UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

RAFAELA DE CAMPOS OLIVEIRA

Prospecção *in silico* de *integrons* e genes de resistência antimicrobiana por meio de dados de sequenciamento metagenômico de esgoto público

Mogi das Cruzes, SP

2024

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

RAFAELA DE CAMPOS OLIVEIRA

Prospecção *in silico* de *integrons* e genes de resistência antimicrobiana por meio de dados de sequenciamento metagenômico de esgoto público

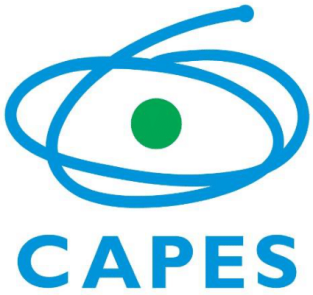
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica. Área de concentração: Informática Biomédica e Engenharia Clínica.

Professor orientador: Dr. Fabiano Bezerra Menegidio

Mogi das Cruzes, SP

2024

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

O48p

Oliveira, Rafaela de Campos
Prospecção in sílico de integrons e genes de resistência antimicrobiana por meio de dados de sequenciamento metagenômico de esgoto público / Rafaela de Campos Oliveira. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2024.
113 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Fabiano Bezerra Menegidio.
Inclui bibliografia.

1.Resistência antimicrobiana 2. Metagenômica 3. Esgoto Público 4. Íntegrons I.Universidade de Mogi das Cruzes II. Menegidio, Fabiano Menegidio.

CDD 610.28

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às nove horas do dia sete de fevereiro de dois mil e vinte e quatro, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada "PROSPECÇÃO IN SILICO DE INTEGRONS E GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA POR MEIO DE DADOS DE SEQUENCIAMENTO METAGENÔMICO DE ESGOTO PÚBLICO" para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Rafaela de Campos Oliveira.** Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 52 (cinquenta e dois), a saber: 28 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Fabiano Bezerra Menegidio, e Tabajara de Oliveira Gonzalez, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Mônica Ghislaine Oliveira Alves, da Universidade Estadual Paulista, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A sessão pública da defesa de dissertação foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA (aprovado(a) /reprovado(a)) por UNANIMIDADE (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 07 de fevereiro de 2024.

Comissão Examinadora	Julgamento
gov.br Documento assinado digitalmente MONICA GHISLAINE OLIVEIRA ALVES Data: 09/02/2024 15:25:41-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	
Profª Drª Mônica Ghislaine Oliveira Alves	APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Tabajara de Oliveira Gonzalez	APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a))
gov.br Documento assinado digitalmente FABIANO BEZERRA MENEGIDIO Data: 16/02/2024 00:54:03-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	
Prof. Dr. Fabiano Bezerra Menegidio	APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a))

Essa dissertação é dedicada à minha avó Maria Tereza, já falecida em decorrência das sequelas da Covid-19 e a má administração de antibióticos durante a primeira onda.

E por fim, dedico ao meu eterno caduceu. Meu início, meu fim e além:

모든 게 영원하지는 않잖아.
Nothing lasts Forever.

겨울이 가면 봄은 다시 와 알잖아.
When winter passes, spring will come again, you know this.

오늘이 지나가면 내일은 다를 것만 같아.
When today is over it feels like tomorrow will be diferent.

우리 다시 만나는 그날까지... 우리 다시 만나는 먼 그날까지.
Until the day we meet again... Until the faraway day when we meet again.

- 2ne1

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr, Fabiano B. Menegídio por me aceitar como aluna de estágio, e confiar a mim a chance de um mestrado, mesmo diante da ausência de uma Iniciação Científica, e pelo enorme apoio durante essa jornada.

Ao, agora, Professor Dr. David Barbosa Aciole, cujo sem ele, esse projeto jamais teria sido possível. Agradeço pelas perguntas técnicas incisivas, pelo olhar e análises críticas de um pesquisador ímpar sob o meu projeto. Todo pesquisador precisa de um David, e dessa forma a comunidade científica reduziria seus problemas de reprodutibilidade. E todo pesquisador “David” precisa ser reconhecido.

Aos meus colegas de Núcleo, principalmente ao senhor Thiago Yasue, e os doutores Luan Moura, Matheus Leonardo Alves e Mariana Valério, por terem me auxiliado durante toda a trajetória e desprendido tempo e paciência para me ensinar, e até mesmo soldar (Luan) coisas para mim.

À Pamela, Alexandre e Paulo, meus companheiros de laboratório, que me deram todo o apoio e força nos momentos difíceis.

À minha irmã Bianca e ao meu amigo e companheiro Kaique que foram a melhor rede de apoio que alguém poderia ter, e as melhores companhias fora do ambiente acadêmico em todo esse processo. Sou profundamente grata.

Ao meu psicólogo Jonathan Fon Garcia que esteve comigo desde o início dessa jornada, sem nossos encontros semanais, e sua grande capacidade profissional de *ser humano*, muitos dos frutos que colho hoje, talvez não fossem possíveis.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro concedido, essencial para a realização deste trabalho, por meio do Código de Financiamento 001.

Também expresso minha gratidão à Universidade de Mogi das Cruzes pelo espaço e pelos serviços fornecidos durante a realização desse projeto.

“Em sua Essência, O TODO é INCONHECÍVEL
[...]
Mas, o relatório da Razão deve ser recebido com hospitalidade
e tratado com respeito.”

- Trecho adaptado de “O Caibalion”, dos Três Iniciados.

“Tudo que acontece uma vez poderá nunca mais acontecer, mas tudo o que acontece duas vezes, certamente acontecerá uma terceira.”

- Trecho adaptado do livro "O Alquimista", de Paulo Coelho.

RESUMO

Os genes de resistência antimicrobiana (GRAMs) em genomas bacterianos são um dos principais contribuidores para o surgimento da resistência antimicrobiana (RAM). A RAM é uma grande preocupação na saúde pública internacional que tem aumentado nos últimos anos e refere-se à capacidade das bactérias de sobreviverem à exposição aos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções, levando ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade e no aumento dos custos com saúde, devido à necessidade de tratamentos mais caros e mais tóxicos. Dessa forma, a vigilância da ocorrência desses genes e de seus *hosts* podem auxiliar decisões, políticas públicas e ações internacionais para reduzir danos. Neste projeto de mestrado, pretendemos prospectar novos GRAMs por meio de dados de sequenciamento metagenômico de bibliotecas públicas de esgoto de seis países, construir um fluxo de trabalho de bioinformática reprodutível e um banco de dados relacional para o armazenamento desses genes e dados associados. Para isso, obtivemos o genoma completo (*Whole genome sequencing, WGS*) a partir do banco de dados Sequence Reads Archive (SRA) do *NCBI* bibliotecas de esgoto de sete países. Os dados brutos foram importados para a plataforma Galaxy Australia, onde foi utilizado o MEGAHIT (*Galaxy Version 1.2.9.*) para a montagem *de novo* de sequências contíguas longas (*contigs*) e a anotação funcional das sequências obtidas realizada pelo ABRicate (*Galaxy Version 1.0.1.)* na identificação de genes de resistência a antibióticos empregando os bancos de dados *CARD*, *NCBI*, *Arg-Annot* e Resfinder. Os resultados desse estudo podem fornecer informações sobre os genes e classes de antibióticos encontrados em amostras de esgoto desses paises e uma comparação das anotações de quatro bancos de dados diferentes para as mesmas amostras. As informações a partir desses dados podem contribuir para a vigilância dos genes de resistência e dos possíveis *hosts* em esgotos ao redor do mundo, na tomada de decisões e na prevenção do uso indiscriminado desses fármacos.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana; genes de resistência antimicrobiana; *integrons*; metagenômica de esgoto público; bioinformática.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance genes (ARGs) in bacterial genomes are among the primary contributors to the emergence of antimicrobial resistance (AMR). AMR is a major concern in international public health that has escalated in recent years, referring to the ability of bacteria to survive exposure to antimicrobials used in the treatment of infections, leading to increased morbidity and mortality rates and escalating healthcare costs due to the need for more expensive and toxic treatments. Thus, monitoring the occurrence of these genes and their hosts can assist in decision-making, public policies, and international efforts to mitigate harm. In this master's project, we aim to prospect new ARGs through metagenomic sequencing data from public sewage libraries across 101 countries. We will construct a reproducible bioinformatics workflow and a relational database for storing these genes and associated data. To achieve this, we obtained whole-genome sequencing (WGS) data from the Sequence Reads Archive (SRA) database of the NCBI for sewage libraries from seven countries. Raw data were imported into the Galaxy Australia platform, where MEGAHIT (*Galaxy Version 1.2.9.*) was utilized for *de novo* assembly of long contiguous sequences (contigs), and functional annotation of the obtained sequences was performed using ABRicate (*Galaxy Version 1.0.1.)* for the identification of antibiotic resistance genes employing *CARD*, NCBI, Arg-Annot, and Resfinder databases. The outcomes of this study may provide insights into the genes and antibiotic classes present in sewage samples from these countries, along with a comparison of annotations from four different databases for the same samples. Information derived from these data can contribute to the surveillance of resistance genes and potential hosts in sewage systems worldwide, aiding in decision-making and preventing the indiscriminate use of these pharmaceuticals.

Keywords: Antimicrobial resistance; antimicrobial resistance gene; *integrons*; public sewage metagenomics; bioinformatics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ÁGUAS DE ESGOTO 15
2.2 CLASSIFICAÇÃO ANTIMICROBIANA 16
2.2.1 Inibidores da parede celular e membrana 16
2.2.1.1 Antibióticos *β*-Lactâmicos 17
2.2.1.2 Glicopeptídeos e Lipoglicopeptídeos 18
2.2.1.3 Fosfomicina 18
2.2.1.4 Outros inibidores da parede celular 19
2.2.1.5 Desestabilizadores da membrana celular 19
2.2.1.6 Composto amônio quaternário QAC 20
2.2.2 Inibidores da síntese proteica: Subunidade ribossômica 30S e 50S 21
2.2.2.1 Inibidores da Subunidade Ribossômica 30S 21
2.2.2.2 Inibidores da Subunidade Ribossômica 50S 22
2.2.2.3 Inibidores do Fator de Alongamento G (*EF-G*): Fusidanos 24
2.2.3 Inibidores da Síntese do DNA 24
2.2.3.1 Quinolonas e Fluoroquinolonas 25
2.2.3.2 Grupo Nitrocomposto 25
2.2.4 Inibidores da Síntese do RNA 26
2.2.4.1 Ansamicinas 27
2.2.4.2 Mupirocina 27
2.2.5 Metabolismo Intermediárioa Inibidores do Ácido Fólico 27
2.2.5.1 Inibidores da diidrofolato redutase (*DHFR*) 28
2.2.5.2 Inibidores do Ácido Fólico 28
2.3 ANTIMICROBIANOS IMPORTANTES PARA A SAÚDE HUMANA 29
2.4 *INTEGRONS* 31
2.4.1 *Integrons* como agentes na disseminação e aquisição da RAM 33
2.5 MECANISMO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA 34
2.6 METAGENÔMICA E VIGILÂNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA 35
3 OBJETIVO 37
3.1 OBJETIVO GERAL 37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37
4 METODOLOGIA 38
4.1 OBTENÇÃO DE DADOS 38
4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS E PRÉ-PROCESSAMENTO DE DADOS 38
4.3 MONTAGEM DE NOVO DOS METAGENOMAS 40
4.4 IDENTIFICAÇÃO E ANOTAÇÃO DE *INTEGRONS* E GRAMs 41
4.5 PADRONIZAÇÃO DA NOMENCLATURA DOS GRAMs 42
4.6 AVALIAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA E RIQUEZA DOS GRAMs 44
5 RESULTADOS 45
5.1 ANÁLISE DE QUALIDADE DAS BIBLIOTECAS DE SEQUENCIAMENTO 45
5.2 MONTAGEM DOS METAGENOMAS ATRAVÉS DO MÉTODO *DE NOVO* 46

5.3 PROSPECÇÃO E ANOTAÇÃO DE GRAMs 47
5.4 PROSPECÇÃO DE *INTEGRONS* 59
6 DISCUSSÃO 62
6.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA POR PAÍS 62
6.1.1 Zâmbia 62
6.1.2 Austrália 64
6.1.3 Malásia 66
6.1.4 Estados Unidos 67
6.1.5 Suíça 68
6.1.6 Brasil 69
6.2. DIVERGÊNCIA OBSERVADAS DE MUNK *et al.* 70
6.2.1 A diferença de anotações do banco de dados *CARD* 71
6.3 DISTRIBUIÇÃO DE *INTEGRONS*. 71
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVA FUTURA 74
REFERÊNCIAS 76

APÊNDICE 95

ANEXO 1 96
ANEXO 2 102
ANEXO 3 104
ANEXO 4 107
ANEXO 5 109
ANEXO 6 111

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RAM) representa uma séria preocupação em saúde pública, crescendo significativamente nos últimos anos (MURRAY , 2022). Este fenômeno refere-se à habilidade das bactérias de resistirem à exposição aos antimicrobianos usados no tratamento de infecções, resultando em aumentos nas taxas de morbidade, mortalidade e custos relacionados à saúde devido à necessidade de tratamentos mais dispendiosos e tóxicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a RAM provoque 700.000 óbitos globalmente a cada ano, com a perspectiva de um aumento para 10 milhões até 2050 caso nenhuma ação seja implementada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Um dos principais impulsionadores do surgimento da RAM é a presença de genes de resistência antimicrobiana (GRAMs) nos genomas bacterianos (ENDALE; MATHEWOS; ABDETA, 2023). Esses genes codificam proteínas capazes de desativar ou inibir a ação de antimicrobianos, conferindo resistência à bactéria em relação ao tratamento. O surgimento e disseminação de GRAMs constituem um processo complexo envolvendo diversos fatores genéticos e ambientais, sendo a transferência horizontal de genes, mutação e pressão seletiva alguns dos principais mecanismos pelos quais as bactérias adquirem GRAMs (NESME; SIMONET, 2015).

Os *integrons*, elementos genéticos móveis, desempenham um papel crucial na crise global da RAM ao facilitar a rápida adaptação bacteriana por meio da captura, rearranjo e expressão de genes móveis conhecidos como (GHALY *et al.*, 2020). Dada a versatilidade dos *integrons* na aquisição de genes, eles promovem a transferência genética horizontal e a disseminação da poluição por GRAMs (AN *et al.*, 2023).

Tradicionalmente, o teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) é utilizado para avaliar a RAM em bactérias nos laboratórios de microbiologia de clínicas hospitalares, fornecendo dados fenotípicos de resistência essenciais para a tomada de decisões em relação ao tratamento do paciente (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019). Contudo, o TSA possui limitações, como a necessidade de instalações de microbiologia e microbiologistas treinados para garantir precisão, além de ser aplicável apenas a bactérias (D'COSTA *et al.*, 2006; DIDELOT *et al.*, 2012; BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019).

Os avanços recentes em tecnologias de sequenciamento de alto rendimento permitiram a análise completa do genoma ou transcriptoma de uma população bacteriana, proporcionando uma visão mais abrangente da composição genética da bactéria. Isso levou ao desenvolvimento de novas abordagens para a identificação de GRAMs, como o sequenciamento metagenômico. Esse processo, que envolve um conjunto de técnicas, permite a análise de genomas e genes de amostras de microbioma (metagenoma) sem depender do cultivo em laboratório (MARCHESI; RAVEL, 2015). Em comparação com técnicas tradicionais, abordagens ômicas geram uma quantidade sem precedentes de dados, possibilitando a análise de características altamente complexas (CHERNOV *et al.*, 2019).

Em geral, as comunidades microbianas abrigam centenas de genomas de diferentes espécies microbianas, sendo as principais tarefas computacionais em análises metagenômicas a montagem do genoma completo e a avaliação dos componentes taxonômicos e funcionais de todos os genomas na comunidade microbiana (SU; XU; NING, 2012). A metagenômica possibilita análises em larga escala e a detecção de zonas gênicas de interesse para o monitoramento dos GRAMs (ANTELO *et al.*, 2021).

Os esgotos urbanos representam fontes significativas de contaminação por GRAMs, recebendo ao longo de seu trajeto uma ampla variedade de poluentes, incluindo antibióticos e produtos químicos de diversas fontes, até atingirem uma Estação de Tratamento de Esgoto – ETE ((ULUSEKER *et al.*, 2021). Estudos indicam que as águas residuais de esgotos hospitalares, por exemplo, apresentam potencialmente maiores riscos de disseminação de GRAMs do que outros sistemas de águas residuais, como sistemas de esgoto urbano, devido ao elevado influxo de antibióticos e bactérias que exercem pressão seletiva na propagação da RAM (ROWE *et al.*, 2017; VERLICCHI; AL AUKIDY; ZAMBELLO, 2015; ZHENG *et al.*, 2018).

Os dados provenientes do sequenciamento metagenômico de esgotos públicos constituem uma fonte rica de informações genéticas que podem ser utilizadas para identificar a presença de novos GRAMs. Ferramentas de bioinformática podem ser empregadas para analisar esses dados e identificar potenciais novos GRAMs, oferecendo informações valiosas sobre a evolução e disseminação da RAM.

No contexto delineado, a prospecção de GRAMs e *integrons*, ainda não catalogados, em amostras de esgoto e águas residuais, empregando ferramentas avançadas de bioinformática para análise e interpretação dos dados genéticos obtidos dessas fontes, pode ampliar significativamente nossa compreensão da disseminação da RAM nesses ambientes. Além disso, tal abordagem pode oferecer insights sobre as implicações na saúde pública e até mesmo revelar possíveis padrões geográficos na distribuição desses elementos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESISÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ÁGUAS DE ESGOTO

Desde a descoberta da penicilina em 1928, a medicina experimentou uma transformação significativa no tratamento de infecções (SAMBAZA; NAICKER, 2023). Antes desse marco, a arsfenamina (Salvarsan), um antibiótico sintético à base de arsênio, foi o primeiro agente antimicrobiano clinicamente introduzido em 1910 no tratamento da sífilis. No entanto, este composto não está mais em uso clínico, sendo posteriormente substituído pelo fármaco sulfonamida Prontosil (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019). É notável destacar o impacto significativo dos antibióticos na salvação de vidas, na redução substancial do tempo de hospitalização e no controle de doenças infecciosas, que historicamente foram as principais causas de morbidade e mortalidade humana (AMINOV, 2010).

O êxito de qualquer agente terapêutico pode ser comprometido pelo potencial desenvolvimento de tolerância ou resistência desde sua primeira aplicação (DAVIES; DAVIES, 2010). O agravamento dessa situação está frequentemente relacionado ao uso indiscriminado e inadequado de antibióticos, contribuindo para o crescimento, disseminação e prevalência da resistência (ULUSEKER *et al.*, 2021). A maioria dos antibióticos administrados em ambientes domésticos ou hospitalares é eliminada nos esgotos por meio da excreção renal ou biliar (ALHASSANI *et al.*, 2021).

Neste contexto, esgotos e estações de tratamento transformam-se em reservatórios de resistência antimicrobiana (RAM) ao receberem águas residuais hospitalares ou residenciais, tornando-se potenciais pontos críticos para a seleção de RAM e transferência horizontal de genes. Esses sistemas contêm antibióticos, desinfetantes e metais que podem exercer pressão seletiva sobre a RAM, mesmo em concentrações reduzidas (KARKMAN *et al.*, 2018). Os riscos ambientais resultantes da poluição causada pelo uso de antibióticos são uma questão de extrema urgência, considerando que esses compostos têm sido amplamente detectados na água, sendo eventualmente absorvidos ou consumidos por organismos aquáticos. Isso permite a entrada da RAM na cadeia alimentar e, consequentemente, até no corpo humano (TIAN *et al.*, 2021).

2.2 CLASSIFICAÇÃO ANTIMICROBIANA

Antimicrobianos são compostos naturais, semissintéticos ou sintéticos capazes de matar micro-organismos patogênicos ou prevenir seu crescimento (CONCEIÇÃO; QUEIROGA; LARANJO, 2023). Estes compostos incluem antibióticos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários e são medicamentos que podem ser utilizados para prevenir e tratar infecções em humanos, animais e plantas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Dentre esses agentes, destacam-se os antibióticos que estão entre os medicamentos mais utilizados em todo o mundo, sendo capazes de matar ou inibir o crescimento de bactérias para combater infecções de origem bacteriana (YANG *et al.*, 2021).

Os antibióticos, sejam de origem natural ou sintética, são categorizados como bactericidas, provocando a morte bacteriana, ou bacteriostáticos, que induzem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Entre os antibióticos bactericidas, incluem-se os aminoglicosídeos, *β*-lactâmicos, fluoroquinolonas, glicopeptídeos, lipopeptídeos cíclicos e nitroimidazóis. Já os antibióticos bacteriostáticos compreendem as glicilciclinas, tetraciclinas, lincosamidas, macrólidos, oxazolidinonas e sulfonamidas (PATEL *et al.*, 2023).

Além disso, a classificação dos antibióticos pode ser realizada com base em seus mecanismos de ação (Anexo 1) que atuam dentro das células bacterianas, interferindo na síntese da parede celular (SPC) ou na integridade da membrana celular (MC), na síntese de DNA, RNA ou proteínas (função ribossomal) e no metabolismo intermediário (HOOPER, 2001; KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

2.2.1 Inibidores da parede celular ou membrana

No amplo arsenal de antibióticos e antimicrobianos disponíveis atualmente para o tratamento eficaz de infecções bacterianas, os inibidores da biossíntese da parede celular (IBPC) destacam-se como a classe de compostos mais bem-sucedida (SARKAR *et al.*, 2017). A resistência da parede celular das bactérias depende da existência do peptidoglicano (PG), que confere rigidez estrutural à bactéria (ZHOU *et al.*, 2022). O PG desempenha um papel essencial na manutenção das características

morfológicas bacterianas e protege as células contra flutuações na pressão osmótica interna (KAWAI *et al.*, 2023).

Diferentemente das bactérias Gram-positivas, as bactérias Gram-negativas possuem duas membranas. A membrana externa é composta principalmente por lipopolissacarídeos, desempenhando um papel crucial na resistência antimicrobiana (RAM), no transporte e na conformação de proteínas extracelulares, na absorção de nutrientes e em várias transduções de sinal (ZHOU *et al.*, 2022).

Dentre os antibióticos responsáveis por interferir na síntese da parede celular, destacam-se os *β*-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), glicopeptídeos, lipoglicopeptídeos, isoniazidas, etambutol, fosfomicinas e peptídeos cíclicos (PCs) do tipo bacitracina (FALAGAS *et al.*, 2016; KHAN; MANIALAWY; SIRAKI, 2019; LEE; NGUYEN, 2022; TENOVER, 2006). Já a ação dos lipopeptídeos, pirazinamida e polimixina envolvem a perturbação da membrana celular (PUCCI *et al.*, 2017; BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019).

2.2.1.1 Antibióticos *β*-Lactâmicos

Os antibióticos *β*-lactâmicos constituem uma das classes de agentes antibacterianos mais amplamente empregadas globalmente (LIMA *et al.*, 2020). Esses agentes bactericidas interrompem a síntese da parede celular (SPC) bacteriana ao se ligarem de forma covalente às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), as quais desempenham papel nas etapas finais da reticulação do peptidoglicano (PG) em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (BUSH; BRADFORD, 2016). As PBPs, originalmente identificadas e nomeadas devido à sua afinidade com a penicilina, são proteínas associadas à membrana envolvidas na biossíntese do PG (SHARIFZADEH *et al.*, 2020). Apesar da afinidade primária com a penicilina, as PBPs também interagem com carbapenêmicos, cefalosporinas e monobactâmicos (DEAN *et al.*, 2018; ASLAM *et al.*, 2020; NAUTA; HO; ELLERMEIER, 2021).

A resistência aos *β*-lactâmicos, mediada por enzimas, é desencadeada pela atividade das *β*-lactamases, as quais são enzimas que promovem a hidrólise da amida *β*-lactâmica (TOOKE *et al.*, 2019). Os antibióticos *β*-lactâmicos exercem seus

efeitos bactericidas inibindo as enzimas associadas à SPC, ou seja, as PBPs (BONOMO, 2017).

2.2.1.2 Glicopeptídeos e Lipoglicopeptídeos

Os glicopeptídeos são reconhecidos como agentes bactericidas de ação lenta, exigindo sua administração em conjunto com outro agente, sendo uma alternativa aos *β*-lactâmicos para pacientes com hipersensibilidade à penicilina ou em casos de infecções por bactérias resistentes (GOULD, 2010). Por outro lado, os lipoglicopeptídeos são derivados semissintéticos de glicopeptídeos de ocorrência natural, obtidos por meio de modificações físico-químicas nas moléculas de glicopeptídeos (MURRAY; ARIAS; NANNINI, 2015).

