKI S., HOA P.T. Distribution of quinolones, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in indochina. *Front Microbiol.* Feb 22; 3:67, 2012.

SCHWARZ S, JOHNSON AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Aug;71(8):2066-70. doi: 10.1093/jac/dkw274. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27342545.

TATSING FOKA, F.E., AND C.N. ATEBA. 2019. Detection of virulence genes in multidrug resistant enterococci isolated from feedlots dairy and beef cattle: implications for human health and food safety. *Biomed Res. Int.* 2019.

TENG LC, WANG JM, LU HY, MAO YC, LAI KL, TSENG CH, HUANG YT, LIU PY. *Elizabethkingia* Intra-Abdominal Infection and Related Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance: A **Clinical-Genomic Study**. *Antibiotics* (Basel). 2021 Feb 9;10(2):173. doi: 10.3390/antibiotics10020173. PMID: 33572268; PMCID: PMC7915159.

TEIXEIRA, MG et al. Vigilância em Saúde no SUS - construção, efeitos e perspectivas. **Ciência & Saúde Coletiva** [online]. 2018, v. 23, n. 6 [Acessado 11 Janeiro 2022], pp. 1811-1818. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1413-81232018236.09032018>>. ISSN 1678-4561. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018236.09032018>.

VALIX, M; LOON, L. O. Adaptative tolerance behavior of fungi in heavy metals, **Minerals Engineering**, v. 16, p. 193-198, Mar. 2003

VÁZQUEZ-LASLOP N, MANKIN AS. Context-Specific Action of Ribosomal Antibiotics. **Annu Rev Microbiol.** Sep 8;72: 185-207, 2018.

VAN BELKUM, A. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin Microbiol Infect Dis**, v. 13, p. 1–46, 2007.

VERBURG, I.; VAN VEELLEN, H.P.J.; WAAR, K.; ROSSEN, J.W.A.; FRIEDRICH, A.W.; HERNÁNDEZ LEAL, L.; GARCÍA-COBOS, S.; SCHMITT, H. Effects of Clinical Wastewater on the Bacterial Community Structure from Sewage to the Environment. **Microorganisms** 9, 718, 2021.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040718>

VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.** Dec 25;19(24):6823-31, 1991.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y.S. Bacterial biosorbents and biosorption. **Biotechnology Advances**, New York, v.26, 266– 291, Feb. 2008.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 3.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, p. 15 – 48, 2005.

WAN TW, HUNG WC, TSAI JC, LIN YT, LEE H, HSUEH PR, LEE TF, TENG LJ. Novel Structure of Enterococcus faecium-Originated ermB-Positive Tn1546-Like Element in Staphylococcus aureus. **Antimicrob Agents Chemother.** 2016 Sep 23;60(10):6108-14. doi: 10.1128/AAC.01096-16. PMID: 27480862; PMCID: PMC5038305.

WANG M, GAO H, LIN N, ZHANG Y, HUANG N, WALKER ED, MING D, CHEN S, HU S. The antibiotic resistance and pathogenicity of a multidrug-resistant Elizabethkingia anophelis isolate. **Microbiologyopen.** 2019 Nov;8(11):e804. doi: 10.1002/mbo3.804. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30891912; PMCID: PMC6854844.

WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLoS Comput Biol**, 2017, 13(6): e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>

WEISBURG WG, BARNS SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**. 1991 Jan; 173 (2):697-703.

WELLINGTON, E.M.H.; BOXALL, A.B.A.; CROSS, P. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v.13, p. 155-65, 2013.

YANG F, SHEN C, ZHENG X, et al. Plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from market retail fruits in Guangzhou, China. **Infect Drug Resist.**; 12:385–389, 2019.

XU J, PEI D, NICHOLSON A, LAN Y, XIA Q. *In Silico* Identification of Three Types of Integrative and Conjugative Elements in *Elizabethkingia anophelis* Strains Isolated from around the World. **mSphere**. 2019 Apr 3;4(2):e00040-19. doi: 10.1128/mSphere.00040-19. PMID: 30944210; PMCID: PMC6449604.

ZAD, T. J., ASTUTI, M. P., & PADHYE, L. P. Fate of environmental pollutants. **Water Environment Research**, 90 (10), 1104– 1170, 2018.

ZAHEER, R., S.R. COOK, R. BARBIERI, et al. Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. **Sci. Rep.** 10:1–16, 2020.

ZALIPOUR, M., B.N. ESFAHANI, AND S.A. HAVAEI. Phenotypic and genotypic characterization of glycopeptide, aminoglycoside and macrolide resistance among clinical isolates of *Enterococcus faecalis*: a multicenter based study. **BMC Res. Notes** 12:1–8, 2019.

**ANEXO A**