Um exemplo de mecanismo de resistência contra os glicopeptídeos é observado principalmente em enterococos e estafilococos, através da expressão de genes (denominados *van*) que codificam proteínas capazes de reprogramar a síntese da parede celular, evitando, assim, a ação do antibiótico (BINDA; MARINELLI; MARCONE, 2014).

2.2.1.3 Fosfomicina

A fosfomicina, um antibiótico bactericida de origem natural, tem sido utilizado por mais de duas décadas na Espanha, Alemanha, França, Japão, Brasil e África do Sul para tratar infecções do trato urinário (ITUs) (SILVER, 2017), bem como no combate a infecções causadas por bactérias suscetíveis e multirresistentes (MDR) (FALAGAS *et al.*, 2016). A ação da fosfomicina se manifesta ao interferir na síntese da parede celular (SPC) de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inibindo a etapa inicial no citoplasma da SPC, que envolve a fosfoenolpiruvato sintetase, e a formação do precursor do peptidoglicano UDP ácido N-acetilmurâmico (UDP-MurNAc) (MICHALOPOULOS; LIVADITIS; GOUGOUTAS, 2011; FALAGAS *et al.*, 2016).

2.2.1.4 Outros inibidores da parede celular

A isoniazida é um dos compostos ativos amplamente empregados no tratamento da tuberculose globalmente (UNISSA *et al.*, 2016). Seu modo de ação conhecido consiste na inibição da síntese da parede celular bacteriana, ocorrendo após sua ativação pela enzima *catalase-peroxidase* bacteriana *KatG* no *Mycobacterium tuberculosis* (KHAN; MANIALAWY; SIRAKI, 2019).

O etambutol é parte das terapias primárias para a tuberculose, juntamente com a rifampicina, a isoniazida e a pirazinamida, sendo classificado como um medicamento bacteriostático. Ele interfere na biossíntese de arabinogalactana na parede celular, interrompendo a multiplicação dos bacilos. Entretanto, os mecanismos moleculares subjacentes à ação do etambutol ainda permanecem desconhecidos (LEE; NGUYEN, 2022).

Os peptídeos cíclicos (PCs) constituem uma classe de peptídeos extensivamente estudada nas últimas décadas, aplicada em diversas áreas, como na indústria farmacêutica (devido à sua atividade antibacteriana ou antitumoral), aplicações agrícolas (como fungicidas), diagnósticos e vacinas (CLARO; BASTOS; GARCIA-FANDINO, 2018). Os PCs são peptídeos antimicrobianos que adotam uma conformação em forma de anel, formada pela alternância de D- e L-aminoácidos (D,LPCs), podendo se automontar em nanotubos (ANPC – Automontagem em Nanotubos de Peptídeos Cíclicos) por empilhamento paralelo e/ou antiparalelo (CABEZÓN *et al.*, 2023).

2.2.1.5 Desestabilizadores da membrana celular

Antibióticos polimixínicos, especialmente a colistina, desempenham papéis cruciais na medicina e na agricultura. No entanto, o uso excessivo na agricultura representa uma ameaça aos tratamentos de infecções humanas (KHONDKER; RHEINSTÄDTER, 2020). As polimixinas são agentes catiônicos de superfície ativa que perturbam a estrutura dos fosfolipídios da membrana celular (MC), aumentando a permeabilidade celular por uma ação semelhante à do detergente. Elas são particularmente eficazes contra bactérias Gram-negativas, que possuem mais fosfolipídios no citoplasma e nas membranas externas (MADDISON; WATSON;

ELLIOTT, 2008). Embora a resistência a polimixinas seja relativamente rara, os níveis de resistência a essa classe estão aumentando, acompanhando a preocupante situação global de resistência antimicrobiana (RAM) (LÓPEZ-JACOME *et al.*, 2022).

A daptomicina é um antibiótico lipopeptídico que atua como inibidor da síntese do ácido lipoteicóico, demonstrando potente atividade bactericida contra a maioria das bactérias Gram-positivas clinicamente relevantes, inclusive cepas resistentes (ARONSON, 2016a). Esse antibiótico tem como alvo as membranas celulares bacterianas e tem sido eficaz no tratamento de infecções de pele e tecidos moles causadas por bactérias Gram-positivas, incluindo espécies de *Enterococcus faecalis* (FOZO; RUCKS, 2016).

A pirazinamida é um antibiótico com eficácia específica contra o *M. tuberculosis* (LAMONT; DILLON; BAUGHN, 2020). O mecanismo de ação da pirazinamida é pouco compreendido, destacando-se de antibióticos convencionais devido à sua atividade limitada ou ausente contra o crescimento do bacilo da tuberculose. Sua ação é principalmente direcionada aos bacilos persistentes que não estão em fase de crescimento (ZHANG *et al.*, 2014). Sabe-se que o ácido pirazinóico, a porção ativa da pirazinamida, pode desenergizar a membrana, comprometendo o potencial da membrana e afetando a função de transporte (ZHANG, 2003).

2.2.1.6 Composto amônio quaternário QAC

Compostos de amônio quaternário (*QACs - Quaternary ammonium compounds*) são agentes ativos de membrana que interagem com a membrana celular de bactérias e a membrana plasmática de leveduras. Sua atividade hidrofóbica é eficaz contra os lipídios virais, e esses compostos também interagem com alvos intracelulares, além de se ligarem ao DNA (GERBA, 2015). Cerca de 80% dos produtos no mercado que contêm *QACs* são biocidas e desinfetantes, enquanto o restante está presente em condicionadores de cabelo, xampus, cremes para enxaguar, agentes emulsificantes e componentes de desodorantes (HORA *et al.*, 2020). O uso excessivo desses agentes antimicrobianos tornou-se uma preocupação mais proeminente após a pandemia da Covid-19 (MOHAPATRA *et al.*, 2023).

2.2.2 Inibidores da síntese proteica: Subunidade ribossômica 30S e 50S

O ribossomo representa um alvo crucial para antibióticos, interferindo na tradução do RNA mensageiro (mRNA) ou bloqueando a formação de ligações peptídicas no centro da *peptidil transferase* (LAMBERT, 2012). Antibióticos com ação direcionada ao ribossomo podem atuar em duas subunidades ribossômicas diferentes, 30S e 50S.

2.2.2.1 Inibidores da Subunidade Ribossômica 30S

O 30S é a menor subunidade ribossomal dos procariontes, uma estrutura complexa formada por RNA 16S e ribonucleoproteínas, essenciais para a tradução do mRNA e alvo de antibióticos como aminoglicosídeos, tetraciclinas e glicilciclinas (LAMBERT, 2012).

Os antibióticos aminoglicosídeos são derivados de actinomicetos, podendo ser naturais ou semissintéticos (KRAUSE *et al.*, 2016; GERMOVSEK; BARKER; SHARLAND, 2017). Essa classe liga-se ao sítio-A (aminoacil) do RNA ribossômico 16S da subunidade 30S de células bacterianas, interrompendo a síntese proteica (RECHT; PUGLISI, 2001). São utilizados no tratamento de grande parte das infecções bacterianas aeróbicas gram-negativas e anaeróbias facultativas, além de serem empregados em infecções bacterianas gram-positivas em combinação com outros antibacterianos (PALMER; SKINNER, 2024). A resistência aos aminoglicosídeos envolve a modificação enzimática desses compostos e a metilação do 16S rRNA (ZHANG *et al.*, 2023a).

Tetraciclinas, isoladas de várias espécies de *Streptomyces*, inibem a síntese proteica ao impedir a ligação do *aminoacil-tRNA* ao sítio-A, resultando na interrupção da formação de ligações de hidrogênio entre aminoácidos (CHOPRA; ROBERTS, 2001; RIDLEY; KHOSLA, 2009). Possuem amplo espectro de atividade, sendo efetivas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, espiroquetas, bactérias intracelulares obrigatórias e parasitas protozoários (GROSSMAN, 2016). Essas substâncias são utilizadas no tratamento de diversas condições clínicas, como infecções do trato urinário, infecções do trato respiratório, acne, rosácea, antraz, peste bubônica, malária, elefantíase, sífilis, doença de Lyme, entre outras (FICAI;

GRUMEZESCU, 2017). A resistência a essa classe pode ocorrer por meio da aquisição de genes *tet*, frequentes em bactérias gram-negativas, que incluem mecanismos como bombas de efluxo, proteção ribossômica, desativação enzimática ou mutações (JAHANTIGH *et al.*, 2020).

As glicilciclinas são produtos semissintéticos análogos às tetraciclinas, sendo ativas contra inúmeras bactérias resistentes a tetraciclinas e outras classes de antibióticos (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

2.2.2.2 Inibidores da Subunidade Ribossômica 50S

A subunidade ribossômica 50S constitui a maior subunidade do ribossomo 70S em procariotos, composta por 30 proteínas ribossômicas, RNA 5S e 25S, este último dividido em seis grandes domínios (LAMBERT, 2012). As proteínas da subunidade 50S desempenham um papel crucial na estabilização das interações entre domínios, essenciais para a manutenção da integridade estrutural da subunidade (KLEIN; MOORE; STEITZ, 2004). Essa subunidade é responsável por catalisar a reação de *peptidil-transferase* na síntese de proteínas direcionada por mRNA (BAN *et al.*, 1999).

Dentre os antibióticos que têm a subunidade 50S como alvo, destacam-se os Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas A (dalfopristina) e B (quinupristina), conhecidos como grupo *MLS* (*Macrolide-Lincosamide-Streptogramin*) (KWON, 2017). Os *MLS* constituem famílias distintas de antibióticos predominantemente bacteriostáticos, com estruturas químicas diversas, mas com espectro e mecanismos antibacterianos semelhantes (UNGUREANU, 2010).

Os macrolídeos são potentes inibidores da síntese proteica da subunidade 50S, com estudos sugerindo que também podem bloquear a formação da subunidade em células em crescimento (MA; GINSBERG; SPIGELMAN, 2007). Esses antibióticos, caracterizados por um grande anel de lactona macrocíclica substituído por alguns açúcares incomuns, interferem na translocação do mRNA no ribossomo bacteriano (GREENWOOD *et al.*, 2012). Quase todos os antibióticos macrolídeos são produzidos por cepas de *Streptomyces* e são ativos principalmente contra bactérias Gram-positivas, com atividade limitada contra bactérias Gram-negativas (DINOS, 2017). Mecanismos de resistência aos macrolídeos podem

envolver alterações em resíduos de RNA ribossômico 23S (rRNA) ou mutações nas proteínas ribossômicas L4 ou L22 que afetam a interação do ribossomo com o antibiótico (FYFE *et al.*, 2016).

Assim como os macrolídeos, as lincosamidas são utilizadas principalmente no tratamento de infecções bacterianas Gram-positivas, especialmente em casos de resistência ou intolerância às penicilinas, sendo altamente eficazes contra anaeróbios, com fraca atividade contra aeróbios Gram-negativos (CONSTABLE *et al.*, 2017). As lincosamidas são produzidas por algumas espécies de *Streptomyces* e *Micromonospora halophytica* (LÓPEZ-JACOME *et al.*, 2022). Lincosamidas, cloranfenicol e macrolídeos possuem ligações semelhantes na subunidade, e o uso concomitante desses antimicrobianos pode reduzir a eficácia global (CONSTABLE *et al.*, 2017).

As estreptograminas constituem um grupo de antibióticos PCs derivados da pristinamicina de ocorrência natural, e que inibem a síntese de proteínas bacterianas através da subunidade ribossômica 50S (PADBERG, 2015). Dividem-se em dois grupos: as estreptograminas do grupo A, sintetizadas por *Streptomyces virginiae* e contêm anéis insaturados de 23 membros com lactona e ligações peptídicas, e estreptograminas do grupo B, que são depsipeptídeos hexa ou hepta cíclicos produzidos por vários membros do gênero *Streptomyces* (ARONSON, 2016b). Os dois grupos atuam sinergicamente, explicado pela modificação na conformação do ribossomo causada pela ligação do componente do grupo A, expondo um local de fixação para o componente do grupo B (VAN BAMBEKE *et al.*, 2010).

Além das *MLS*, outras famílias de antibióticos e antimicrobianos têm a subunidade 50S como alvo, incluindo anfénicóis, oxazolidinonas e fusidanos. Os anfenicóis são uma classe de antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro, caracterizados por uma estrutura fenilpropanoide (GUIDI *et al.*, 2017). São ativos contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo alguns anaeróbios, sendo utilizados para o tratamento da febre tifoide, principalmente em países de baixa e média renda (EMA/CVMP/CHMP, 2019). As oxazolidinonas, uma classe recente de antibióticos sintéticos.

2.2.2.3 Inibidores do Fator de Alongamento G (*EF-G*): Fusidanos

Os antibióticos esteroidais do tipo fusidano, como o ácido fusídico, ácido helvólico e cefalosporina P1, apresentam estruturas centrais muito semelhantes, mas são produzidos por fungos pertencentes a grupos taxonômicos distintos (LI *et al.*, 2020). Representam os únicos antibióticos clinicamente conhecidos que têm como alvo o fator de alongamento G (*EF-G* - *elongation factor G*) para inibir a síntese proteica bacteriana (LIU; BEGLEY, 2020).

O *EF-G* realiza a translocação do *peptidil-tRNA* do sítio A para o sítio P do ribossomo (LILJAS, 2013). Como o sítio A deve estar aberto para a ligação do próximo *aminoacil-tRNA*, o *peptidil-tRNA* deve ser deslocado para o sítio P. O *EF-G* utiliza um *GTP* (Trifosfato de guanosina - *guanosine triphosphate*), fornecendo energia para catalisar esse processo de translocação, durante o qual tanto o mRNA quanto o *peptidil-tRNA* se movem pela distância de um códon (PELLEY, 2007). Durante a translocação ribossômica, a ligação do *EF-G* ao ribossomo pré-translocacional induz uma rotação semelhante a uma catraca da subunidade 30S em relação à subunidade 50S na direção do movimento do mRNA (VALLE *et al.*, 2003).

O ácido fusídico é um antibiótico antiestafilocócico oral utilizado na Europa há mais de 40 anos para tratar infecções de pele, assim como infecções ósseas e articulares crônicas (FERNANDES, 2016). Esse antibiótico fusidano bloqueia o *EF-G* no ribossomo após a hidrólise do *GTP* (GUO *et al.*, 2012). De maneira similar, durante o processo de reciclagem, no qual múltiplas rodadas do fator de reciclagem de ribossomo (FRR) e ação do *EF-G*, juntamente com a hidrólise de *GTP*, são necessárias para dividir o ribossomo 70S em subunidades, o ácido fusídico impede a renovação do EF-G, prendendo-o no ribossomo com o *GDP* (G*uanosina difosfato* - *Guanosine diphosphate*) e inibindo o FRR (KORIPELLA *et al.*, 2012; BORG; PAVLOV; EHRENBERG, 2016).

2.2.3 Inibidores da Síntese do DNA

A replicação do DNA é inibida de maneira indireta por meio do direcionamento das girases do DNA, sendo que, até o momento, não existem antibióticos que atuem na inibição direta do replissoma (SANTOS; LAMERS, 2020).

2.2.3.1 Quinolonas e Fluoroquinolonas

As quinolonas são antimicrobianos sintéticos com efeito bactericida e atividade de amplo espectro, capazes de inibir bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo anaeróbios, ao interferir na síntese de DNA e inibir sua via de replicação (PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019). Os antibacterianos quinolônicos têm como alvos duas enzimas bacterianas essenciais, a *DNA* girase e a *DNA topoisomerase IV* (DRLICA; ZHAO; MALIK, 2009). A primeira quinolona descoberta é o antimicrobiano utilizado no tratamento da malária, chamado cloroquina (BISACCHI, 2015). Posteriormente, pesquisas e experimentações mostraram que a adição de flúor na posição C6 levou a um aumento da atividade das quinolonas, resultando no surgimento das fluoroquinolonas (MARTENS; DEMAIN; KURTBÖKE, 2017).

As fluoroquinolonas constituem uma família de agentes antimicrobianos sistêmicos de amplo espectro, efetivos contra patógenos importantes que causam diversas infecções, incluindo infecções do trato urinário (ITUs), infecções gastrointestinais (ITGs), infecções do trato respiratório (ITRs), doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) e infecções de pele (BRAR *et al.*, 2020). Antibióticos dessa classe são ativos contra uma ampla gama de organismos aeróbios gram-positivos e gram-negativos (LIVERTOX, 2012a).

2.2.3.2 Grupo Nitrocomposto

Grupos nitro em compostos são considerados "indesejáveis" na descoberta medicamentosa devido a possíveis problemas de toxicidade, como mutagenicidade e hepatotoxicidade (ANG *et al.*, 2017). Antimicrobianos contendo heterociclos nitroaromáticos não são exceção; além de nitroimidazóis e nitrofuranos, eles também estão presentes em cloranfenicóis (anfenicol) e outros fármacos (BOSQUESI *et al.*, 2008; KANNIGADU; N'DA, 2020).

Os nitroimidazóis são antimicrobianos que pertencem a um grupo de compostos nitroheterocíclicos com atividade de amplo espectro contra uma variedade de organismos, incluindo micobactérias, bactérias anaeróbias Gram-positivas e Gramnegativas (ZHANG *et al.*, 2019). Preocupações com a toxicidade

potencial do grupo nitro presente nos nitroimidazóis limitaram seu desenvolvimento no passado, sendo impulsionado em grande parte atualmente pela crise de RAM (ANG *et al.*, 2017). O metronidazol é um antimicrobiano nitroimidazol com atividade contra protozoários e bactérias anaeróbias, mas sem atividade contra outras bactérias (DAVIS; PAPICH, 2014). Seu mecanismo de ação começa com a rápida absorção do medicamento pela célula bacteriana e subsequente interação com o DNA, levando à quebra da fita de DNA e à desestabilização fatal da hélice de DNA, ocasionando a inibição da síntese proteica (GILES; ROBERTS, 2022).

Nitrofuranos são agentes antimicrobianos sintéticos com amplo espectro contra diversas espécies de bactérias e protozoários (MOLOGNONI; DAGUER; HOFF, 2021). Os Nitrofuranos são usados no tratamento de infecções do trato gastrointestinal, dermatológicas e salmonelose, mas a carcinogenicidade e mutagenicidade desses compostos e de seus metabólitos levaram à proibição de sua utilização em animais produtores de alimentos em diversos países (PACHECO-SILVA; SOUZA; CALDAS, 2014). Inclusive, foi proibido, conforme a portaria nº 448, de 10/09/1998, "a fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparação farmacêutica de uso veterinário, nas rações e aditivos alimentares, em todo o território nacional, da nitrofurazona e da furazolidona, em animais destinados ao consumo humano" (BRASIL, 1998). Os Nitrofuranos ainda são utilizados na medicina humana, e os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos citotóxicos dos medicamentos nitrofuranos não são claramente compreendidos (GALLARDO-GARRIDO *et al.*, 2020; MOLOGNONI; DAGUER; HOFF, 2021). O mecanismo de ação dos derivados nitrofuranos furazolidonas e nitrofurantoinas interfere na replicação do DNA e na produção de proteínas (KUHLMANN; FLECKENSTEIN, 2017; LE; RAKONJAC, 2021).

2.2.4 Inibidores da Síntese do RNA

A transcrição, que envolve a conversão da informação genética do DNA em RNA, representa um dos processos fundamentais no dogma central da biologia molecular e é universal em todos os organismos celulares (CHEN; BOYACI; CAMPBELL, 2021). O RNA desempenha um papel crucial na síntese de proteínas através da tradução, carregando informações genéticas que são traduzidas pelos

ribossomos em várias proteínas necessárias aos processos celulares (WANG; FARHANA, 2023).

2.2.4.1 Ansamicinas

As ansamicinas derivam da 3-piperazinorifamicina (GIBSON, 1995). São antibióticos macrocíclicos lipofílicos que se difundem facilmente através das membranas e são compostos por dois anéis aromáticos, contendo uma quinona, interligados por uma longa cadeia, conhecida como 'ansa'. Essa estrutura confere um caráter rígido à molécula como um todo (VAN BAMBEKE *et al.*, 2017). A rifampicina e outros compostos do grupo das ansamicinas inibem a síntese de RNA pela inativação da *RNA polimerase DNA-dependente*, uma enzima de múltiplas subunidades responsável pela transcrição em bactérias (CHOPRA, 2007, 2010). As ansamicinas demonstraram ser moléculas altamente potentes, exibindo atividades anticancerígenas, antibacterianas e antivirais (VARDANYAN; HRUBY, 2016).

1.2.4.2 Mupirocina

A mupirocina, também conhecida como ácido pseudomônico, é um medicamento derivado do ácido crotônico extraído de Pseudomonas fluorescens, produzido por sintases modulares de policetídeo (KHOSHNOOD *et al.*, 2019). Este composto inibe o RNA bacteriano e a síntese de proteínas ao se ligar à *isoleucil tRNA* sintetase bacteriana. Essa enzima catalisa a formação de *isoleucil tRNA* a partir de isoleucina e tRNA, impedindo a incorporação de isoleucina nas cadeias proteicas e resultando na interrupção da síntese proteica (VAN BAMBEKE *et al.*, 2017). Antibióticos dessa classe demonstram atividade contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (HILL; STAUNTON, 2010).

2.2.5 Metabolismo Intermediário: Inibidores da Síntese do Ácido Fólico

A via do ácido fólico (folato) representa um potencial alvo para antibióticos, uma vez que desempenha um papel crucial na divisão celular, sendo essencial para

a biossíntese do ácido nucleico (DNA) (LADE; KIM, 2021). O ácido fólico não consegue atravessar as paredes celulares bacterianas por difusão ou transporte ativo. Portanto, as bactérias realizam a síntese do ácido fólico a partir do ácido para-aminobenzóico (PABA - para-amino-benzoic acid) (CONSTABLE *et al.*, 2017).

2.2.5.1 Inibidores da diidrofolato redutase (*DHFR*)

A trimetoprima atua inibindo a diidrofolato redutase (*DHFR* - *Dihydrofolate reductase*) bacteriana, uma etapa subsequente à síntese do ácido fólico bloqueada pelas sulfonamidas (ZINNER; MAYER, 2015). A *DHFR* é uma enzima crucial no metabolismo de redução do folato, necessária para a doação de átomos de carbono essenciais na síntese *de novo* (a partir de precursores simples) de purinas, pirimidinas e aminoácidos, sendo o alvo intracelular de quatro aminoácidos análogos do ácido fólico (WALL; SCHUETZ, 2002; KRUPENKO, 2020). A trimetoprima exibe atividade bacteriostática de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Em muitas Infecções do Trato Urinário (ITUs) e infecções do trato respiratório, a trimetoprima sozinha proporciona resultados semelhantes à combinação com sulfametoxazol (WALLER; SAMPSON, 2018). Raramente, a trimetoprima é utilizada como agente único; seu uso quase sempre ocorre em combinação com o sulfametoxazol para efeitos sinérgicos. Apesar de possuir atividade bacteriostática quando usada isoladamente, a trimetoprima demonstra ação bactericida quando combinada com sulfonamidas (KESTER; KARPA, 2012).

2.2.5.2 Inibidores do Ácido Fólico

Sulfonamidas são compostos sintéticos simples relacionados ao ácido paraaminobenzóico (PABA), interferindo na formação do ácido fólico (ANADÓN; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, 2014; FANNING; WANG; LEONARD, 2014). As sulfonamidas, por si só, apresentam atividade bacteriostática, mas quando combinadas com trimetoprima, podem manifestar ação bactericida (MADDISON; WATSON; ELLIOTT, 2008). As sulfonamidas constituem agentes antimicrobianos de amplo espectro, inibindo o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, Actinomicetos, Chlamydiae, e alguns protozoários, como Toxoplasma e

Plasmodia (SCHOLAR, 2007). Apesar do aumento da resistência antimicrobiana (RAB) a essa classe, as sulfonamidas ainda são empregadas, especialmente no tratamento de Infecções do Trato Urinário (ITUs) em combinação com trimetoprima, além de serem utilizadas no tratamento ou prevenção de infecções parasitárias (toxoplasmose, Pneumocystis jirovecii) e maláricas, geralmente associadas a trimetoprima ou pirimetamina (LIVERTOX, 2012b).

2.3 ANTIMICROBIANOS CRITICAMENTE IMPORTANTES PARA A MEDICINA HUMANA

A Lista de antimicrobianos criticamente importantes para a medicina humana, conhecida como Lista OMS-ACI (anexo 1) foi inicialmente elaborada com base nas recomendações de duas reuniões consecutivas de especialistas organizadas pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations), a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE ou WOAH – World Organisation for Animal Health) e a própria OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018a).

A OMS-ACI tem como objetivo classificar os antimicrobianos clinicamente essenciais para a gestão do risco de Resistência Antimicrobiana (RAM) decorrente do uso em animais não humanos. A categorização dessas classes antimicrobianas para uso em medicina humana é determinada por dois critérios principais: Criticamente Importantes, Altamente Importantes ou Importantes. A classificação de Criticamente Importantes recebe prioridade com base em três fatores adicionais, conforme apresentado no Quadro1.

Os antimicrobianos empregados na prática clínica humana, ou seja, aqueles considerados clinicamente importantes, são classificados segundo critérios específicos como "Criticamente Importantes", "Altamente Importantes" ou "Importantes" para a medicina humana:

- Criticamente Importante: As classes antimicrobianas que satisfazem tanto C1 quanto C2 são consideradas de extrema importância para a medicina humana.
- Altamente Importante: Classes antimicrobianas que atendem a C1 ou C2 são consideradas altamente importantes para a medicina humana.

- Importante: As classes antimicrobianas utilizadas em humanos que não atendem a C1 nem C2 são consideradas importantes para a medicina humana.

Quadro 1. Critérios de caracterização de criticidade da lista OMS-ACI.

Critério	Explicação
Critério 1 (C1): A classe antimicrobiana é a única, ou uma das limitadas terapias disponíveis, para tratar infecções bacterianas graves em pessoas.	É evidente que os antimicrobianos, que são a única ou uma das poucas alternativas para o tratamento de infecções bacterianas graves em humanos, ocupam um lugar importante na medicina. Embora a gravidade da doença possa estar relacionada com o local da infecção (por exemplo, pneumonia, meningite) ou com o hospedeiro (por ex. criança, imunossuprimido), as infecções graves têm maior probabilidade de resultar em aumento da morbilidade ou mortalidade se não forem tratadas porque não existem agentes antibacterianos eficazes disponíveis.
Critério 2 (C2): A classe antimicrobiana é usada para tratar infecções em pessoas causadas por: (1) bactérias que podem ser transmitidas aos seres humanos a partir de fontes não humanas, ou (2) bactérias que podem adquirir genes de resistência de fontes não humanas.	Agentes antimicrobianos utilizados para tratar doenças causadas por bactérias que podem ser transmitidas aos seres humanos a partir de fontes não humanas são considerados de maior importância pois estas infecções são mais passíveis de estratégias de gestão de riscos relacionadas com a utilização não humana de antimicrobianos. Os organismos que causam doenças não precisam ser resistentes aos medicamentos atualmente. Porém, o potencial de transmissão mostra o caminho para aquisição de resistência agora ou no futuro. A evidência para uma ligação entre fontes não humanas e a transmissão aos seres humanos é maior para certas bactérias (por exemplo, *Salmonella* spp. não tifoides, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*). Organismos comensais de fontes não humanas (animais, água, alimentos ou meio ambiente) também podem transmitir determinantes de resistência a patógenos humanos; os próprios comensais também podem ser patogênicos em hospedeiros imunossuprimidos. É importante notar que a transmissão de tais organismos ou dos seus genes não precisa de ser demonstrada; pelo contrário, considerase suficiente que exista o potencial para tal transmissão.

Fonte: adaptado de World Health Organization (2018a).

2.4 *INTEGRONS*

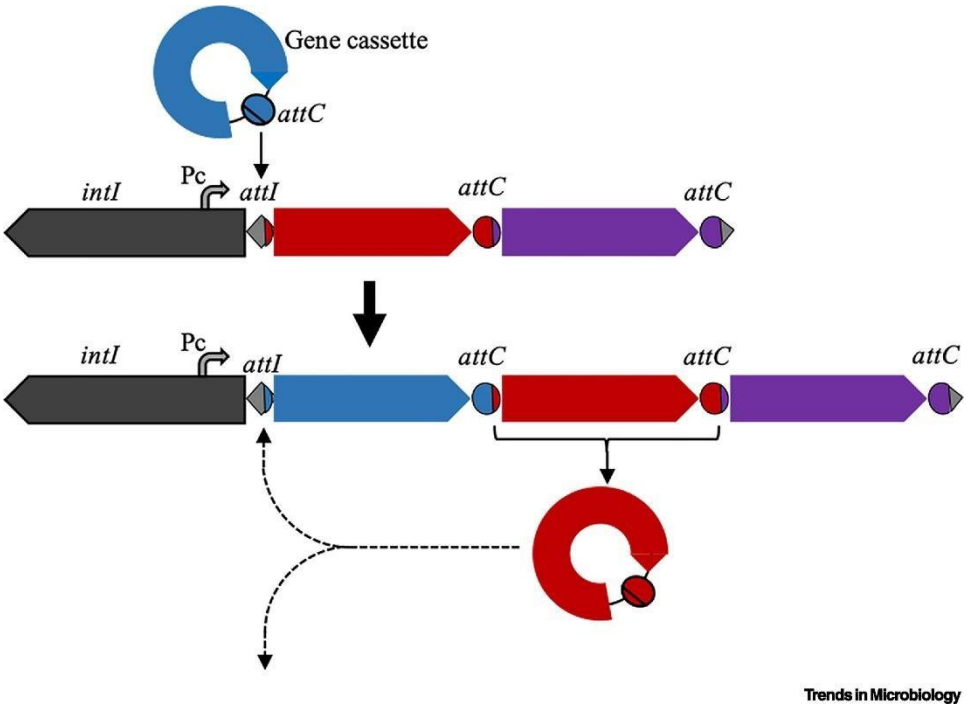
Os *integrons* foram identificados no contexto de investigações sobre a base genética da resistência a antibióticos em patógenos Gram-negativos em 1989, por Harold W. Stokes e Ruth M. Hall (GHALY *et al.*, 2020; STOKES; HALL, 1989). Estes elementos genéticos desempenham uma função crucial na aquisição, expressão e disseminação de genes de resistência a antibióticos em bactérias (BHAT *et al.*, 2023).

Cada *integron* é composto por uma região integrase-*integron* (*intI*), um promotor (*pc*) e um sítio de recombinação (*attI*) (Figura 1). Os *integrons* capturam e expressam pequenos elementos móveis, conhecidos como genes cassetes, que normalmente consistem em quadros de leitura abertos (*ORF – Open Read Frames*) e um sítio de recombinação (*attI*). Os cassetes podem incorporar genes de resistência a antibióticos através de recombinação sítio-específica (AKRAMI; RAJABNIA; VAZIFESIRZARI, 2019). A recombinação no *integron* é regulada pela proteína *IntI*, uma tirosina *recombinase* distinta, capaz de integrar, excisar e reorganizar cassetes de integron através de diferentes reações entre os locais de ligação na plataforma do integron (*attI*) e aqueles nos cassetes (*attC*) (ESCUDERO; LOOT; MAZEL, 2018). Cassetes que estão distantes da região *pc* podem não ser expressos, mas podem ser excisados e reinseridos no sítio *attI*, onde sua expressão é maximizada, ou mesmo descartados (GHALY *et al.*, 2020).

Os *integrons* podem ser agrupados em duas categorias principais: os *integrons* de resistência (IR), que transportam predominantemente cassetes de genes que codificam resistência a antibióticos e podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídeos (GIDLA *et al.*, 2023); e *superintegrons* (*SI*), originários do cromossomo, que carregam mais de 200 cassetes de genes com diversas funções (KUMAR *et al.*, 2020). Além disso, os *integrons* podem ser classificados como *integrons* cromossômicos (ICs) ou *integrons* móveis (IMs). A localização dos *integrons* tem implicações funcionais e evolutivas significativas, uma vez que a mobilidade facilita a penetração em novos táxons, enquanto as localizações cromossômicas podem se tornar locais para gerar complexidade genômica e diversidade fenotípica (GILLINGS, 2014).

Os ICs, também conhecidos como *integrons* cromossômicos sedentários (ICSs), são amplamente encontrados nos genomas de bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*. Geralmente distribuídos em diversos genomas de proteobactérias *β* e *γ*, esses elementos são sugeridos como ancestrais dos *integrons* móveis (IMs), podendo criar um reservatório de genes cassetes suscetíveis a serem capturados e disseminados pelos IMs (VIT *et al.*, 2021). Os IMs estão comumente associados a elementos genéticos móveis, como *transposons*, ilhas genômicas e plasmídeos, facilitando sua disseminação por transferência horizontal (NUÑEZ *et al.*, 2022). Devido à sua função de transportar cassetes de resistência a antimicrobianos (RAM), os IMs também são chamados de IRs (AKRAMI; RAJABNIA; VAZIFESIRZARI, 2019).

Figura 1. Componentes estruturais de um *integron* incluem a presença de uma *integron-integrase* (*intI*), um promotor (pc), sítios de recombinação *attC* e *attI* e genes cassetes, estes podem se excisados e reinseridos próximo ao pc, ou descartados.



Fonte: GHALY *et al.*, 2020.

Até o momento, foram identificadas cinco classes diferentes de IMs com base nas sequências das *integrases* codificadas. As classes *Integron* 1 e 3 (*intI1* e *intI3*) são frequentemente encontradas associadas ao Tn402, enquanto os *integrons* da classe 2 (*intI2*) estão quase exclusivamente ligados aos derivados do Tn7. Estas três classes são as mais envolvidas na propagação da Resistência a Múltiplos

Medicamentos (MRD) e são de grande importância do ponto de vista médico (ESCUDERO *et al.*, 2015). O *integron* classe 4 (*intISXT* ou, anteriormente, *intI9*) está localizado em um dos subconjuntos *SXT* em *Vibrio cholerae*, e o de classe 5 (*intIHS*) foi identificado em um *transposon* composto no plasmídeo de *Vibrio salmonicida* pRSV1(KAUSHIK *et al.*, 2018).

2.4.1 *Integrons* como agentes na disseminação e aquisição da RAM

Qualquer bactéria que contenha um *integron* tem acesso a uma ampla variedade de diversidade genética presente no metagenoma do cassete, tornando-se um vasto reservatório de novidades genômicas (GILLINGS, 2014; GHALY *et al.*, 2020). Um participante crucial na disseminação da resistência a antimicrobianos (RAM) é o *integron* de classe 1. Embora esse elemento, por si só, não confira resistência, tem sido extraordinariamente bem-sucedido na captura e expressão de diversos genes de resistência em contextos clínicos (GILLINGS, 2017).

Os *integrons* exibem uma diversidade extensa e oculta no ambiente natural, suscitando preocupações sobre seu potencial para contribuir à adaptação bacteriana. Devem ser encarados como um conjunto perigoso de determinantes de resistência na perspectiva da Saúde Única (*One Health*) (BHAT *et al.*, 2023). A presença de *integrons* foi identificada nos mais diversos ambientes, incluindo ambientes marinhos e de água doce (ZHANG *et al.*, 2022, 2023b), águas residuais ou de esgoto (LAMBA; AHAMMAD, 2017), solo (GHALY *et al.*, 2019), e até mesmo em geleiras na Antártida (ANTELO *et al.*, 2021).

Estudos recentes indicam que os *integrons* têm potencial para serem empregados como marcadores moleculares, fornecendo uma estimativa precisa e confiável da disseminação da RAM em diversos habitats. Eles são utilizados como biomarcadores para identificar micro-organismos que abrigam RAM contra uma variedade de antibióticos e medicamentos (BHAT *et al.*, 2023). *Integrons* são apontados como potenciais biomarcadores na identificação da RAM em quadros de sepsia aguda (BARRAUD *et al.*, 2021).

2.5 MECANISMO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência antimicrobiana (RAM) em bactérias pode ser adquirida de outros micro-organismos ou serem intrínsecas, embora as bactérias, como um grupo ou espécie, não sejam necessariamente uniformemente suscetíveis ou resistentes a qualquer agente antimicrobiano específico (C REYGAERT, 2018). A RAM intrínseca refere-se às propriedades inerentes de um microrganismo que limitam a ação de antimicrobianos; a adaptativa diz respeito à capacidade de um organismo se adaptar e sobreviver a diversas condições de estresse, alterando rapidamente seus transcriptomas em resposta a estímulos ambientais; e a adquirida ocorre quando um organismo inicialmente sensível a antibióticos se torna resistente por meio da aquisição de genes ou como resultado de mutações (ARZANLOU; CHAI; VENTER, 2017).

Bactérias apresentam diversos mecanismos de aquisição de resistência identificados como envolvidos na disseminação das RAM, incluindo transposons, bacteriófagos, plasmídeos e *integrons* (SABBAGH *et al.*, 2021). Um dos mecanismos mais eficientes para acumular RAM é delineado por *integrons*, que são sistemas de recombinação local-específicos capazes de recrutar *ORFs* dentro dos cassetes de genes móveis (Figura 1) (OSAGIE; OLALEKAN, 2019).

Existem cerca de seis principais mecanismos de resistência, naturais ou adquiridos ao longo do tempo, que incluem a redução da absorção de um medicamento, a modificação do alvo do medicamento, a inativação/modificação de um medicamento, efluxo ativo de um medicamento e a mudança de expressão (Quadro 2) (C REYGAERT, 2018; BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019).

A RAM geralmente resulta da destruição ou modificação do antibiótico, alterações no alvo (superprodução ou desvio, substituição e proteção do local-alvo, e mutações e alterações enzimáticas no local-alvo) e acúmulo reduzido de antibiótico devido à diminuição da permeabilidade e/ou aumento do efluxo (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020). A RAM é frequentemente codificada geneticamente e pode ocorrer através de vários mecanismos, incluindo super expressão ou duplicação de genes existentes, mutações pontuais ou aquisição de genes inteiramente novos por meio da transferência horizontal (BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019).

2.6 METAGENÔMICA E VIGILÂNCIA DOS GENES DE RESISTÊNCIA

A avaliação da RAM em patógenos geralmente é realizada por meio de testes laboratoriais, utilizando um teste de sensibilidade antimicrobiana. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um antibiótico capaz de inibir o crescimento visível de um microrganismo, sendo interpretada como "suscetível", "resistente" ou "intermediário" pelo laboratório (KOWALSKA-KROCHMAL; DUDEK-WICHER, 2021; SINGHAL; SINGH; GAUTAM, 2022). Este teste é conduzido em uma placa de microdiluição de 96 poços, que pode acomodar oito antibióticos (linhas A-H) e dez concentrações diferentes para cada antibiótico (colunas 1-10). As concentrações representam diluições do fármaco em uma escala dobrada a partir da concentração máxima testada, com controles positivos (bactérias não expostas a antibióticos) na coluna 11 e controles negativos (contendo apenas meio de cultura) na coluna 12 (BARNES V *et al.*, 2023). Portanto, a CIM é expressa como a concentração mais baixa de um agente antibacteriano, em *mg/L* (*µg/mL*), que sob condições rigorosamente controladas *in vitro*, impede completamente o crescimento visível da cepa de teste de um organismo (KOWALSKA-KROCHMAL; DUDEK-WICHER, 2021). Em casos de infecções bacterianas graves, onde os resultados dos testes de hemocultura ou suscetibilidade ainda não estão disponíveis, a terapia empírica com antibióticos de amplo espectro é frequentemente realizada (KOWALSKA-KROCHMAL; DUDEK-WICHER, 2021).

O método dependente de cultura (MDC) para avaliar a presença fenotípica de RAB em agentes patogênicos clínicos possui limitações inerentes. Essas restrições derivam do fato de que o MDC está restrito a bactérias que podem ser cultivadas em laboratório, excluindo aquelas ambientais que não são cultiváveis (ROCHA *et al.*, 2019). Além disso, o MDC apresenta outras desvantagens, como a demora, podendo levar dias para cultivar patógenos e testar a suscetibilidade, o que pode resultar no início do tratamento empírico com antibióticos antes da confirmação (KOWALSKA-KROCHMAL; DUDEK-WICHER, 2021). A resistência a medicamentos recentemente aprovados raramente é testada, pois os pontos de corte clinicamente relevantes para resistência podem ser difíceis de definir na ausência de associações claras entre CIMs e resultados (“Antibiotic susceptibility diagnostics for the future”, 2019).

O sequenciamento metagenômico, uma abordagem genômica independente de meio de cultura, tornou-se uma prática comum para caracterizar o potencial funcional de comunidades microbianas. Neste método, o DNA é extraído, preparado em bibliotecas e sequenciado em plataformas de leitura curta (*Illumina, Roche 454, Ion Torrent*) ou de leitura longa (*PacBio, Oxford Nanopore*) (TAŞ *et al.*, 2021). Os avanços nas tecnologias de sequenciamento de segunda e terceira geração, capazes de produzir grandes volumes de dados sequenciados de DNA a baixo custo, proporcionam uma alta profundidade de sequenciamento, permitindo a representação mesmo dos microrganismos menos abundantes em um ambiente (ROUMPEKA *et al.*, 2017). Ao contrário do sequenciamento do *amplicon* 16S rRNA, o sequenciamento metagenômico não está limitado a bactérias ou gênero, permitindo uma classificação ao nível de cepa, extração de sequência inteira e exploração da função das sequências. No entanto, apresenta a desvantagem da sensibilidade, destacando a possibilidade de contaminação (LIU *et al.*, 2021).

Todas as análises metagenômicas começam com o controle de qualidade das leituras de sequência, visando minimizar vieses e artefatos, removendo sequências adaptadoras (bases de baixa qualidade) e sequências contaminantes que não são do ambiente de origem (TAŞ *et al.*, 2021). Esse método beneficia a análise de vigilância de GRAMs em um ambiente ou amostra, possibilitando a detecção até mesmo de *integrons* pouco conhecidos ou descritos em uma região. Por exemplo, é possível detectar a presença de GRAMs praticamente inexistentes em relatórios hospitalares em nível local, mas que possuem grande potencial de transmissão em EGM entre grupos bacterianos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a prospecção de novos genes de resistência antimicrobiana e de *integrons* ainda não identificados em bibliotecas públicas de sequenciamento de metagenômica provenientes de águas residuais e de esgotos de diferentes países.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um fluxo de trabalho para a identificação de novos genes de resistência antimicrobiano.
- Desenvolver um fluxo de trabalho para a identificação de *integrons*.
- Comparar as anotações de genes de resistência utilizando os bancos de dados *CARD*, *NCBI*, *Arg-annot* e *Resfinder* disponíveis na ferramenta ABRicate.
- Detectar novos *integrons* nas bibliotecas através do Integron Finder.
- Comparar os genes de resistência identificados no presente trabalho com os do artigo original de descrição.

4 METODOLOGIA

Um delineamento metodológico integral simplificado deste estudo encontra-se detalhadamente descrito no anexo 2, abarcando o conjunto de procedimentos e etapas do fluxo de trabalho empregado.

4.1 OBTENÇÃO DE DADOS

O estudo baseou-se nas amostras obtidas por MUNK *et al.* (2022). Essas amostras foram coletadas em 101 países, sendo distribuídas garrafas vazias a todos os parceiros do projeto, que seguiram os critérios de inclusão estabelecidos. Exclusivamente amostras de esgoto urbano bruto, sem tratamento prévio, foram solicitadas. Em locais sem tratamento de esgoto, as amostras foram obtidas na saída, como em rios ou lagos. As coletas ocorreram semestralmente, nos meses de junho e novembro, considerando as variações sazonais globais.

As garrafas contendo esgoto congelado foram enviadas à *Technical University of Denmark* (*DTU*) para controle de qualidade, extração de DNA e concentração a vácuo quando necessário. Amostras contendo mais de 100 ng de DNA metagenômico, quantificado por *Qubit*, foram enviadas em gelo seco para preparação de biblioteca e sequenciamento de DNA pela *Admera Health* (Nova Jersey, EUA). As amostras mais recentes, não incluídas no estudo piloto anterior, foram sequenciadas no instrumento Illumina® NovaSeq6000©, diferindo do HiSeq4000©. O protocolo manteve constante o tamanho de fragmento, comprimentos de leitura e profundidade de sequenciamento, utilizando a preparação da biblioteca Kapa Hyper sem PCR.

4.2 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS E PRÉ-PROCESSAMENTOS DOS DADOS

Foram selecionadas 48 bibliotecas de sequenciamento metagenômico de esgoto provenientes de seis países distintos (Austrália, Zâmbia, Malásia, Brasil, Suíça e Estados Unidos), com o intuito de representar cada continente. A escolha dos países seguiu critérios específicos, priorizando aqueles com mais de cinco bibliotecas e estabelecendo um mínimo de dez para aqueles com uma quantidade

mais expressiva. A obtenção dessas bibliotecas constitui uma fase crucial deste estudo, uma vez que a disponibilidade desses dados no banco de dados *NCBI SRA* (S*equence Read Archive*) no BioProject PRJEB27054 possibilita uma abordagem abrangente. Bancos de dados públicos, como o *NCBI SRA*, são essenciais para a promoção do *open science* (ciência aberta), permitindo o compartilhamento e a colaboração efetiva entre pesquisadores.

Inicialmente, os acessos de cada país foram organizados em arquivos de texto (formato *.txt*) contendo exclusivamente os RUN IDs das bibliotecas. Dez bibliotecas foram selecionadas para a Austrália, Zâmbia e Estados Unidos, cinco para a Malásia, seis para o Brasil e sete para a Suíça (conforme anexo 3).

A utilização dos servidores Galaxy Australia (*usegalaxy.org.au*) e Galaxy Europe (*usegalaxy.eu*) foi baseada na disponibilidade de ferramentas específicas e na integridade operacional durante o estudo. Os arquivos de texto contendo os IDs de acesso foram carregados nessas plataformas, e a extração dos reads do NCBI SRA no formato FASTQ foi conduzida usando a ferramenta *Faster Download and Extract Reads in FASTQ* (*Galaxy Version 3.0.5+galaxy0*). Os arquivos resultantes foram então submetidos à análise de qualidade.

A análise de qualidade das bibliotecas em formato FASTQ foi realizada utilizando a ferramenta FASTQC (*Galaxy Version 0.73+galaxy0*) através do arquivo de saída do download, configurado como uma coleção de dados *pair-end*. Para garantir a integridade dos dados, uma lista de contaminantes foi obtida em https://github.com/csf-ngs/fastqc/blob/master/Contaminants/contaminant_list.txt.

Além disso, a ferramenta FastP (*Galaxy Version 0.23.2+galaxy0*) foi empregada para filtrar os *reads*, garantindo um *phred score* >=30. Ambas as análises, FastQC e FastP, foram realizadas em arquivos de coleção *pair-end*.

Essas etapas de seleção de amostras e pré-processamento de dados são fundamentais para assegurar a qualidade dos dados, proporcionando condições adequadas para análises subsequentes. Este procedimento meticuloso possibilitará a identificação e anotação eficaz de novos *integrons* e genes de resistência antimicrobiana, cumprindo os objetivos deste estudo.

4.3 MONTAGEM *DE NOVO* DOS METAGENOMAS

A montagem *de novo* (pela primeira vez) de dados metagenômicos representa o processo de fusão e agrupamento de sequências de DNA em *contigs*, sequências contíguas mais longas, sem a utilização de um genoma de referência. Essa etapa é fundamental na análise de dados metagenômicos, viabilizando a identificação de genes individuais e a previsão de suas funções com base em sequência, estrutura ou expressão.

Diversas ferramentas e algoritmos estão disponíveis para a montagem de dados metagenômicos, entre elas o Megahit (LI *et al.*, 2015a). Essas ferramentas desempenham tarefas computacionais intensivas ao mesclar e agrupar sequências de DNA em *contigs*, sendo otimizadas para a montagem de metagenomas complexos e extensos.

Para realizar a montagem *de novo* dos dados metagenômicos provenientes do sequenciamento de esgoto público de seis países, optou-se por utilizar a ferramenta Megahit. Esta ferramenta demonstrou eficácia na montagem dos dados metagenômicos e já foi previamente utilizada com sucesso em estudos anteriores (LI *et al.*, 2015b).

Previamente à execução do Megahit, é crucial realizar a análise de qualidade e a remoção de contaminantes das bibliotecas brutas, conforme detalhado anteriormente. Este procedimento assegura a alta qualidade dos dados, tornando-os aptos para a montagem. Dessa maneira, após a limpeza e filtragem dos dados, a montagem *de novo* no Megahit foi conduzida utilizando o arquivo de saída da ferramenta FastP, configurado como uma coleção *pair-end*. As configurações e parâmetros da ferramenta foram mantidos inalterados, inclusive o comprimento mínimo do *contig*, estabelecido em 200 pb. A escolha desse comprimento mínimo visa garantir que os *contigs* montados sejam suficientemente longos para abrigar genes completos, reduzindo o risco de falsos positivos.

Concluída a montagem *de novo*, os *contigs* resultantes serão empregados em análises subsequentes, como a previsão de genes e a anotação funcional. Tais análises possibilitarão a identificação e anotação de novos *integrons* e genes de resistência antimicrobiana nos dados metagenômicos.

4.4 IDENTIFICAÇÃO E ANOTAÇÃO DE *INTEGRONS* E GRAMs

A prospecção de novos *integrons* e GRAMs por meio de bibliotecas metagenômicas constitui uma etapa essencial neste projeto de mestrado, propiciando a identificação e anotação desses genes nos dados metagenômicos. Tal abordagem proporciona informações cruciais acerca da evolução e disseminação da resistência antimicrobiana (RAM), contribuindo para orientar o desenvolvimento de estratégias de controle.

Para realizar a prospecção de novos *integrons* e GRAMs nas bibliotecas metagenômicas, empregamos uma combinação de ferramentas de bioinformática e bancos de dados. A primeira etapa desse processo é a montagem *de novo* dos dados metagenômicos, conforme descrito em seções anteriores, resultando em contigs passíveis de análises subsequentes, como a previsão de genes e anotação funcional.

A ferramenta ABRicate (*Galaxy Version 1.0.1*) (SEEMANN, 2016) foi utilizada para identificação e anotação de genes de resistência antimicrobiana em sequências de DNA. ABRicate utiliza bancos de dados como *CARD* (C*omprehensive Antibiotic Resistance Database*), *NCBI Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database*, *ARG-ANNOT* (A*ntibiotic Resistance Gene-ANNOTation*) e ResFinder. Este processo proporciona uma anotação detalhada dos GRAMs previstos, incluindo seus mecanismos de ação e perfil de resistência.

A identificação de GRAMs foi conduzida usando os bancos de dados mencionados, com *cutoffs* para identidade e cobertura de DNA estabelecidos em 80% e 100%, respectivamente. O banco de dados *CARD* (MCARTHUR et al., 2013) também foi empregado para a anotação de GRAMs nos *contigs*, fornecendo um vocabulário padronizado para tal propósito.

A ferramenta IntegronFinder (*Galaxy Version 2.0.2+galaxy1)* (NÉRON *et al.*, 2022) foi utilizada para identificação de *integrons* nos contigs. Essa ferramenta emprega heurísticas e algoritmos de aprendizado de máquina, utilizando um banco de dados de estruturas de *integrons* conhecidas para identificar a presença de *integrons* nos contigs. O IntegronFinder distingue três tipos de elementos: *integron* completo (*integron* + *integron-integrase* nas proximidades *attC*;), elemento In0 (*integron-integrase* sem sítio *attC*) e elemento *CALIN* (cluster de sites *attC* sem

integrase). A anotação foi realizada considerando um arquivo de entrada proveniente da montagem *de novo* com o Megahit, e os parâmetros foram ajustados conforme a necessidade do estudo.

Para realizar as análises foi utilizado como arquivo de entrada, a coleção do Megahit. Todos os parâmetros permaneceram padrão. A ferramenta gera 3 arquivos saída, sendo eliminados os *e-values* atribuídos com *NA* (*no value is available*), já que os valores são apenas atribuídos para *attC* ou *intI*, ou para proteína ao usar anotação funcional, outros são atribuídos como *NA*.

4.5 PADRONIZAÇÃO DA NOMENCLATURA DOS GRAMs

A anotação funcional dos genes de resistência antimicrobiana, realizada de maneira prática pelo ABRicate, revelou desafios ao se comparar as anotações entre diferentes bancos de dados. Frequentemente, observou-se a falta de correspondência na nomenclatura dos genes assimilada pela ferramenta. Diante disso, tornou-se imperativo realizar uma padronização da nomenclatura desses genes e uma atribuição atualizada de possíveis sinônimos, sendo esse processo conduzido manualmente.

A padronização da nomenclatura foi efetuada com base nos padrões estabelecidos pelo *CARD*. Este banco de dados é distinto por catalogar genes de resistência, seus produtos e fenótipos associados. Conta ainda com o *CARD Curation Team*, uma equipe de curadoria ativa que incentiva a participação da comunidade científica na resolução de problemas de curadoria de RAM. O *CARD* disponibiliza recursos online, como uma lista na *Wikipedia* de bancos de dados de resistência antimicrobiana e uma Planilha *Google* contendo informações sobre bancos de dados e softwares que auxiliam na identificação de RAM. Estes recursos são colaborativos e permitem a atualização constante pela comunidade. A plataforma web do *CARD* facilita a busca pelos genes e aponta a existência de sinônimos quando aplicável.

Em situações em que alguns genes não constavam nos dados do *CARD* ou a nomenclatura divergia da bibliografia mais recente, como nos casos dos genes "*arr3*" e "*arr-6*", ambos associados à inativação de antibióticos da classe rifamicina, optou-se por manter o nome da anotação original. Embora o *CARD* considere "*arr-6*" como

sinônimo para "*arr-3*", a literatura recente (MORGADO; FONSECA; VICENTE, 2021) e o *NCBI Pathogen Detection Reference Gene Catalog* atribuem "*arr-6*" como sinônimo para "arr". Em casos sem consenso de nomenclatura, a opção foi manter a anotação original, preservando, por exemplo, o nome "*arr-6*". Uma descrição detalhada da padronização de nomenclatura dos genes identificados por meio da ferramenta ABRicate está disponível em apêndice S1.

4.6 AVALIAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA E RIQUEZA DOS GRAMs

Um conjunto contendo os 26 genes com as maiores anotações pelo ABRicate, provenientes dos quatro bancos de dados, foi submetido à plataforma *ClustVis Web* (Versão 1.0) no formato genes x banco de dados – país. A escolha de 26 genes decorreu das limitações da ferramenta em seu formato web, buscando, ao mesmo tempo, abranger os genes mais proeminentes assinalados pelos bancos de dados nas amostras dos países. As configurações padrão foram mantidas nas etapas de préprocessamento dos dados, incluindo a Decomposição de Valor Singular (*SVD - Singular Value Decomposition*) e a variação unitária (*Unity variance*). Essa mesma configuração foi aplicada à análise de variância da resistência às classes de fármacos distribuídas pelos países, representada por um mapa de calor.

O *ClustVis* é uma ferramenta web que utiliza a Análise de Componentes Principais (PCA) e mapas de calor (*Heat map*) para visualizar agrupamentos de dados multivariados. Disponível gratuitamente em *http://biit.cs.ut.ee/clustvis/* (METSALU; VILO, 2015).

A *PCA* é um método amplamente empregado para redução de dimensionalidade em dados de alta complexidade. Frequentemente, é seguido pela visualização dos dois principais componentes em um gráfico de dispersão (METSALU; VILO, 2015). Ao ser aplicado a um conjunto de variáveis, o *PCA* substitui o conjunto original por novas variáveis denominadas Componentes Principais (CPs). Esses CPs concentram a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, reduzindo a dimensionalidade sem significativa perda de informação. Além disso, a PCA gera ortogonalidade nos dados, possibilitando a reconstrução fácil a partir da combinação linear das variáveis originais (SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004).

Para a elaboração de diagramas de *Venn*, comparando a riqueza de anotações funcionais entre cada banco de dados (Figura 10A) e a riqueza comparada entre cada país (Figura 10B), utilizou-se a ferramenta *web* *InteractiveVenn*, disponível em *http://www.interactivenn.net.* Esta ferramenta permite incluir até seis conjuntos e analisar suas uniões, preservando a forma do diagrama, proporcionando uma interface limpa para a construção de diagramas de *Venn* (HEBERLE *et al.*, 2015).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE QUALIDADE DAS BIBLIOTECAS DE SEQUENCIAMENTO

Os dados brutos provenientes das 48 bibliotecas dos seis países participantes deste estudo foram submetidos à análise na plataforma Galaxy Europe e Australia, utilizando a ferramenta FASTQC (*Galaxy Version 0.73+galaxy0*). O resultado dessa análise revelou um total de 779.848.552 leituras únicas de uma extremidade a outra da sequência (*single-end*).

Ao detalhar a distribuição do número de leituras *single-end* por país (Quadro 2), observou-se que a Zâmbia foi o país que contribuiu com o maior volume, totalizando 249.738.458 sequências. Em contrapartida, a Suíça apresentou o menor número de leituras nas amostras, registrando 61.239.762 sequências. Vale destacar que todas as sequências nas amostras analisadas possuíam um comprimento fixo de 151 pb.

Quadro 2. Número total de leituras *single-end* dos países analisados através do FASTQC.

País	Total Leituras (single-end)
Austrália	126.093.294
Brasil	134.537.951
Suíça	61.239.762
Malásia	66.069.171
Estados Unidos	142.169.916
Zambia	249.738.458
Total	779.848.552

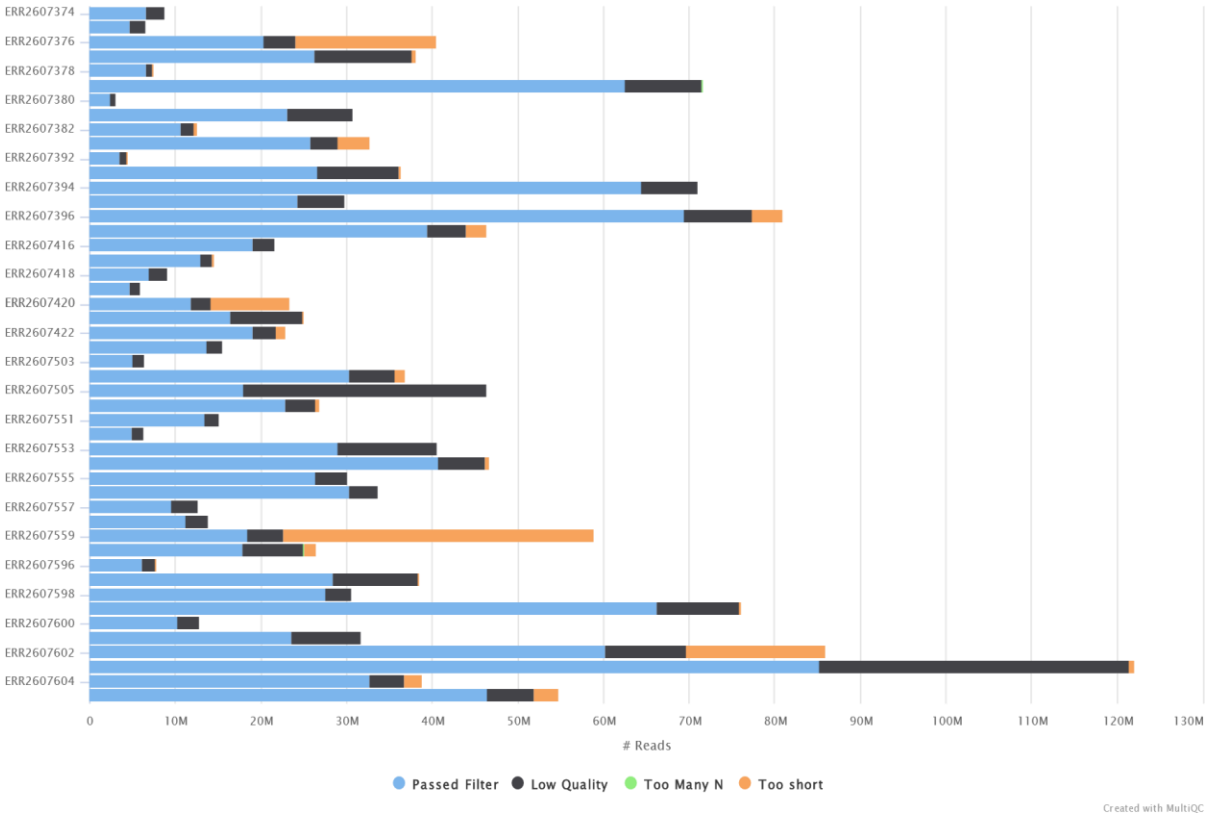
Fonte: Autoria própria.

Seguindo a metodologia previamente descrita, as amostras foram submetidas à análise de qualidade utilizando o FASTQC. Posteriormente, procedeu-se ao corte das amostras, mantendo apenas aquelas com um *phred score* superior a 30, por meio da ferramenta fastP.

A consolidação dos resultados obtidos pelo fastP foi realizada utilizando o MultiQC, proporcionando uma visão integrada do pré-processamento das amostras.

Após esse estágio, um total de 1.189.036.432 leituras foram retidas após a filtragem pelo fastP. Para informações mais detalhadas sobre os passos e resultados desse processo, referências podem ser encontradas no Anexo 4, disponível ao final deste documento.

Figura 2. Filtragem de antes e depois da filtragem fastP com as consequências do processo de filtragem



Fonte: Autoria Própria.

5.2 MONTAGEM DOS METAGENOMAS ATRAVÉS DO MÉTODO *DE NOVO*

O processo de montagem *de novo* realizado pelo Megahit resultou em um total de 20.980.154 sequências. Os países que se destacaram pelo maior número de sequências foram Zambia, contribuindo com 7.504.619, seguido pelos EUA com 3.425.488 e Brasil com 3.264.671 sequências. Por outro lado, as bibliotecas da Austrália (3.149.787), Malásia (1.881.980) e Suíça (1.652.655) registraram os menores números de sequências (quadro 3).

Quadro 3. Tamanho bruto em *bytes* de cada biblioteca empregada no estudo e o total de sequências geradas a partir do processo de montagem realizado pelo *Megahit*.

Acesso	Tamanho (*Bytes*)	Tamanho (Sequências *Megahit*)	País
ERR2607374	591.22 Mb	139.994	Austrália
ERR2607375	477.66 Mb	96.669	Austrália
ERR2607376	2.79 Gb	344.305	Austrália
ERR2607377	2.72 Gb	439.905	Austrália
ERR2607378	466.81 Mb	116.275	Austrália
ERR2607379	4.49 Gb	992.337	Austrália
ERR2607380	209.93 Mb	35.619	Austrália
ERR2607381	2.03 Gb	372.225	Austrália
ERR2607382	766.35 Mb	177.364	Austrália
ERR2607383	1.94 Gb	435.094	Austrália
ERR2607392	298.25 Mb	65.329	Brasil
ERR2607393	2.57 Gb	389.574	Brasil
ERR2607394	4.33 Gb	869.119	Brasil
ERR2607395	1.92 Gb	312.469	Brasil
ERR2607396	4.80 Gb	1.102.745	Brasil
ERR2607397	2.75 Gb	525.435	Brasil
ERR2607416	1.35 Gb	330.552	Suíça
ERR2607417	910.65 Mb	220.211	Suíça
ERR2607418	618.17 Mb	113.619	Suíça
ERR2607419	393.40 Mb	71.310	Suíça
ERR2607420	1.61 Gb	213.134	Suíça
ERR2607421	1.80 Gb	334.151	Suíça
ERR2607422	1.38 Gb	369.678	Suíça
ERR2607502	977.58 Mb	284.234	Malásia
ERR2607503	428.50 Mb	86.535	Malásia
ERR2607504	2.46 Gb	603.895	Malásia
ERR2607505	3.59 Gb	412.823	Malásia
ERR2607506	1.71 Gb	494.493	Malásia
ERR2607551	947.69 Mb	211.495	EUA
ERR2607552	414.13 Mb	68.703	EUA
ERR2607553	2.88 Gb	542.632	EUA
ERR2607554	2.81 Gb	702.647	EUA
ERR2607555	1.89 Gb	433.354	EUA
ERR2607556	2.05 Gb	429.449	EUA
ERR2607557	857.21 Mb	113.855	EUA
ERR2607558	919.00 Mb	163.102	EUA
ERR2607559	4.01 Gb	383.649	EUA
ERR2607560	1.87 Gb	376.602	EUA
ERR2607596	522.21 Mb	100.955	Zambia
ERR2607597	2.73 Gb	599.463	Zambia
ERR2607598	1.88 Gb	549.487	Zambia
ERR2607599	4.80 Gb	1.292.328	Zambia
ERR2607600	856.81 Mb	198.832	Zambia
ERR2607601	2.11 Gb	445.039	Zambia
ERR2607602	5.49 Gb	1.137.480	Zambia
ERR2607603	8.68 Gb	1.658.174	Zambia
ERR2607604	2.31 Gb	700.140	Zambia
ERR2607605	3.26 Gb	923.676	Zambia

Fonte: Autoria própria.

5.3 PROSPECÇÃO E ANOTAÇÃO DE GRAMs

Através do ABRicate, um total de 9.350 anotações funcionais de GRAMs foram triadas, considerando a compilação dos resultados provenientes dos quatro bancos de dados analisados (Quadro 4). *CARD* destacou-se como o banco de dados com o maior número de anotações, identificando um total de 2.892 genes. Em

sequência, o *NCBI* apresentou 2.255 anotações, seguido por *Arg-annot* com 2.168 anotações e Resfinder com 2.035 anotações.

Quadro 4. Anotações funcionais totais dos países por banco de dados através do ABRicate.

Banco de Dados	Zambia	Suíça	Malásia	EUA	Brasil	Austrália	Total Geral
CARD	1237	146	380	191	409	529	**2892**
NCBI	878	148	271	206	372	380	**2255**
ARG-ANNOT	865	136	263	186	345	373	**2168**
RESFINDER	806	135	242	173	334	345	**2035**
Total	3786	565	1156	756	1460	1627	9350

Fonte: Autoria própria.

Ao avaliar a distribuição das anotações de GRAMs obtidas pelo ABRicate, observou-se que Zâmbia (3.786), Austrália (1.627) e Brasil (1.460) apresentaram os maiores números de anotações em todo o conjunto de dados, enquanto Malásia (1.156), EUA (756) e Suíça (565) exibiram os menores valores (Quadro 4).

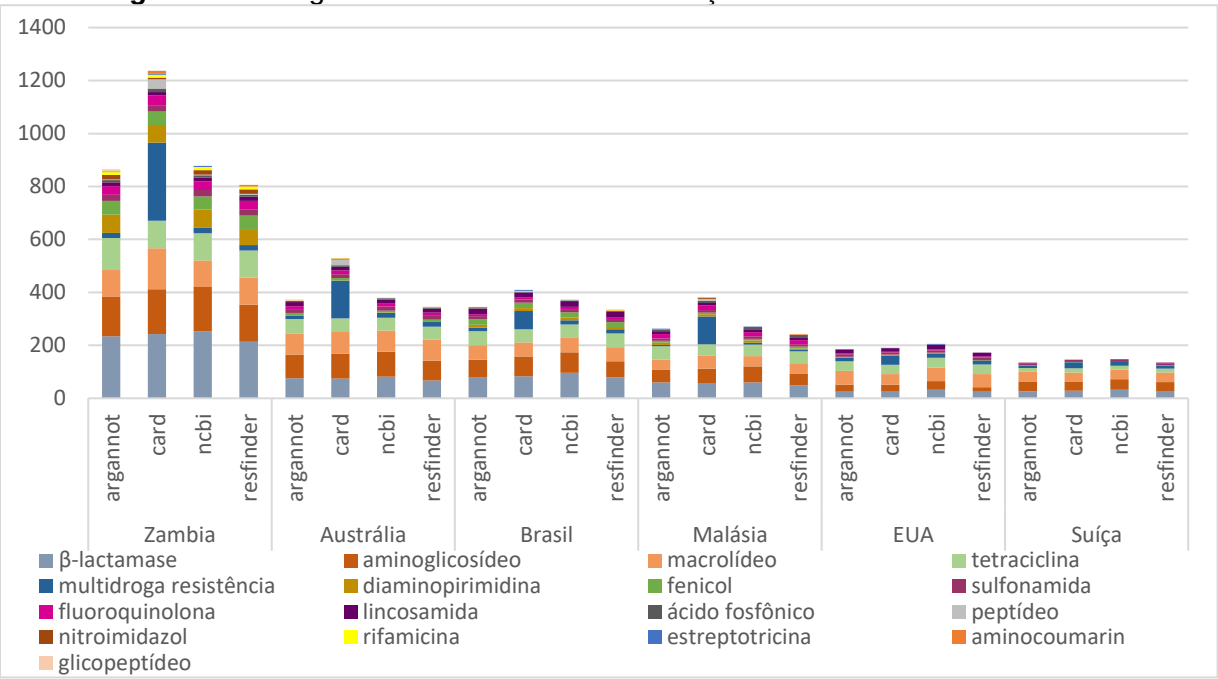
Ao desdobrar as análises por classe de fármacos, notou-se que genes associados aos *β*-lactâmicos foram mais frequentemente anotados pelo ABRicate para Zâmbia (943), Brasil (336) e Malásia (227). Em contrapartida, para Austrália (353) e Suíça (146), a classe de aminoglicosídeos foi a mais frequentemente anotada, enquanto para os EUA, os macrolídeos se destacaram (191).

Ao comparar os resultados dos bancos de dados Arg-Annot, NCBI e Resfinder, evidenciou-se certa discordância para Austrália e Suíça. Enquanto Arg-Annot e NCBI indicaram aminoglicosídeos como mais frequentes nesses países, Resfinder apontou para macrolídeos. No entanto, o *CARD* corroborou a predominância de aminoglicosídeos na Suíça. Para a Malásia, Zâmbia e Austrália, o *CARD* destacou genes associados à MDR.

De maneira geral, houve consenso entre os quatro bancos de dados quanto à prevalência de *β*-lactamases no Brasil. Para a Zâmbia e Malásia, *CARD*, *NCBI* e Resfinder indicaram *β*-lactamases e aminoglicosídeos como mais frequentes, enquanto para o Arg-Annot, esses países apresentaram maior anotação de genes relacionados à MDR. Nos EUA, macrolídeos foram consistentemente apontados

como os mais frequentes pelos quatro bancos de dados (*CARD*, *NCBI*, *Arg-Annot* e Resfinder).

Figura 3. Plotagem de abundância das anotações funcionais de classes antibióticas

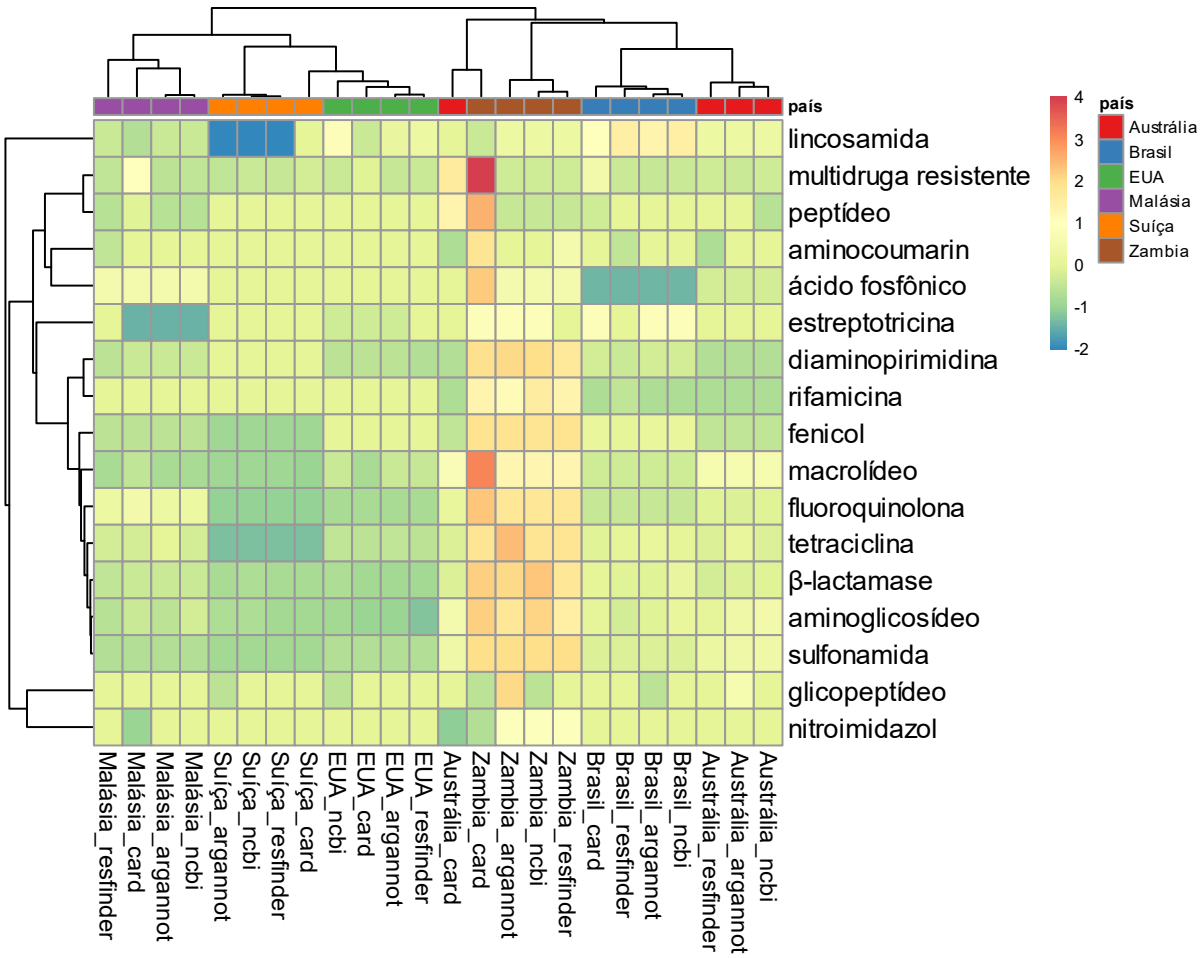


Fonte: Autoria própria.

A análise integrada por meio do mapa de calor revelou um elevado nível de resistência a multidrogas e macrolídeos para a Zâmbia, conforme indicado pelo banco de dados *CARD* (Figura 4). Essa tendência é congruente com os resultados da plotagem de abundância para o mesmo país, conforme evidenciado na Figura 3.

Além disso, a representação gráfica da árvore do mapa de calor revelou uma clara dissimilaridade nos dados, destacando uma segregação entre os conjuntos de dados provenientes de Austrália, Brasil e Zâmbia, por um lado, e Estados Unidos, Malásia e Suíça, por outro (Figura 4). Essa segregação ressalta possíveis padrões regionais ou características distintas nas amostras, contribuindo para uma compreensão mais refinada da resistência antimicrobiana em contextos geográficos específicos.

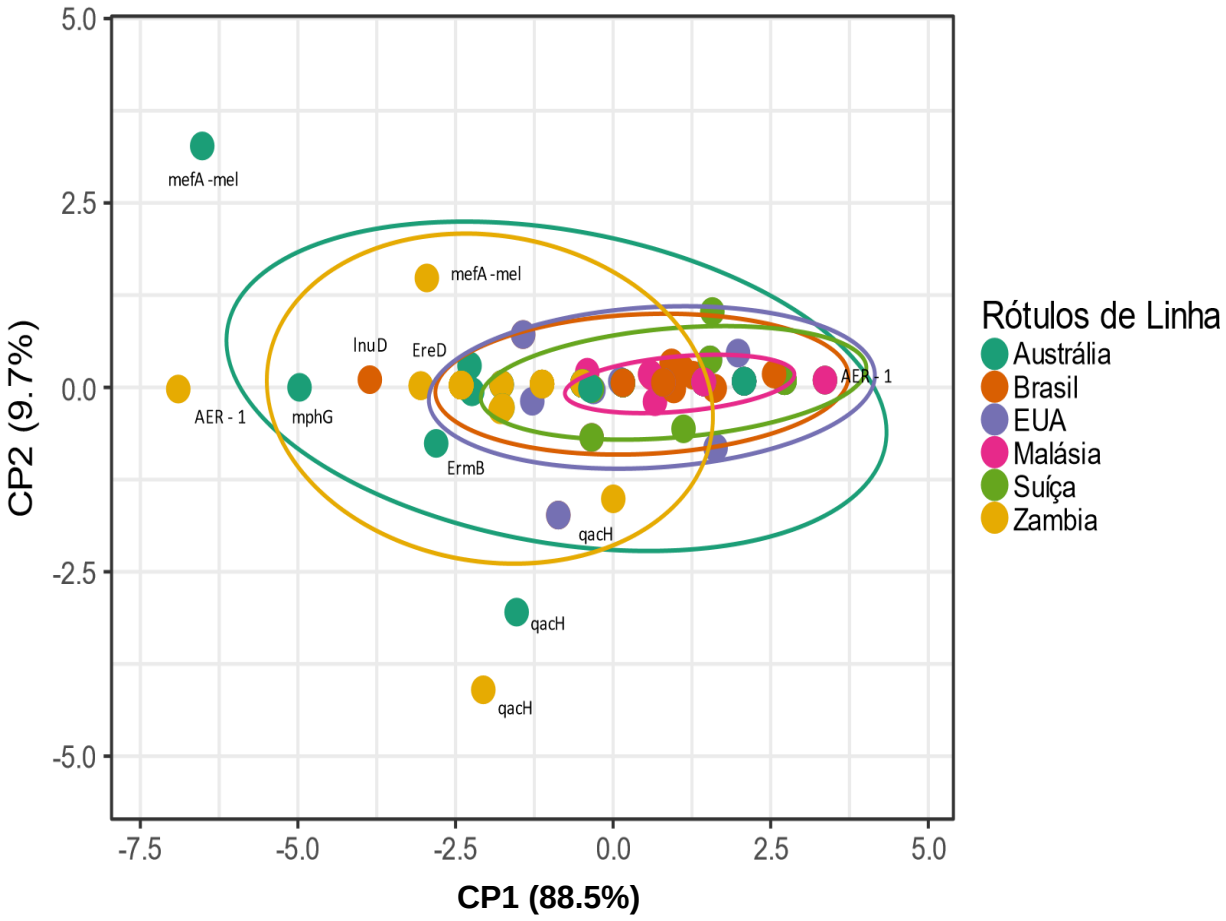
Figura 4. Mapa de calor: variação na abundância de GRAMs e distribuição de antibióticos por país e banco de dados - vermelho intenso maior abundância; áreas sem dados, azul escuro.



Fonte: Autoria própria.

A clusterização *PCA* da variância dos 26 genes mais frequentemente anotados pelo ABRicate, considerando o conjunto global de anotações provenientes dos bancos de dados, revela uma notável sobreposição quase uniforme das elipses representativas de Austrália, Estados Unidos, Brasil, Suíça e Malásia. Na análise de dispersão de variância, é evidente que os genes anotados por cada país estão agrupados dentro das elipses acumuladas à esquerda do gráfico. Por outro lado, genes como *qacH*, *AER-1*, *lnuD* e *mefA* apresentam uma disposição que os coloca externamente às suas respetivas elipses (Figura 5). Os eixos X e Y mostram o CP 1 e o CP 2 que explicam 88,5% e 9,7% da variância total, respectivamente. Escala de variação unitária é aplicada às linhas; SVD com imputação usado para calcular os componentes principais. N = 149 pontos de dados.

Figura 5. Representação gráfica de dispersão de variância dos 26 genes mais anotados no ABRicate utilizando as técnicas PCA e SVD.



Fonte: Autoria própria.

Evidenciaram-se diferenças notáveis nas anotações de GRAMs pela ferramenta ABRicate entre os diversos bancos de dados analisados. Como previamente destacado (Quadro 4), Austrália e Zâmbia foram os países com maior número de anotações.

As anotações do *CARD* revelaram singularidades em relação a outros bancos de dados. Notavelmente, a proteína receptora de *AMP* cíclico (*CRP - cyclic AMP receptor protein*), responsável pela regulação da transcrição, foi a mais exclusivamente anotada pelo *CARD* para Zâmbia (Figura 6). Além disso, anotações do *CARD* também revelaram singularidades para os genes *mel* para a Austrália e *ErmR* e *HN-S* para a Malásia.

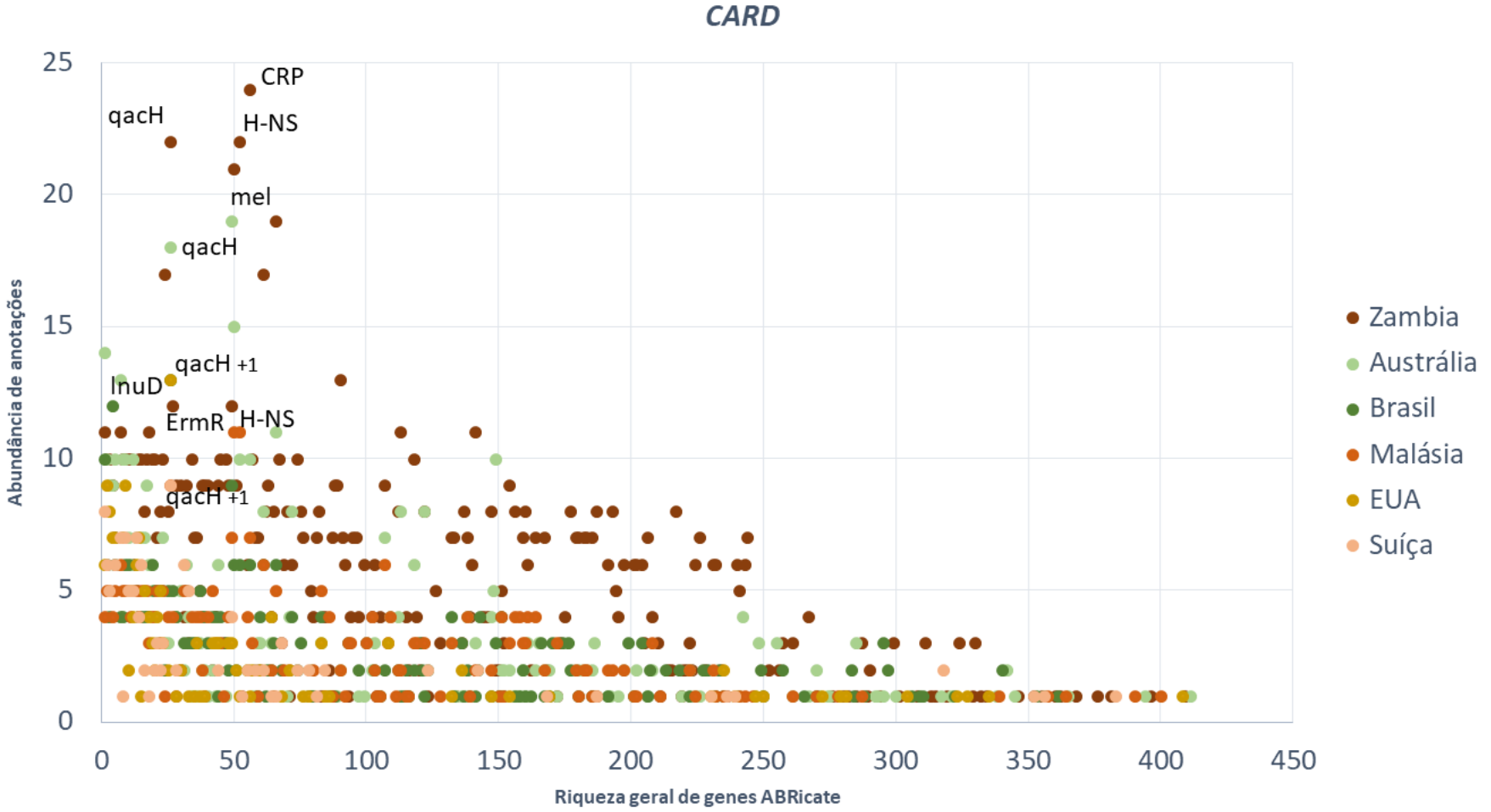
Destaca-se ainda a abundância do gene *qacH* nas anotações do *CARD*. Austrália e Zâmbia tiveram uma das maiores anotações para esse gene, enquanto para EUA, Suíça e Brasil e Malásia, foi o gene mais abundante.

Em contraste as análises *CARD*, o gene *mefA-mel* se mostrou mais abundante para Malásia e Austrália, o *AER-1* na Zâmbia, *mphG* na Suíça, *msrE* e *ErmB* nos EUA e *lnuD* no Brasil, conforme evidenciado nos bancos de dados *NCBI*, *Arg-Annot* e ResFinder (Figura 7, 8 e 9).

Para o *Arg-Annot*, em relação ao *NCBI* e ResFinder, observou-se uma singularidade para as anotações dos EUA. Enquanto os dois bancos de dados mostraram o *mphE* como um dos três genes mais abundantes para o país, o *Arg-Annnot* identificou o gene *mef(E)* (Figura 8).

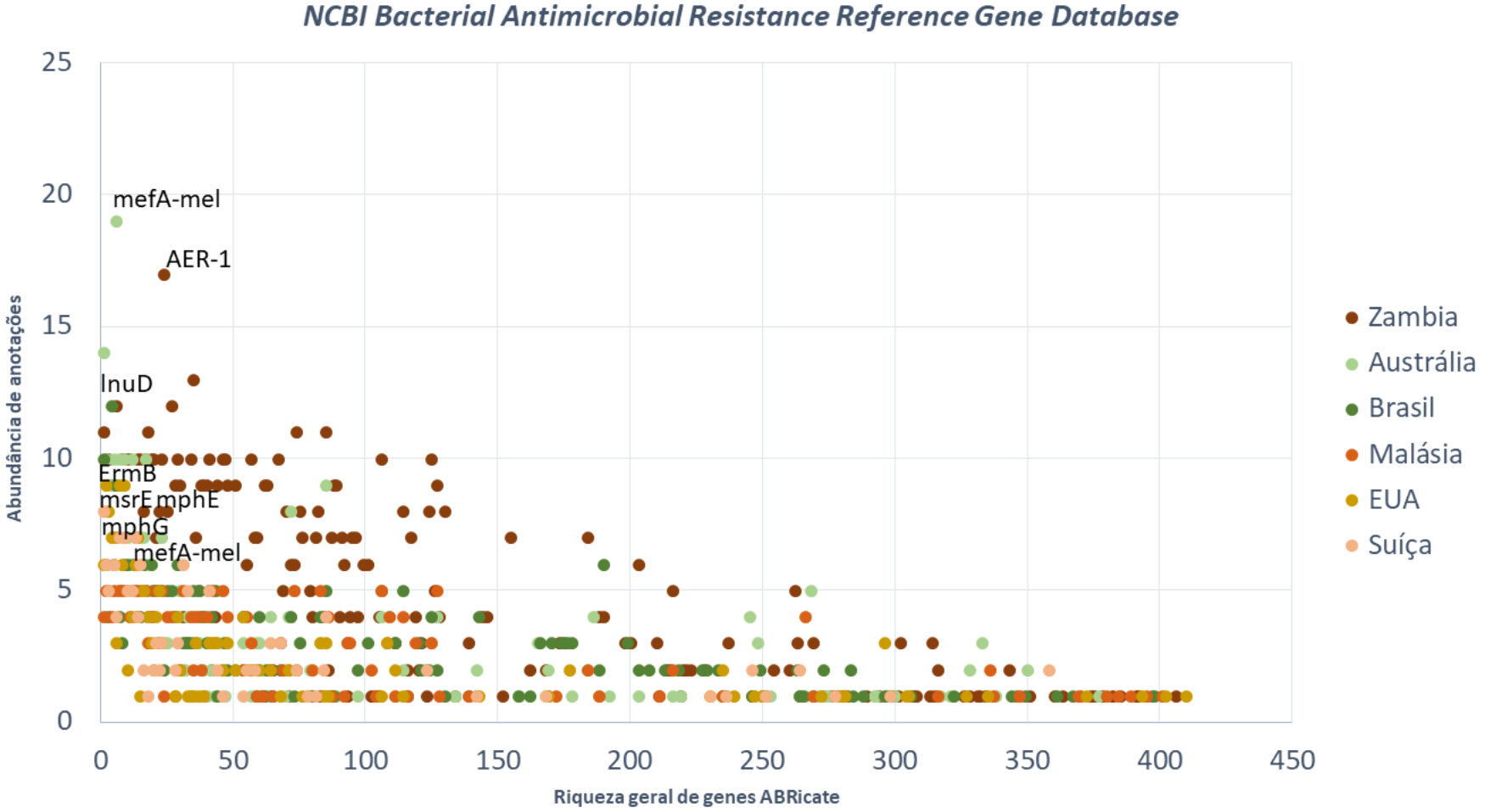
As anotações dos ResFinder, por sua vez, corroboraram com os dados de abundância do *NCBI*, não revelando dissimilaridades quanto aos genes que se destacaram como mais abundantes (Figura 9).

Figura 6. Dispersão de abundância de GRAMs anotados pelo banco de dados *CARD* em relação à riqueza geral do ABRicate nos seis países



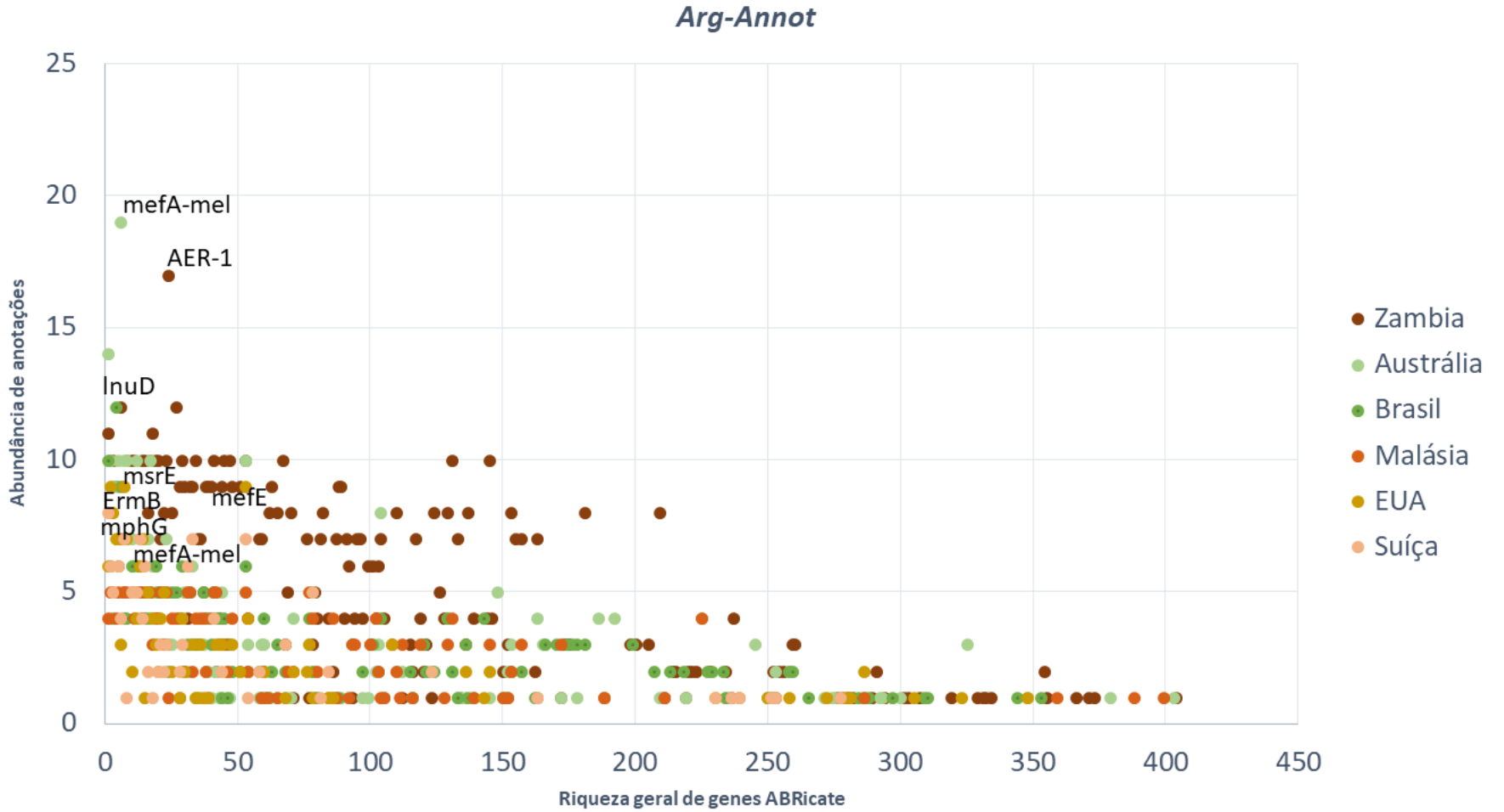
Fonte: Autoria própria.

Figura 7. Dispersão de abundância de GRAMs anotados pelo banco de dados *NCBI* em relação à riqueza geral do ABRicate nos seis países.



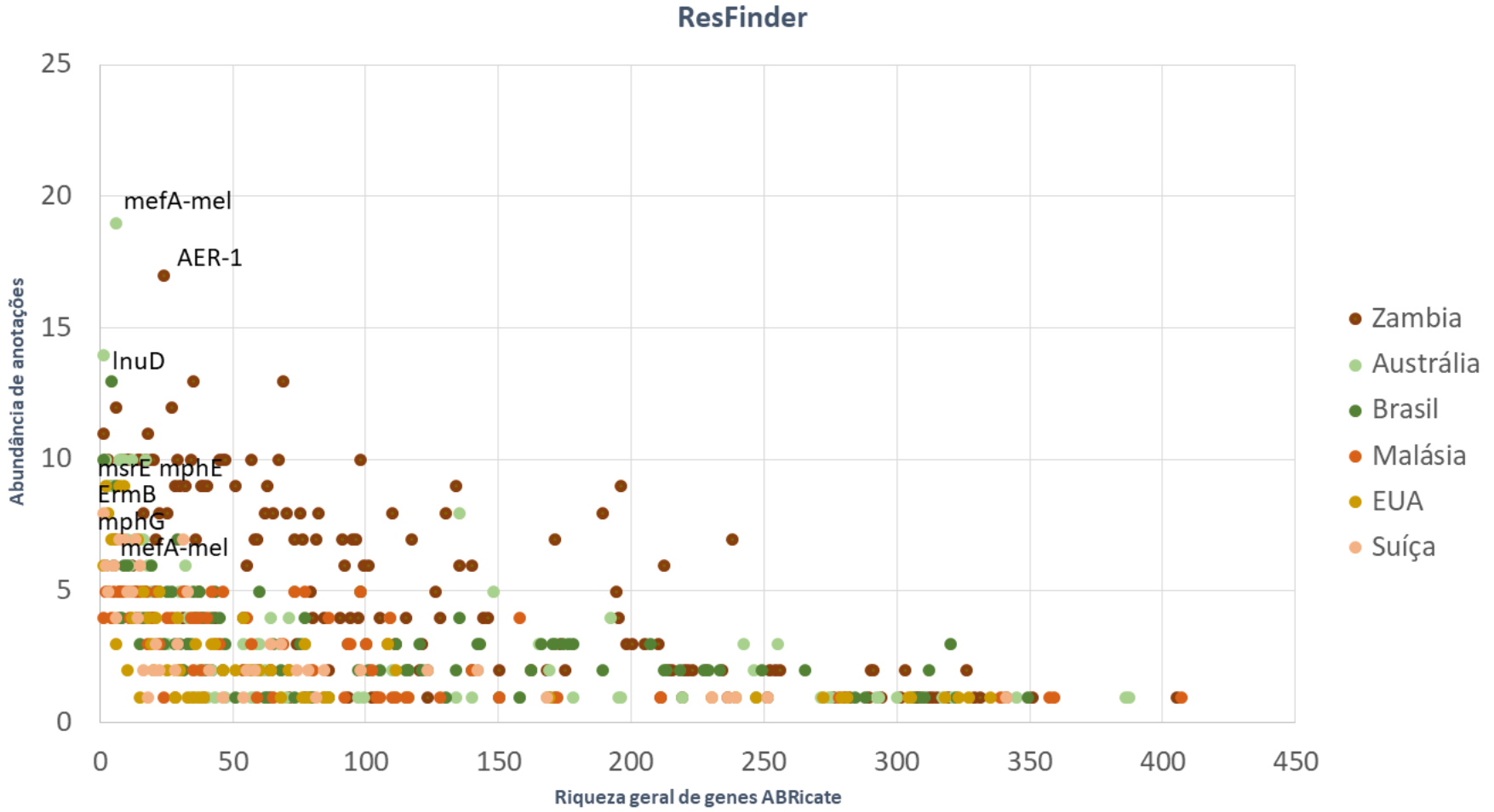
Fonte: Autoria própria.

Figura 8. Dispersão de abundância de GRAMs anotados pelo banco de dados *Arg-Annot* em relação à riqueza geral do ABRicate nos seis países.



Fonte: Autoria própria.

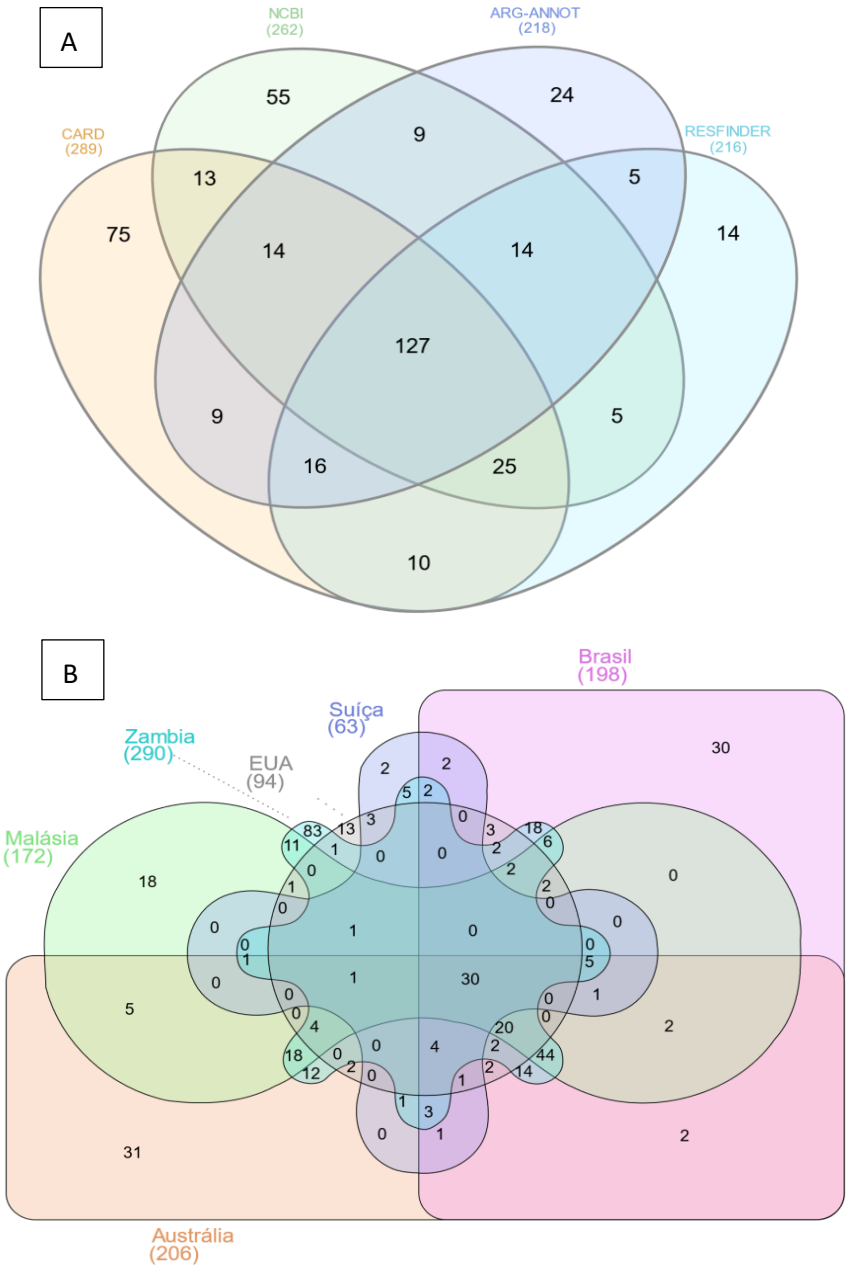
Figura 9. Dispersão de abundância de GRAMs anotados pelo banco de dados ResFinder em relação à riqueza geral do ABRicate nos seis países.



Fonte: Autoria própria.

Diagramas de *Venn* foram elaborados para compreender a distribuição de elementos exclusivos anotados por cada banco de dados ou por cada país (Figura 10), proporcionando uma visão abrangente da quantidade de genes anotados compartilhados entre eles.

Figura 10. Diagrama de Riqueza de GRAMs: A) Por Banco de Dados e B) Por Países da Pesquisa.



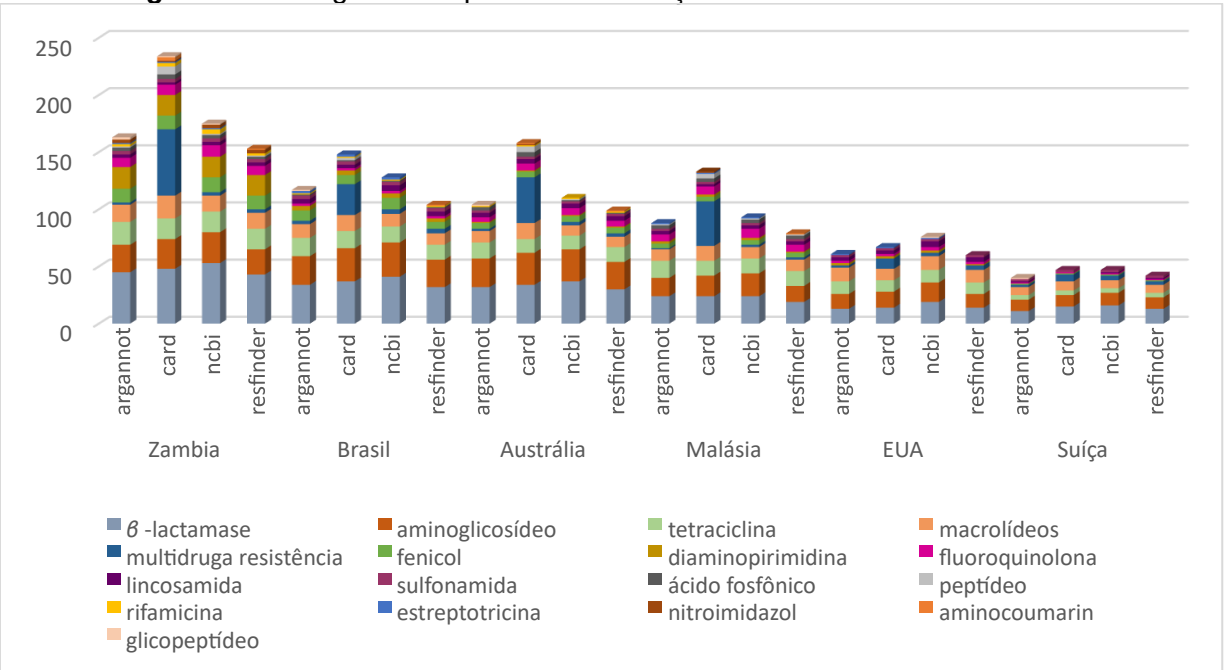
Fonte: Autoria própria.

No total, identificaram-se 415 genes distintos associados à aquisição de resistência a antibióticos, distribuídos em 15 classes de drogas antibióticas e um grupo para genes relacionados à multirresistência. Uma tabela descritiva, apresentando todos os genes compartilhados ou exclusivos, está disponível nos anexos 4 e 5 ao final deste estudo.

Ao analisar individualmente as leituras de cada país e filtrar dados duplicados para avaliar a diversidade de GRAMs gerada por cada banco de dados, observou-se que o banco *CARD* identificou 289 genes distintos, o *NCBI* 262, *Arg-annot* 218 e ResFinder 216 (Figura 10A). A Zâmbia destacou-se como o país com a maior diversidade de GRAMs (290), seguida por Austrália (206) e Brasil (198). Apenas 30 genes foram anotados de forma comum entre todos os países (Figura 10B).

GRAMs associados à multirresistência antimicrobiana foram mais abundantes na Zâmbia (58), Austrália (40) e Malásia (39), conforme as anotações do banco de dados *CARD*. Observou-se uma alta diversidade de genes ligados aos *β*-lactâmicos em todos os países, sendo que apenas os EUA apresentaram equivalência na riqueza entre *β*-lactâmicos e aminoglicosídeos para *Arg-annot* e *CARD* (Figura 11).

Figura 11. Plotagem de riqueza das anotações funcionais de classes antibióticas.

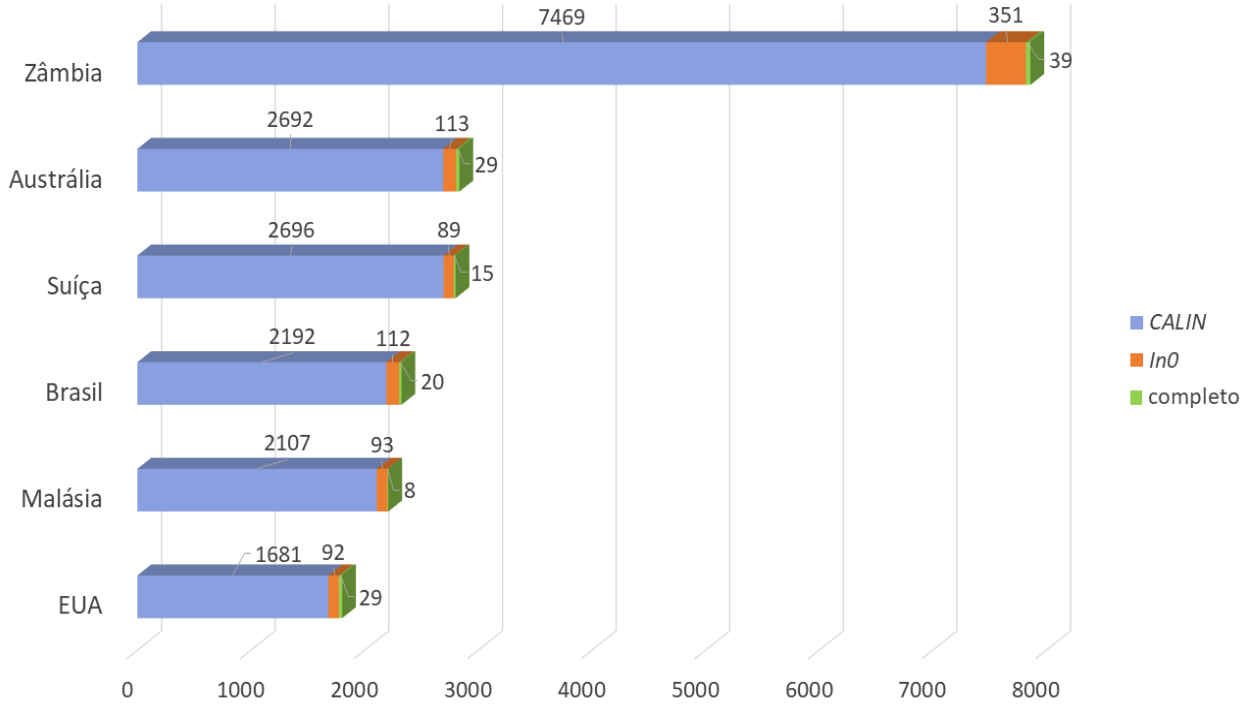


Fonte: Autoria própria.

5.4 PROSPECÇÃO DE *INTEGRONS*

O *IntegronFinder* identificou um total de 18.837 elementos *CALIN*, 834 elementos In0 e 140 elementos associados a *integrons* completos. A Zâmbia apresentou o maior número de anotações para os três tipos de elementos (7.469 *CALIN*, 351 *In0* e 39 completos), seguida pela Suíça, que demonstrou maior abundância de *CALIN* (2.696), e pela Austrália, com 29 elementos de *integrons* completos e 113 *In0* (Figura 12). Os Estados Unidos registraram a menor anotação de *CALIN* (1.681) e *In0* (92).

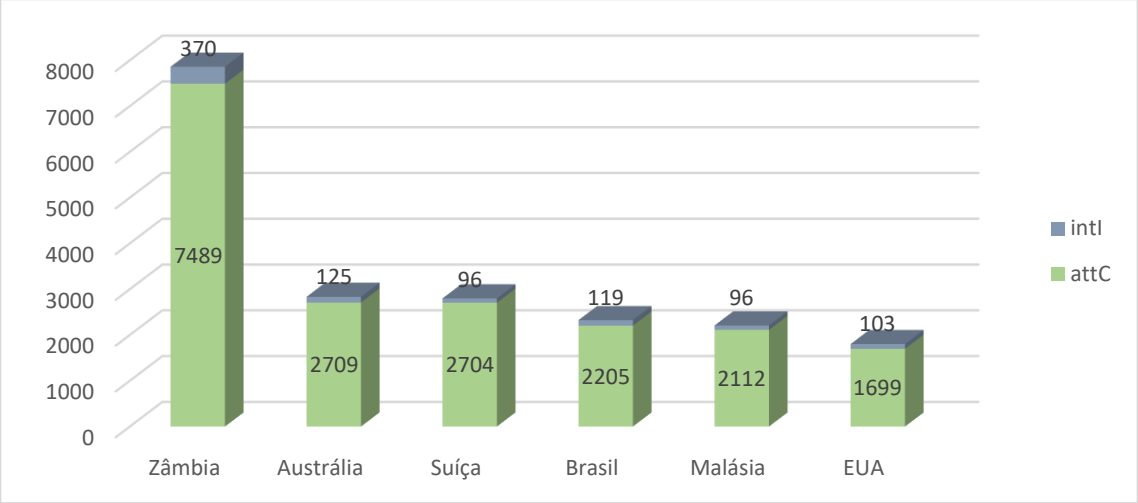
Figura 12. Variação na abundância de elementos (completo, *CALIN* ou *In0*) identificados pelo *IntegronFinder* nos diferentes países.



Fonte: Autoria própria.

Com relação à abundância das regiões *attC* e *intI*, foram identificadas um total de 18.918 regiões *attC*, com destaque significativo para Zâmbia (7.489), seguida por Austrália (2.709) e Suíça (2.704) (Figura 13). Quanto à região *intI*, foram registradas 909 anotações no total, com Zâmbia (370), Austrália (125) e Brasil (119) liderando em número de ocorrências.

Figura 13. Variação de abundância de regiões *attC* e *intI* identificados pelo *IntegronFinder* por país.

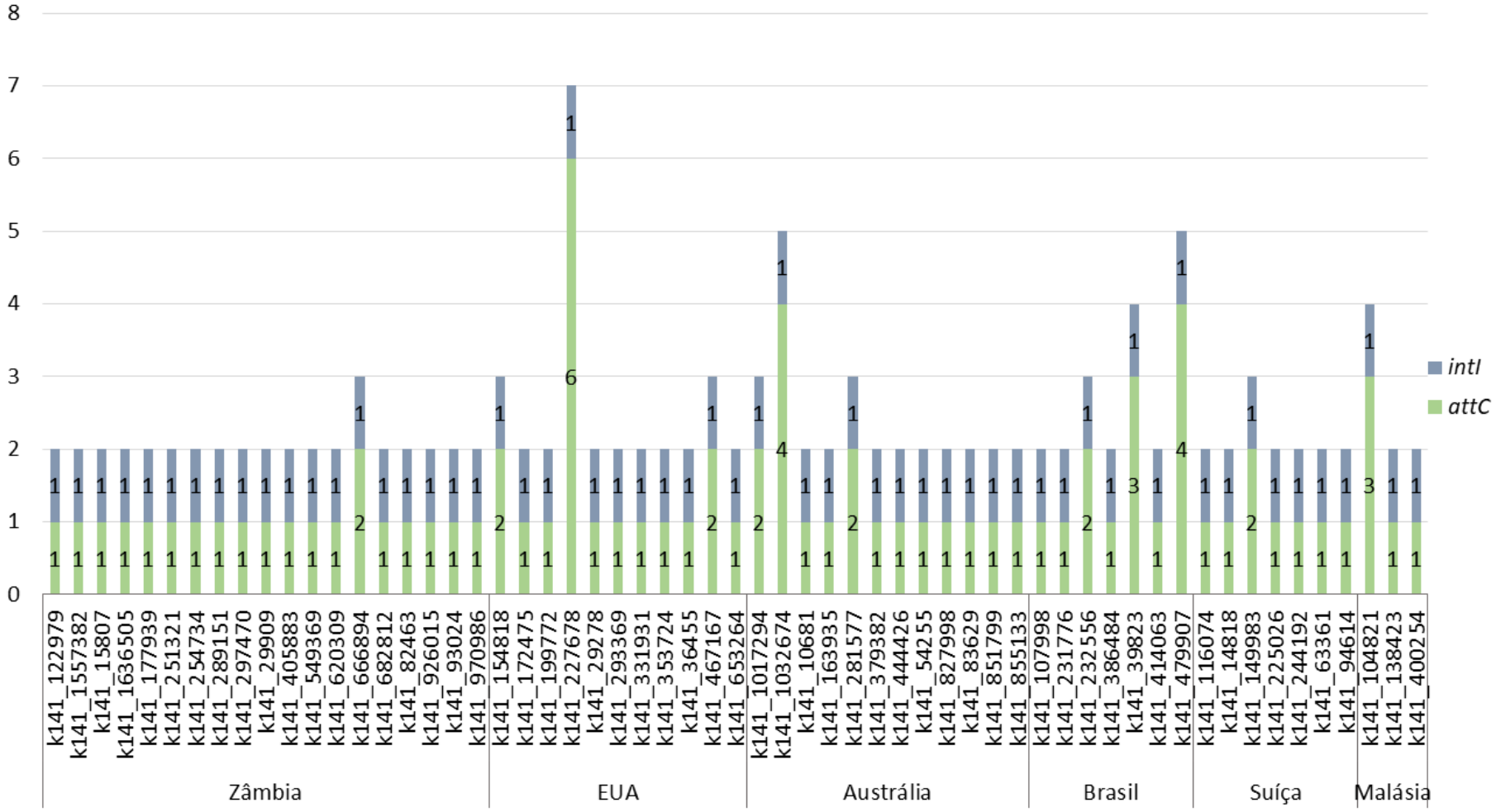


Fonte: Autoria própria.

Um total de 59 *integrons* completos foram identificados neste estudo. Destes, a Zâmbia destacou-se como líder entre os países, com 19 *integrons* completos, seguida pela Austrália com 12 e os EUA com 11 (Figura 14).

Os *integrons* completos identificados pelo *IntegronFinder* correspondem a locais que incluem um *integron-integrase* (*intI*) e regiões de recombinação *attC*. Com relação à variação na abundância das regiões *attC* e *intI*, observou-se que Zâmbia (39), EUA (29) e Austrália (29) apresentaram o maior número de elementos identificados para *integrons* completos. Notavelmente, nos Estados Unidos, foi identificado o sítio *attC* de maior dimensão em um i*ntegron* completo (Figura 14).

Figura 14. Variação de abundância de regiões *attC* e *intI* identificados em *integrons* completos pelo *IntegronFinder* por país.



Fonte: Autoria própria

6 DISCUSSÃO

6.1 DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA POR PAÍS

A dissimilaridade de dados, assemelhando-se à regionalização que separa os conjuntos de dados de Austrália, Brasil e Zâmbia dos dados dos Estados Unidos, Malásia e Suíça (Figura 4), encontra paralelos no estudo original das bibliotecas analisadas. De acordo com Munk *et al.* (2022), a aplicação de um agrupamento hierárquico aos resistomas de amostras de esgoto de 101 países revelou duas divisões relativamente uniformes, com forte sobre-representação da Europa, Ásia Central e América do Norte. Essa tendência coincide com achados anteriores do mesmo grupo de pesquisa (HENDRIKSEN *et al.*, 2019), que, ao realizar um monitoramento global de GRAMs em amostras de esgoto, identificou uma clara separação geográfica entre amostras da Europa, América do Norte e Oceania em comparação com amostras da África, Ásia e América do Sul.

Notavelmente, essa divisão geográfica observada nos estudos anteriormente mencionados entre os continentes é consonante com a distinção identificada entre os três países com maior incidência de anotações de GRAMs e os outros três com menor incidência, fornecendo uma perspectiva interessante sobre a distribuição global dessas anotações e sua possível relação com fatores geográficos.

6.1.1 Zâmbia

A Zâmbia apresentou a mais expressiva anotação funcional de genes de resistência antimicrobiano, destacando uma proporção alarmante de classes de drogas que correm risco de se tornarem menos eficazes no combate a infecções, conforme indicado pelos dados metagenômicos de esgoto deste país. Esses resultados já eram antecipados para a Zâmbia, situada na região da África subsaariana, que compreende outros 46 países. Esta área da África enfrenta os maiores encargos de doenças do mundo, com as doenças infecciosas responsáveis por mais de 227 milhões de anos saudáveis de vida perdidos e mais de 800 milhões de dólares em perda anual de produtividade global (NKENGASONG; TESSEMA, 2020). A escassez de estudos sobre RAM na Zâmbia é evidente, visto que

aproximadamente 42% dos países africanos não publicaram estudos sobre o tema (TADESSE *et al.*, 2017), destacando a necessidade de mais pesquisas nessa área no contexto zambiano (NOWBUTH *et al.*, 2023).

Apesar do grande volume de estudos sobre HIV, tuberculose e malária na África, a Zâmbia enfrenta atualmente uma epidemia de HIV, com uma taxa de 11,3% em pessoas com idade entre 15 e 49 anos em 2018 (UNICEF, 2018). Apesar do HIV ser uma epidemia no país, há uma carência significativa de estudos sobre resistência a infecções oportunistas em pacientes com HIV e resistência específica a drogas antituberculose (NOWBUTH *et al.*, 2023). Encontrar estudos relacionados à resistência proveniente de genes pouco estudados, como *CRP* ou *AER-1*, na Zâmbia ou em países africanos, representa um desafio.

Outro ponto relevante é a presença significativa de multirresistência e resistência a antibióticos *β*-lactâmicos na Zâmbia (Gráfico RD2). Dentre eles, o *CRP* anotado pelo *CARD*, e *AER-1* para os outros 3 bancos de dados. O *CRP* é um dos sete reguladores globais de *E. coli*, um regulador capaz de modular a MDR e que desempenha um papel crucial na regulação da expressão de mais de 490 genes (GENG; JIANG, 2015). Além de sua influência em processos fisiológicos, estudos indicam que o *CRP* pode reduzir a susceptibilidade a antibióticos, como o Ciprofloxacin (fluoquinolona), em *Salmonella enterica*, e penicilinas (*β*-lactâmicos) (KARY *et al.*, 2017; MOLINA-QUIROZ *et al.*, 2018). Ainda não existem estudos que demonstrem a presença deste gene em amostras da África sub-saariana ou mesmo da Zâmbia.

O gene *AER-1*, pertencente à família de *β*-lactamases *AER*, está associado à hidrólise eficiente do grupo carbenicilina (penicilina) e é originalmente encontrado em *Aeromonas hydrophila* (HEDGES *et al.*, 1985), uma bactéria patogênica oportunista associada a doenças transmitidas pela água e esgoto (TOPIC POPOVIC *et al.*, 2015). Dentro da região sub-saariana na África, a presença da *AER-1* já foi relatada em dados de resistência de esgoto em Camarões (DIKOUMBA *et al.*, 2023).

Os *β*-lactâmicos são frequentemente prescritos de maneira inadequada na Zambia (KASANGA *et al.*, 2023), que também apresenta os níveis mais elevados de compra de antibióticos na África subsaariana, com 100% das farmácias vendendo esses medicamentos sem receita médica (SONO *et al.*, 2023). A aquisição de RAM de *β*-lactamases de espectro estendido (*ESBL - Extended-spectrum β-lactamases*),

que abrangem penicilinas, cefalosporinas e o monobactâmico aztreonam, tem sido objeto de estudo frequente na Zâmbia, especialmente no Hospital Universitário de Lusaka (HUL), o maior hospital do país. Este hospital já evidencia uma alta presença de bactérias Gram-negativas isoladas de infecções sanguíneas dos pacientes (YAMBA *et al.*, 2023). Amostras de pacientes internados e ambulatoriais do HUL, além de amostras ambientais de subdistritos de Lusaka, revelaram uma alta taxa de prevalência de *E. coli* produtora de *ESBL* e MDR em diversas amostras, incluindo pus, sangue e água (KASANGA *et al.*, 2023). Esses achados realçam a urgência de medidas para enfrentar a crescente resistência antimicrobiana na Zâmbia.

6.1.2 Austrália

As anotações relacionadas à MDR foram amplamente identificadas pelo *CARD*, destacando também uma frequência elevada de resistência a aminoglicosídeos, observada tanto pelo *CARD* quanto pelo *NCBI* e *Arg-Annot* (Figura 3). Por outro lado, o ResFinder indicou uma presença mais acentuada de resistência a macrolídeos, embora esse dado seja mencionado de forma não quantificada para o país em (MUNK *et al.*, 2022).

Análises *NCBI*, *Arg-Annot* e ResFinder mostraram maior abundância do gene *mefA* nas amostras da Austrália. Este gene está associado à aquisição de resistência a macrolídeos em diversas cepas (BLEY; VAN DER LINDEN; REINERT, 2011). O *mefA* pode ser encontrado em várias espécies de estreptococos, bem como em gêneros Gram-positivos e Gram-negativos (IANNELLI *et al.*, 2018). Estudos destacam sua prevalência em cepas resistentes a eritromicina, sendo associado ao mecanismo de bomba de efluxo em *S. pneumoniae* (SONG, 2004). No estudo original das bibliotecas, *mefA*, junto com *msrD*, foram encontrados principalmente em *Exiguobacterium* e *Lactococcus* em todas as regiões do mundo (MUNK *et al.*, 2022).

Para o *CARD*, no entanto, houve uma maior abundância de genes *mel* para o país. Análises de amostras de pacientes infantis na Nova Gales do Sul na Austrália mostraram que 74 (73%) dos isolados continham fenótipo de RAM *MLSB*, onde 28 dessas amostras apresentaram *mefA* com 10 amostras carregando mel associado, e 11 amostras com *msrD* associado a *mefA*.

Em resposta às preocupações sobre as altas taxas de RAM, o governo australiano implementou a Primeira Estratégia Nacional de Resistência Antimicrobiana de 2015 a 2019, visando combater o uso excessivo de antibióticos e a subsequente resistência (HOWARTH *et al.*, 2020). Como parte dessa estratégia, foram elaborados relatórios anuais que descrevem o uso e a resistência aos antimicrobianos na Austrália (*AURA - Antimicrobial Use and Resistance in Australia*) (AUSTRALIAN COMMISSION ON SAFETY AND QUALITY IN HEALTH CARE, 2016).

As amostras de esgoto provenientes da Austrália foram coletadas em 2016 (Anexo 3) Dados do mesmo período (2016-2017) do *AURA* indicam que a eritromicina, um tipo de antibiótico macrolídeo utilizado no tratamento de infecções por *S. aureus*, *S. aureus* (cepa resistente à meticilina), *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, apresenta uma das maiores taxas de resistência para o tratamento de infecções por essas espécies. Especialmente para as últimas quatro, a eritromicina lidera a porcentagem de resistência nesse período (AUSTRALIAN COMMISSION ON SAFETY AND QUALITY IN HEALTH CARE, 2019).

O gene *aadA2* foi identificado como o mais frequente dentro da classe de aminoglicosídeos na Austrália em todos os bancos testados. Uma análise das águas de reuso na Austrália com cepas de *E. coli* já havia revelado a presença desse gene, juntamente com outros associados à resistência a antibióticos da classe de aminoglicosídeos, embora em concentrações não significativas nas amostras (BEHRUZNIA; GORDON, 2022).

Análise em esgoto proveniente de Instalações Residenciais para Idosos (IRPIs) de 2019 a 2021 em Adelaide, na Austrália, revelaram uma prevalência extremamente elevada de *E. coli* MDR (SAPULA *et al.*, 2023). Esses dados apontam para a necessidade contínua de monitoramento e ações efetivas para lidar com a resistência antimicrobiana na Austrália.

O último relatório do *AURA*, referente a 2021 e baseado em dados de 2018, 2019 e 2020, destaca que o uso hospitalar de antibióticos na Austrália lidera o ranking de consumo em comparação com países europeus e o Canadá. Apesar de possíveis vieses nos dados, e mesmo com correções, o uso continua sendo substancialmente elevado no país. Essa tendência também se reflete no consumo

doméstico de antibióticos, no qual a Austrália ocupa o sétimo lugar (AUSTRALIAN COMMISSION ON SAFETY AND QUALITY IN HEALTH CARE, 2021).

6.1.3 Malásia

O *CARD* revelou uma alta prevalência de *mefA* para a Malásia. Análise de cepas resistentes na Malásia evidenciaram a presença do *mefA* em conjunção com o gene *ermB* (J *et al.*, 2013). Essa diversidade de associações ressalta a importância do *mefA* na resistência a macrolídeos em diferentes contextos clínicos. Nos estudos de Munk *et al.* (2022), *mefA*, junto com *msrD*, além de encontrados em *Exiguobacterium* e *Lactococcus* no mundo todo, na Ásia e África foram predominantes em *Exiguobacterium*.

A análise de culturas bacterianas no sudeste da Malásia revelou uma elevada presença de bactérias MDR, com destaque para aquelas produtoras de *ESBL*, principalmente nas proximidades do emissário da ETE (HO *et al.*, 2021). A ocorrência de amoxicilina, em conjunto com outras classes de antibióticos, já foi identificada em três rios na Malásia (PRAVEENA *et al.*, 2018). Além disso, observa-se uma incidência significativa de bactérias produtoras de *ESBL* em águas superficiais locais da Malásia, incluindo patógenos oportunistas, sendo notável uma frequência relativamente alta de genes *CTX-M*, seguidos pelos genes *TEM*) (STA ANA; MADRIAGA; ESPINO, 2021).

Ao considerar a prescrição de antibióticos na Malásia e a resistência observada em alguns organismos na Austrália, destaca-se que os dados provenientes de hospitais privados apresentam maior relevância em comparação com hospitais públicos. (AUSTRALIAN COMMISSION ON SAFETY AND QUALITY IN HEALTH CARE, 2019; NAEEMMUDEEN *et al.*, 2021). Essa discrepância pode indicar uma possível influência do setor privado na dinâmica da resistência antimicrobiana na região, ressaltando a importância de investigações mais aprofundadas nesse contexto.

6.1.4 Estados Unidos

As análises realizadas evidenciaram uma expressiva abundância dos genes *msrE* e *ErmB* nos EUA. Amostras coletadas próximas a uma ETE em um rio do estado de Ohio, EUA, revelaram uma elevada presença de GRAMs, incluindo a presença do *msrE*. O GRAM *msrE* é responsável pela aquisição de resistência *MLSB*, como é característico dos genes do tipo *msr* (*Macrolide and streptogramin B resistance*) (CROWE-MCAULIFFE *et al.*, 2021; MURPHY *et al.*, 2021). Em outro estudo, cujo objetivo era compreender o impacto de ETEs na presença de RAM em uma bacia hidrográfica, o gene *ErmB* (macrolídeos) foi identificado como o mais frequentemente encontrado (CHO *et al.*, 2023). Segundo Munk *et al.* (2022), os genes *msrE* e *ErmB* demonstraram maior abundância nas amostras do conjunto Europa-Ásia-América do Norte.

O *CARD*, por outro lado, encontrou uma grande prevalência de *qacH* para o país. Amostras de esgoto do estado de Minesota nos EUA já demonstraram uma alta prevalência de resíduos *QAC* e seu impacto ao longo do sistema de uma ETE (MAHONY; MCNAMARA; ARNOLD, 2023).

De acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (*CDC - Centers for Disease Control and Prevention*) dos Estados Unidos, a resistência ao antibiótico eritromicina no grupo A do *Streptococcus* (*GAS*) apresentou um aumento exponencial no período de 2010 a 2017. Esse aumento tem restringido as opções de tratamento, notadamente em pacientes alérgicos à penicilina, para os quais a eritromicina é uma alternativa crucial no combate a esse tipo de infecção (US CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

No caso do *S. pneumoniae*, a resistência aos macrolídeos foi identificada em 39,5% de isolados não duplicados em ambientes ambulatoriais e de internação de adultos, em 329 hospitais dos Estados Unidos durante o período de 2018 a 2019. Apesar das variações geográficas, a resistência aos macrolídeos no *S. pneumoniae* ultrapassou 25% na maioria das regiões estudadas (GUPTA *et al.*, 2021). Essa resistência representa uma preocupação significativa para a eficácia dos tratamentos disponíveis e destaca a necessidade contínua de monitoramento e estratégias para conter a propagação da resistência antimicrobiana.

Atualmente o país conta com um Plano de Ação Nacional de Combate a Bactérias Resistentes a Antibióticos (*CARB - Combating Antibiotic-Resistant Bacteria*), um projeto que busca em 5 anos (2020-2025) melhorar a saúde e o bem-estar de todos os americanos, alterando o curso da resistência aos antibióticos sob a perspectiva da saúde única (FEDERAL TASK FORCE ON COMBATING ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA, 2020).

6.1.5 Suíça

Conforme informações da Secretaria Federal de Saúde Pública da Suíça, em comparação com outros países, a Suíça ocupa uma posição intermediária no que diz respeito à resistência aos antibióticos. Proporcionalmente à sua população, o número de infecções causadas por bactérias resistentes é menor do que em países como França, Itália ou Grã-Bretanha, mas é superior ao registrado nos Países Baixos ou nos países escandinavos (FEDERAL OFFICE OF PUBLIC HEALTH, 2022).

A análise metagenômica dos efluentes de ETE na Suíça revelou que os genes de resistência às sulfonamidas, β-lactâmicos e aminoglicosídeos estão entre os Grampositivos mais abundantes (LEE *et al.*, 2023).

O antibiótico macrolídeo mais utilizado na Suíça é a claritromicina, classificado como o terceiro antibiótico mais prescrito no país (FEDERAL OFFICE OF PUBLIC HEALTH; FEDERAL FOOD SAFETY AND VETERINARY OFFICE, 2022). Em 2018, um relatório indicou concentrações significativas de claritromicina nos efluentes de ETE em Zurique (FEDERAL OFFICE OF PUBLIC HEALTH; FEDERAL FOOD SAFETY AND VETERINARY OFFICE, 2018). Entretanto, dados mais recentes, do relatório de 2022, demonstraram uma redução nos níveis desse antibiótico no mesmo ambiente (FEDERAL OFFICE OF PUBLIC HEALTH; FEDERAL FOOD SAFETY AND VETERINARY OFFICE, 2022). Este declínio pode sugerir mudanças nas práticas de prescrição ou nas políticas de gestão de resíduos que impactam a presença desse antibiótico no ambiente.

6.1.6 Brasil

Efluentes hospitalares no sudeste brasileiro têm evidenciado uma expressiva presença de Gêneros de Alta Resposta a Múltiplos Antibióticos (GRAMs), associados a um nível elevado de resistência a *β*-lactâmicos (BATISTA *et al.*, 2023). De acordo com dados de 2016 fornecidos pelo Brasil à ONU, os *β*-lactâmicos são os antibióticos mais consumidos pela população brasileira, representando 53% das vendas totais desses medicamentos no país (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018b; MACHADO *et al.*, 2023). A elevada presença de genes associados à resistência aos *β*-lactâmicos, bem como diferentes genes codificadores de *β*-lactamases, no Brasil, já foi documentada, inclusive em bactérias como *Ochrobactrum* e *Achromobacter* isoladas do solo (FURLAN; STEHLING, 2017). Esses achados apontam para a necessidade de uma abordagem contínua e abrangente para monitorar e mitigar a resistência antimicrobiana no contexto brasileiro.

Durante as análises, destacou-se o consenso observado na elevada prevalência do gene *lnu(D)* no contexto brasileiro. Embora haja poucos estudos sobre o gene *lnu(D)* no Brasil, evidências indicam sua ligação com infecções causadas pela bactéria *Streptococcus uberis*, uma causa frequente de mastite bovina (PETINAKI *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2021). As investigações conduzidas por Munk *et al.* (2022) mostraram que o *lnu(D)* foi atribuído predominantemente ao gênero *Enterococcus*. Além disso, estudos de águas fluviais brasileiras indicaram resistência a Lincosamidas e *β*-lactâmicos, ressaltando a importância desses genes em ambientes aquáticos e seu potencial impacto na saúde pública (GOMES *et al.*, 2023). Para as análises *CARD*, no entanto, o gene *qacH* demonstrou a maior abundância. Embora não existam estudos que demonstrem interesse por esse gene em particular nas amostras de esgotos ou águas de reuso brasileiras, o gene já foi relatado como predominante em *E. coli* no Rio das Velhas em Nova Lima – MG (DIAS *et al.*, 2021).

No Brasil, embora ações pontuais relacionadas à RAM tenham sido desenvolvidas em anos anteriores, a formalização de uma agenda nacional somente se concretizou em 2018, com a publicação do Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR) (CORRÊA *et al.*, 2022). Atualmente, este é o único plano de política pública brasileiro que não envolve a vigilância do uso dos antibióticos e da resistência apenas no

âmbito da saúde humana ou de alimentos contaminados com resíduos antibióticos e/ou micro-organismos resistentes como estabelecidos pelo Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos (PAN-VISA) (BRASIL, 2017).

Mesmo que estudos no Brasil já demonstrem a presença da resistência em diferentes ambientes, não foi identificada nenhuma instância instituída pelo Governo, como uma comissão ou grupo técnico interministerial, que coordene as políticas e ações nos setores de saúde humana, animal e ambiental, existindo apenas um Grupo Técnico de Resistência Antimicrobiana (GTAMR) para coordenar as ações do PANBR no âmbito do Mato Grosso do Sul e um grupo de trabalho para elaborar, avaliar e monitorar as ações e atividades estabelecidas no PAN-VISA (AGUIAR *et al.*, 2023).

Os esforços na redução da prescrição dos antimicrobianos e implementação de estratégias que estimulem o uso racional no nível comunitário ou no âmbito hospitalar têm merecido destaque no Brasil (FONTENELE; COSTA, 2023). No entanto, existem lacunas que colocam o Brasil na rota de risco rumo a uma catástrofe, sobretudo no monitoramento da utilização de antimicrobianos e na vigilância da RAM, como por exemplo, a subutilização do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde na divulgação de dados de RAM (AGUIAR *et al.*, 2023).

6.2 DIVERGÊNCIAS OBSERVADAS DE MUNK *et al.*

Ao contrário do estudo de Munk *et al.* (2022), onde a abundância de macrolídeos foi consideravelmente superior à encontrada neste projeto, muitos dos genes anotados que poderiam ser associados a essa classe de antibióticos agora são conhecidos por estar associados à multirresistência a várias classes de drogas antibióticas, exemplificado pelos genes *mdtE* e *mdtF*. Esses genes são responsáveis pela aquisição de resistência a fluoroquinolonas, penicilinas (*β*-lactâmicos) e eritromicina (macrolídeos). Esses dois genes, em particular, fazem parte do grupo *mdtEF-TolC*, estão envolvidos em bombas de efluxo múltiplo (*multi-efflux pumps*) e desempenham um papel significativo na MDR (MIRYALA; RAMAIAH, 2019).

Durante as análises realizadas em Munk *et al.* (2022), a ferramenta ResFinder foi utilizada para identificar os GRAMs em 101 países, indicando evidências de 557 GRAMs diferentes e um total de 127 GRAMs em pelo menos metade das amostras.

No presente estudo, identificamos 127 GRAMs em comum para os quatro bancos de dados, com apenas 30 GRAMs comuns a todos os países. Essa discrepância pode ser atribuída à diferença no tamanho da amostra.

Uma pesquisa recente comparou os dados de riqueza de famílias anotadas entre esses quatro bancos de dados usando o ABRicate, incorporando uma versão mais recente do banco de dados ResFinder. Os resultados indicaram que o *CARD* possui a maior diversidade em relação aos outros bancos, enquanto o ResFinder, em sua versão mais antiga, exibe a menor diversidade (GSCHWIND *et al.*, 2023). A utilização de um único banco de dados pode resultar em subestimação ou superestimação da diversidade genética, comprometendo a precisão das análises (EWALD *et al.*, 2022). Desta forma, integrar uma abordagem com múltiplos bancos de dados permite uma análise mais robusta e compreensiva da realidade.

6.2.1 A diferença de anotações do banco de dados *CARD*

A discrepância na abundância entre *mefA* e *mel* na Austrália é explicada pela própria nomenclatura do *CARD*, que considera os genes *mefA*, *mel* e *msrD* como sinônimos, optando pela designação "*mel*" para esses genes. No entanto, neste estudo, escolhemos adotar a nomenclatura "*mef*", associada à nomenclatura "*mel*", uma vez que, em alguns artigos, eles são tratados como elementos distintos, embora intimamente relacionados dentro do mesmo *operon* (PEELA; SHARMA; SISTLA, 2020). Detalhes adicionais podem ser encontrados no documento de padronização de nomenclatura disponível no apêndice S1.

6.3 DISTRIBUIÇÃO DE *INTEGRONS*

Os dados referentes à presença de *integrons* nestes países são inovadores, tendo em vista que as investigações de Munk *et al.* (2022) se concentraram exclusivamente na detecção de plasmídeos nessas bibliotecas. Sabe-se que correlações significativas entre GRAMs e a presença de *integrons* indicam um potencial para maior taxa de proliferação de RAM no ambiente (LAMBA; AHAMMAD, 2017). A presença de *integrons* classe 1 já é bem relatada como os mais abundantes em águas de reuso e esgotos. Sua alta prevalência ao longo da ETE e no efluente

sugere que os GRAMs poderiam estar disseminando ativamente a resistência entre bactérias ambientais e patogênicas (JANKOWSKI *et al.*, 2022). No entanto, o conhecimento sobre os impactos do tratamento de águas residuais nos *integrons* e nos genes cassetes ainda é limitado (AN *et al.*, 2018).

Atualmente a compreensão dos cassetes de genes dos *integrons* revela que estes normalmente consistem em um número limitado de genes e famílias de GRAMs. Até o momento, um número restrito de pouco mais de 40 GRAMs foram identificados e descritos nos cassetes de genes de *integrons* classe I, associados a resistência à aminoglicosídeos, *β*-lactâmicos, cloranfenicóis, macrolídeos, sulfonamidas e desinfetantes (STALDER *et al.*, 2012; SABBAGH *et al.*, 2021). Estudos voltados para a compreensão do panorama geográfico de distribuição de *integrons* são escassos, para não dizer que praticamente inexistem. O cenário atual envolve análises individuais de países, frequentemente acompanhadas por uma avaliação secundária dos cassetes de genes dos *integrons* nesses ambientes.

A respeito do continente africano, em análises de ETEs na África do Sul, mais da metade das amostras foram observadas com *integrons*, e destes, boa parte carregando GRAMs *qac* capazes de contribuir na aquisição da RAM aos *QACs* (MBANGA *et al.*, 2021).

Isolados da bactéria gram-negativa *Citrobacter braakii* ST1110, provenientes de amostras de esgoto australiano, apresentavam *integrons-integrase* classe 1 e GRAMs associados à resistência a uma ampla gama de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, *β*-lactâmicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, fosfomicinas, macrolídeos, sulfonamidas, tetraciclinas e trimetoprima (HEM *et al.*, 2022). Amostras de estuário na Malásia demonstraram uma alta prevalência de *integrons* classe I em *E. coli*, juntamente com cassetes de genes relacionados a resistência aos fármacos aminoglicosídeos e trimetroprima (GHADERPOUR *et al.*, 2015).

No cenário europeu, análises indicaram que a presença de *integrons* e GRAMs ao longo do percurso de uma ETE desempenha um papel significativo na concentração desses elementos nos rios que recebem a água tratada para reuso (SABRI *et al.*, 2020). Amostras domésticas de resíduos antes da chegada ao esgoto, na Alemanha, mostraram que a presença de *intI1* ocorreu em 96,3% dos domicílios (SCHAGES *et al.*, 2020).

Nos EUA, análises da região de *Twin Falls* no vale do Rio *Snake* encontraram correlações estatisticamente significativas de abundância relativa entre o gene *Erm(B)* e o *intI1* (DUNGAN; BJORNEBERG, 2020). A alta concentração de *intI 1* já foi relatada em todas as amostras ao longo do curso de uma ETE no Texas (MUKHERJEE *et al.*, 2021). O *qacH* já foi observado em grande predominância em cassetes de genes no Rio das Velhas em Minas Gerais (DIAS *et al.*, 2021).

Em análises de amostras de *E. coli* na Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul, a maioria dos isolados apresentaram resistência aos *QACs*, com todos os isolados exibindo o gene *qacEΔ1* no segmento conservado 3' do *integron* (CANAL *et al.*, 2016). Além disso, uma quantidade significativa de *integrons* carregando GRAM's responsáveis pela aquisição de resistência a carbapenêmicos (*β*-lactâmicos) foi documentada em ETEs de Minas Gerais (MACHADO *et al.*, 2023).

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os desfechos desta pesquisa evidenciaram que Zâmbia, Austrália e Brasil assumiram posições de liderança em termos de abundância e riqueza de GRAMs conforme avaliado por meio das análises efetuadas pelo ABRicate pelos bancos de dados testados. É imprescindível acrescentar que, dentre esses países, apenas a Austrália implementou efetivamente um plano abrangente para o controle e monitoramento focalizado da RAM. Em contraste, a Zâmbia encontra-se em uma posição crítica no que se diz respeito a políticas públicas de contingenciamento da RAM. No contexto brasileiro, mesmo com um plano nacional para o controle da RAM, este permanece restrito ao âmbito da saúde e negligenciado no cenário mais amplo do poder público.

No que concerne aos bancos de dados submetidos a teste, o *CARD* destacou-se por apresentar a maior abundância e dissimilaridades na riqueza de genes anotados. Por outro lado, o ResFinder demostrou menor abundância e riqueza nas anotações para todos os bancos de dados, indicando uma lacuna que aparenta ter sido corrigida nas atualizações mais recentes. Tal disparidade do *CARD* para os demais bancos de dados, pode ser atribuída ao método de curadoria adotado pelo *CARD*, que é continuamente atualizado e fomenta a participação ativa da comunidade científica em sua equipe, proporcionando uma abordagem transparente e colaborativa.

Alguns GRAMs encontrados em abundância em alguns países sequer foram relatados na literatura atual em análises de esgoto, águas de reuso ou mesmo águas superficiais, como é caso de *lnuD* para o Brasil. Neste cenário, é preciso realizar uma comparação com dados de outros países da América Latina ou mesmo de outros estados brasileiros para determinar se esses GRAMs exclusivos estão restritos a determinados países ou se apresentam padrões de distribuição. Além disso, investigar o potencial de transmissão desses GRAMs para outros microrganismos e possíveis origens.

Ao longo da execução do projeto, constatou-se a escassez de dados referentes ao panorama global da distribuição geográfica de *integrons* e dos genes que podem ser transportados por essas estruturas. Destaca-se a necessidade de aprofundamento em estudos sobre os cassetes de genes, bem como sobre os

próprios genes que os *integrons* podem carregar. Além disso, um interesse crescente na compreensão dos efeitos desses elementos no ambiente de esgoto está apenas começando a se desenvolver, destacando a urgência de uma maior atenção e investimento nesses temas. A análise abrangente dos dados revelou padrões relacionados à presença de GRAMs e a prevalência de *integrons* em amostras provenientes de seis países. Fazendo-se necessário aprofundar a compreensão dessa dinâmica complexa.

REFERÊNCIAS

ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, jun. 2020.

AGUIAR, J. N. *et al.* Evolução das políticas brasileiras de saúde humana para prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos: revisão de escopo. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. 1, 22 maio 2023.

AKRAMI, F.; RAJABNIA, M.; VAZIFESIRZARI, I. Resistance *integrons*. Mini review. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 10, n. 4, set. 2019.

ALHASSANI, R. Y. *et al.* Drug Therapies Affecting Renal Function: An Overview. **Cureus**, v. 13, n. 11, p. e19924, 26 nov. 2021.

AMINOV, R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. **Frontiers in Microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.

AN, R. *et al.* Xenogenetic evolutionary of *integrons* promotes the environmental pollution of antibiotic resistance genes — Challenges, progress and prospects. **Water Research**, v. 231, p. 119629, mar. 2023.

AN, X.-L. *et al.* Impact of Wastewater Treatment on the Prevalence of *Integrons* and the Genetic Diversity of Integron Gene Cassettes. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 9, maio 2018.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. Veterinary Drugs Residues: Coccidiostats. Em: **Encyclopedia of Food Safety**. Amsterdam: Elsevier, 2014. v. 3p. 63–75.

ANG, C. W. *et al.* Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 7636–7657, 28 set. 2017.

ANTELO, V. *et al.* Metagenomic strategies identify diverse integron-integrase and antibiotic resistance genes in the Antarctic environment. **MicrobiologyOpen**, v. 10, n. 5, p. e1219, out. 2021.

Antibiotic susceptibility diagnostics for the future. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1603–1603, 20 set. 2019.

ARONSON, J. K. (ed.). Daptomycin. *In*: **Meyler's Side Effects of Drugs:** the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions. 16. ed. Amsterdam Boston Heidelberg: Elsevier, 2016a. p. 831–834.

ARONSON, J. K. (ed.). Streptogramins. *In*: **Meyler's side effects of drugs:** the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions. 16. ed. Amsterdam Boston Heidelberg: Elsevier, 2016b. p. 499.

ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49–59, 3 mar. 2017.

ASLAM, B. *et al.* Carbapenem Resistance: Mechanisms and Drivers of Global Menace. *In*: KIRMUSAOĞLU, S.; BHONCHAL BHARDWAJ, S. (eds.). **Pathogenic Bacteria**. [S.l.]: IntechOpen, 2020.

AUSTRALIAN COMMISSION ON SAFETY AND QUALITY IN HEALTH CARE. **AURA 2016: first Australian report on antimicrobial use and resistance in human health**. Sydney: ACSQHC, 2016.

AUSTRALIAN COMMISSION ON SAFETY AND QUALITY IN HEALTH CARE. **AURA 2019: Third Australian report on antimicrobial use and resistance in human health**. Sydney: ACSQHC, 2019.

AUSTRALIAN COMMISSION ON SAFETY AND QUALITY IN HEALTH CARE. **AURA 2021: Fourth Australian report on antimicrobial useand resistance in human health**. Sydney: ACSQHC, 2021.

BAN, N. *et al.* Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. **Nature**, v. 400, n. 6747, p. 841–847, ago. 1999.

BARNES V, L. *et al.* Antimicrobial susceptibility testing to evaluate minimum inhibitory concentration values of clinically relevant antibiotics. **STAR Protocols**, v. 4, n. 3, p. 102512, set. 2023.

BARRAUD, O. *et al. Integrons*, a predictive biomarker for antibiotic resistance in acute sepsis: the IRIS study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 1, p. 213–217, 24 dez. 2021.

BATISTA, M. P. B. *et al.* Diversity of bacteria carrying antibiotic resistance genes in hospital raw sewage in Southeastern Brazil. **Water Science and Technology**, v. 87, n. 1, p. 239–250, 1 jan. 2023.

BEHRUZNIA, M.; GORDON, D. M. Molecular and metabolic characteristics of wastewater associated *Escherichia coli* strains. **Environmental Microbiology Reports**, v. 14, n. 4, p. 646–654, ago. 2022.

BHAT, B. A. *et al. Integrons* in the development of antimicrobial resistance: critical review and perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1231938, 31 ago. 2023.

BINDA, E.; MARINELLI, F.; MARCONE, G. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. **Antibiotics**, v. 3, n. 4, p. 572–594, 4 nov. 2014.

BISACCHI, G. S. Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded “Discovery Story”: Miniperspective. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 4874–4882, 25 jun. 2015.

BLEY, C.; VAN DER LINDEN, M.; REINERT, R. R. mef(A) is the predominant macrolide resistance determinant in Streptococcus pneumoniae and Streptococcus pyogenes in Germany. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 5, p. 425–431, maio 2011.

BONOMO, R. A. β-Lactamases: A Focus on Current Challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, p. a025239, jan. 2017.

BOOLCHANDANI, M.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 6, p. 356–370, 18 mar. 2019.

BORG, A.; PAVLOV, M.; EHRENBERG, M. Mechanism of fusidic acid inhibition of RRF- and EF-G-dependent splitting of the bacterial post-termination ribosome. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 7, p. 3264–3275, 20 abr. 2016.

BOSQUESI, P. L. *et al.* Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, 2008.

BRAR, R. K. *et al.* Fluoroquinolone antibiotics: An overview. **Adesh University Journal of Medical Sciences & Research**, v. 2, n. 1, p. 26–30, 23 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da. Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria n° 448, de 10/09/1998**. Dispõe sobre a proibição de fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações, e de aditivos alimentares que especifica e revoga a portaria que menciona. *LEX: Legislação Federal e Marginália*, Brasília, 10 set. 1998, p. 4392.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017, p. 82.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 8, p. a025247, ago. 2016.

C REYGAERT, W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482–501, 26 jun. 2018.

CABEZÓN, A. *et al.* Uncovering the mechanisms of cyclic peptide self-assembly in membranes with the chirality-aware MA(R/S)TINI forcefield. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 642, p. 84–99, jul. 2023.

CANAL, N. *et al.* Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant Escherichia coli isolated from surface water. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 337–344, abr. 2016.

CHEN, J.; BOYACI, H.; CAMPBELL, E. A. Diverse and unified mechanisms of transcription initiation in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 95–109, fev. 2021.

CHERNOV, V. M. *et al.* Omics of antimicrobials and antimicrobial resistance. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 5, p. 455–468, maio 2019.

CHO, S. *et al.* Distribution of Antibiotic Resistance in a Mixed-Use Watershed and the Impact of Wastewater Treatment Plants on Antibiotic Resistance in Surface Water. **Antibiotics**, v. 12, n. 11, p. 1586, nov. 2023.

CHOPRA, I. Bacterial RNA polymerase: a promising target for the discovery of new antimicrobial agents. **Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)**, v. 8, n. 8, p. 600–607, ago. 2007.

CHOPRA, I. CHAPTER 2 - Modes of action. *In*: FINCH, R. G. *et al.* (eds.). **Antibiotic and Chemotherapy**. 9. ed. London: Elsevier, 2010. p. 10–23.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, jun. 2001.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 1, p. 26–40, jan. 2020.

CLARO, B.; BASTOS, M.; GARCIA-FANDINO, R. 4 - Design and applications of cyclic peptides. *In*: KOUTSOPOULOS, S. (ed.). **Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering**. [S.l.]: Elsevier, 2018. p. 87–129.

CONCEIÇÃO, S.; QUEIROGA, M. C.; LARANJO, M. Antimicrobial Resistance in Bacteria from Meat and Meat Products: A One Health Perspective. **Microorganisms**, v. 11, n. 10, p. 2581, 17 out. 2023.

CONSTABLE, P. D. *et al.* 6 - Practical Antimicrobial Therapeutics. *In*: CANADIAN VETERINARY JOURNAL (ed.). **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. Edition 11 ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017. p. 153–174.

CORRÊA, J. S. *et al.* Antimicrobial resistance in Brazil: an integrated research agenda. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 56, p. e20210589, 2022.

CROWE-MCAULIFFE, C. *et al.* Structural basis of ABCF-mediated resistance to pleuromutilin, lincosamide, and streptogramin A antibiotics in Gram-positive pathogens. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 3577, 11 jun. 2021.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, set. 2010.

D'COSTA, V. M. *et al.* Sampling the Antibiotic Resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 374–377, 20 jan. 2006.

DEAN, C. R. *et al.* Mode of Action of the Monobactam LYS228 and Mechanisms Decreasing *In Vitro* Susceptibility in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. e01200-18, out. 2018.

DIAS, M. F. *et al.* Exploring antibiotic resistance in environmental integron-cassettes through intI-attC amplicons deep sequencing. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 363–372, mar. 2021.

DIDELOT, X. *et al.* Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 9, p. 601–612, set. 2012.

DIKOUMBA, A.-C. *et al.* Molecular epidemiology of antimicrobial resistance in central africa: A systematic review. **Access Microbiology**, v. 5, n. 8, 1 ago. 2023.

DING, L. *et al. In Vivo* Development of Aztreonam Resistance in Meropenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa Owing to Overexpression of the *bla* PDC-16. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 3, p. e03080-22, 15 jun. 2023.

DINOS, G. P. The macrolide antibiotic renaissance. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 18, p. 2967–2983, set. 2017.

DRLICA, K.; ZHAO, X.; MALIK, M. Quinolones. *In*: SCHAECHTER, M. (ed.). **Encyclopedia of Microbiology**. 3. ed. Amsterdam Boston: Elsevier/Academic Press, 2009. p. 707–716.

DUNGAN, R. S.; BJORNEBERG, D. L. Antibiotic resistance genes, class 1 *integrons*, and IncP-1/IncQ-1 plasmids in irrigation return flows. **Environmental Pollution**, v. 257, p. 113568, fev. 2020.

EMA/CVMP/CHMP. **Categorisation of antibiotics in the European Union**. Amsterdan: European Medicines Agency/Committee for Medicinal Products for Veterinary Use/Committee for Medicinal Products for Human Use, 2019. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2023.

ENDALE, H.; MATHEWOS, M.; ABDETA, D. Potential Causes of Spread of Antimicrobial Resistance and Preventive Measures in One Health Perspective-A Review. **Infection and Drug Resistance**, v. 16, p. 7515–7545, dez. 2023.

ESCUDERO, J. A. *et al.* The Integron: Adaptation On Demand. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 2, 2 abr. 2015.

ESCUDERO, J. A.; LOOT, C.; MAZEL, D. *Integrons* as Adaptive Devices. *In*: RAMPELOTTO, P. H. (ed.). **Molecular Mechanisms of Microbial Evolution**. Grand Challenges in Biology and Biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 199–239.

EWALD, H. *et al.* Searching two or more databases decreased the risk of missing relevant studies: a metaresearch study. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 149, p. 154–164, set. 2022.

FALAGAS, M. E. *et al.* Fosfomycin. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 321–347, abr. 2016.

FANNING, S.; WANG, J.; LEONARD, N. Veterinary Drugs Residues: Antibacterials. *In*: MOTARJEMI, Y. (ed.). **Encyclopedia of Food Safety**. Amsterdam: Elsevier, 2014. v. 3p. 39–44.

FEDERAL OFFICE OF PUBLIC HEALTH. **How is antibiotic resistance evolving?** Disponível em: <https://www.bag.admin.ch/bag/en/home/krankheiten/infektionskrankheiten-bekaempfen/antibiotikaresistenzen/wie-entwickelt-sich-die-antibiotikaresistenzlage---.html>. Acesso em: 25 out. 2023.

FEDERAL OFFICE OF PUBLIC HEALTH; FEDERAL FOOD SAFETY AND VETERINARY OFFICE. **Swiss Antibiotic Resistance Report 2018**: Usage of Antibiotics and Occurrence of Antibiotic Resistance in Switzerland. Zürich: Federal Office of Public Health FOPH, 2018.

FEDERAL OFFICE OF PUBLIC HEALTH; FEDERAL FOOD SAFETY AND VETERINARY OFFICE. **Swiss Antibiotic Resistance Report 2022**: Usage of Antibiotics and Occurrence of Antibiotic Resistance in Switzerland. Zürich: Federal Office of Public Health FOPH, 2022.

FEDERAL TASK FORCE ON COMBATING ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA. **NATIONAL ACTION PLAN FOR COMBATING ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA 2020-2025**. Washington, D.C.: ASPE - Assistant Secretary for Planning and Evaluation, 2020. Disponível em: <https://aspe.hhs.gov/reports/national-action-plan-combating-antibiotic-resistant-bacteria-2020-2025>.

FERNANDES, P. Fusidic Acid: A Bacterial Elongation Factor Inhibitor for the Oral Treatment of Acute and Chronic Staphylococcal Infections. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 1, p. a025437, jan. 2016.

FICAI, A.; GRUMEZESCU, A. M. (eds.). **Nanostructures for antimicrobial therapy**. 1. ed. Amsterdam, Netherlands; Cambridge, MA: Elsevier, 2017.

FONTENELE, R. D.; COSTA, C. L. Resistência antimicrobiana: os desafios nas infecções bacterianas multirresistentes no Brasil. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 3, p. 11347–11357, 2 jun. 2023.

FOZO, E. M.; RUCKS, E. A. Chapter Two - The Making and Taking of Lipids. *In*: POOLE, R. K. (ed.). **Advances in Microbial Physiology**. 1. ed. [s.l.]: Elsevier, 2016. v. 69p. 51–155.

FURLAN, J. P. R.; STEHLING, E. G. High-level of resistance to β-lactam and presence of β-lactamases encoding genes in Ochrobactrum sp. and Achromobacter sp. isolated from soil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 11, p. 133–137, dez. 2017.

FYFE, C. *et al.* Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 10, p. a025395, out. 2016.

GALLARDO-GARRIDO, C. *et al.* Nitrofuran drugs beyond redox cycling: Evidence of Nitroreduction-independent cytotoxicity mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 401, p. 115104, ago. 2020.

GENG, H.; JIANG, R. cAMP receptor protein (CRP)-mediated resistance/tolerance in bacteria: mechanism and utilization in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11, p. 4533–4543, jun. 2015.

GERBA, C. P. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 464–469, 15 jan. 2015.

GERMOVSEK, E.; BARKER, C. I.; SHARLAND, M. What do I need to know about aminoglycoside antibiotics? **Archives of disease in childhood - Education & practice edition**, v. 102, n. 2, p. 89–93, abr. 2017.

GHADERPOUR, A. *et al.* Diverse and abundant multi-drug resistant *E. coli* in Matang mangrove estuaries, Malaysia. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 977, 29 set. 2015.

GHALY, T. M. *et al.* High diversity and rapid spatial turnover of integron gene cassettes in soil. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 1567–1574, maio 2019.

GHALY, T. M. *et al.* The Peril and Promise of *Integrons*: Beyond Antibiotic Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 455–464, jun. 2020.

GIBSON, J. The ansamycins: a novel class of hypolipidemic agents with a high affinity for lipoproteins. **Atherosclerosis**, v. 112, n. 1, p. 47–57, 6 jan. 1995.

GIDLA, V. V. S. *et al. Integrons*: A Mobile Genetic Element of Concern in Antimicrobial Resistance Gene Transfer: An Overview. **Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 1–5, 9 maio 2023.

GILES, J.; ROBERTS, A. Chapter Seven - Clostridioides difficile: Current overview and future perspectives. *In*: DONEV, R. (ed.). **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. Londres: Academic Press, 2022. v. 129p. 215–245.

GILLINGS, M. R. *Integrons*: Past, Present, and Future. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 2, p. 257–277, jun. 2014.

GILLINGS, M. R. Class 1 *integrons* as invasive species. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 10–15, ago. 2017.

GOMES, R. P. *et al.* Occurrence of Antibiotic Resistance Genes, Antibiotics-Resistant and Multi-Resistant Bacteria and Their Correlations in One River in Central-Western Brazil. **Water**, v. 15, n. 4, p. 747, 14 fev. 2023.

GOULD, K. CHAPTER 46 - Endo*CARD*itis. *In*: FINCH, R. G.; GREENWOOD, D.; NORRBY, ; WHITLEY **Antibiotic and Chemotherapy**. 9. ed. Philadelphia: Elsevier, 2010. p. 589–592.

GREENWOOD, D. *et al.* (eds.). **Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control**. 18. ed. Edinburgh; New York: Churchill Livingstone, 2012.

GROSSMAN, T. H. Tetracycline Antibiotics and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 4, p. a025387, abr. 2016.

GSCHWIND, R. *et al.* ResFinderFG v2.0: a database of antibiotic resistance genes obtained by functional metagenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. W1, p. W493–W500, 5 jul. 2023.

GUIDI, L. R. *et al.* Advances on the chromatographic determination of amphenicols in food. **Talanta**, v. 162, p. 324–338, jan. 2017.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GUO, X. *et al.* Structure and function of FusB: an elongation factor G-binding fusidic acid resistance protein active in ribosomal translocation and recycling. **Open Biology**, v. 2, n. 3, p. 120016, mar. 2012.

GUPTA, V. *et al.* A Multicenter Evaluation of the US Prevalence and Regional Variation in Macrolide-Resistant *S. pneumoniae* in Ambulatory and Hospitalized Adult Patients in the United States. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 8, n. 7, p. ofab063, 1 jul. 2021.

HAN, R. *et al.* Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Adult and Children Patients in China. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 314, 3 jul. 2020.

HEDGES, R. W. *et al.* Genetic and biochemical properties of AER-1, a novel carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase from Aeromonas hydrophila. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 4, p. 479–484, abr. 1985.

HEM, S. *et al.* Genomic Analysis of Carbapenem-Resistant Comamonas in Water Matrices: Implications for Public Health and Wastewater Treatments. **Applied and environmental microbiology**, v. 88, n. 13, p. e0064622, jul. 2022.

HENDRIKSEN, R. S. *et al.* Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1124, 8 mar. 2019.

HILL, A. M.; STAUNTON, J. Type I Modular PKS. *In*: HUNG-WEN, H.-W. (BEN); MANDER, L. (eds.). **Comprehensive Natural Products II**. Oxford: Elsevier Science, 2010. v. 1p. 385–452.

HO, J. Y. *et al.* Multidrug-resistant bacteria and microbial communities in a river estuary with fragmented suburban waste management. **Journal of Hazardous Materials**, v. 405, p. 124687, mar. 2021.

HOOPER, D. C. Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. Supplement_1, p. S9–S15, 15 mar. 2001.

HORA, P. I. *et al.* Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 7, n. 9, p. 622–631, 8 set. 2020.

HOWARTH, T. *et al.* Antibiotic use for Australian Aboriginal children in three remote Northern Territory communities. **PLOS ONE**, v. 15, n. 4, p. e0231798, 17 abr. 2020.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, out. 2019.

IANNELLI, F. *et al.* Type M Resistance to Macrolides Is Due to a Two-Gene Efflux Transport System of the ATP-Binding Cassette (ABC) Superfamily. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1670, 31 jul. 2018.

J, J. *et al.* Prevalence of macrolide resistance and in vitro activities of six antimicrobial agents against clinical isolates of Streptococcus pneumoniae from a multi-center surveillance in Malaysia. **The Medical Journal of Malaysia**, v. 68, n. 2, p. 119–124, abr. 2013.

JAHANTIGH, M. *et al.* Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 267, dez. 2020.

JANKOWSKI, P. *et al.* Metagenomic community composition and resistome analysis in a full-scale cold climate wastewater treatment plant. **Environmental microbiome**, v. 17, n. 1, p. 3, jan. 2022.

KANCHUGAL P, S.; SELMER, M. Structural Recognition of Spectinomycin by Resistance Enzyme ANT(9) from Enterococcus faecalis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. e00371-20, 21 maio 2020.

KANNIGADU, C.; N'DA, DAVID. D. Recent Advances in the Synthesis and Development of Nitroaromatics as Anti-Infective Drugs. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 36, p. 4658–4674, 23 out. 2020.

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

KARKMAN, A. *et al.* Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 220–228, mar. 2018.

KARY, S. C. *et al.* The Global Regulatory Cyclic AMP Receptor Protein (CRP) Controls Multifactorial Fluoroquinolone Susceptibility in Salmonella enterica Serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. e01666-17, nov. 2017.

KASANGA, M. *et al.* Antimicrobial Resistance Patterns and Risk Factors Associated with ESBL-Producing and MDR Escherichia coli in Hospital and Environmental Settings in Lusaka, Zambia: Implications for One Health, Antimicrobial Stewardship and Surveillance Systems. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 1951, 31 jul. 2023.

KAUSHIK, M. *et al. Integrons* in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 2, p. 167–176, fev. 2018.

KAWAI, Y. *et al.* On the mechanisms of lysis triggered by perturbations of bacterial cell wall biosynthesis. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 4123, 11 jul. 2023.

KESTER, M.; KARPA, K. D. (eds.). Chapter 4 Treatment of Infectious Diseases. *In*: **Elsevier's Integrated Review Pharmacology**. 2. ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2012. p. 41–78.

KHAN, S. R.; MANIALAWY, Y.; SIRAKI, A. G. Isoniazid and host immune system interactions: A proposal for a novel comprehensive mode of action. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 24, p. 4599–4608, dez. 2019.

KHONDKER, A.; RHEINSTÄDTER, M. C. How do bacterial membranes resist polymyxin antibiotics? **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 77, 17 fev. 2020.

KHOSHNOOD, S. *et al.* A review on mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of mupirocin against Staphylococcus aureus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1809–1818, jan. 2019.

KLEIN, D. J.; MOORE, P. B.; STEITZ, T. A. The Roles of Ribosomal Proteins in the Structure Assembly, and Evolution of the Large Ribosomal Subunit. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 1, p. 141–177, jun. 2004.

KORIPELLA, R. K. *et al.* Mechanism of Elongation Factor-G-mediated Fusidic Acid Resistance and Fitness Compensation in Staphylococcus aureus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 36, p. 30257–30267, ago. 2012.

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 165, 4 fev. 2021.

KRAUSE, K. M. *et al.* Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, p. a027029, jun. 2016.

KRUPENKO, N. I. Folate and Vitamins B6 and B12. Em: CATERINA, R. DE; MARTINEZ, J. A.; KOHLMEIER, M. (eds.). **Principles of nutrigenetics and nutrigenomics: fundamentals of individualized nutrition**. London: Academic Press, 2020. p. 295–302.

KUHLMANN, F. M.; FLECKENSTEIN, J. M. 157 - Antiparasitic Agents. *In*: COHEN, J.; POWDERLY, W. G.; OPAL, S. M. (eds.). **Infectious Diseases**. 4. ed. London: Elsevier, 2017. v. 2p. 1345-1372.e2.

KUMAR, S. *et al.* Genomic insights into evolution of extensive drug resistance in Stenotrophomonas maltophilia complex. **Genomics**, v. 112, n. 6, p. 4171–4178, nov. 2020.

KWON, J. H. 141 - Macrolides, Ketolides, Lincosamides and Streptogramins. *In*: COHEN, J.; POWDERLY, W. G.; OPAL, S. M. (eds.). **Infectious Diseases**. 4. ed. London: Elsevier, 2017. v. 2p. 1217-1229.e1.

LADE, H.; KIM, J.-S. Bacterial Targets of Antibiotics in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 398, 7 abr. 2021.

LAMBA, M.; AHAMMAD, S. Z. Sewage treatment effluents in Delhi: A key contributor of β-lactam resistant bacteria and genes to the environment. **Chemosphere**, v. 188, p. 249–256, dez. 2017.

LAMBERT, T. Antibiotics that affect the ribosome. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 31, n. 1, p. 57–64, 1 abr. 2012.

LAMONT, E. A.; DILLON, N. A.; BAUGHN, A. D. The Bewildering Antitubercular Action of Pyrazinamide. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 2, p. e00070-19, 20 maio 2020.

LE, V. V. H.; RAKONJAC, J. Nitrofurans: Revival of an "old" drug class in the fight against antibiotic resistance. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 7, p. e1009663, 8 jul. 2021.

LEE, J. *et al.* Differential effects of wastewater treatment plant effluents on the antibiotic resistomes of diverse river habitats. **The ISME Journal**, v. 17, n. 11, p. 1993–2002, nov. 2023.

LEE, N.; NGUYEN, H. Ethambutol. *In*: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

LI, B. *et al.* Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. **The ISME journal**, v. 9, n. 11, p. 2490–2502, nov. 2015a.

LI, B. *et al.* Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. **The ISME journal**, v. 9, n. 11, p. 2490–2502, nov. 2015b.

LI, X. *et al.* Origin and Evolution of Fusidane-Type Antibiotics Biosynthetic Pathway through Multiple Horizontal Gene Transfers. **Genome Biology and Evolution**, v. 12, n. 10, p. 1830–1840, 1 out. 2020.

LILJAS, A. Translation. *In*: MALOY, S.; HUGHES, K. (eds.). **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2013. p. 127–129.

LIMA, L. M. *et al.* β-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 208, p. 112829, dez. 2020.

LIU, H.-W.; BEGLEY, T. (eds.). **Comprehensive Natural Products III**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2020.

LIU, Y.-X. *et al.* A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. **Protein & Cell**, v. 12, n. 5, p. 315–330, maio 2021.

LIVERTOX. Fluoroquinolones. *In*: **LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]**. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012a.

LIVERTOX. Sulfonamides. *In*: **LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]**. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012b.

LÓPEZ-JACOME, L. E. *et al.* Anti-Bacterial Agents. *In*: REZAEI, N. (ed.). **Encyclopedia of Infection and Immunity**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 494–509.

MA, Z.; GINSBERG, A. M.; SPIGELMAN, M. 7.24 - Antimycobacterium Agents. *In*: TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. (eds.). **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Amsterdam: Elsevier, 2007. v. 7p. 699–730.

MACHADO, E. C. *et al.* Antibiotic resistance profile of wastewater treatment plants in Brazil reveals different patterns of resistance and multi resistant bacteria in final effluents. **Science of The Total Environment**, v. 857, p. 159376, jan. 2023.

MADDISON, J. E.; WATSON, A. D. J.; ELLIOTT, J. Chapter 8 - Antibacterial drugs. *In*: MADDISON, J. E.; PAGE, S. W.; CHURCH, D. B. (eds.). **Small Animal Clinical Pharmacology**. 2. ed. Edinburgh: Saunders-Elsevier, 2008. p. 148–185.

MAHONY, A. K.; MCNAMARA, P. J.; ARNOLD, W. A. Quaternary Ammonium Compounds (QACs) in Wastewater Influent and Effluent Throughout the COVID-19 Pandemic. **Environmental Science & Technology**, v. 57, n. 48, p. 20148–20158, 5 dez. 2023.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 31, s40168- 015- 0094–5, dez. 2015.

MARTENS, E.; DEMAIN, A. L.; KURTBÖKE, I. Chapter 7 - An Overview of the Industrial Aspects of Antibiotic Discovery. *In*: **Microbial Resources**. Online: Elsevier, 2017. p. 149–168.

MBANGA, J. *et al.* Genomic Insights of Multidrug-Resistant Escherichia coli From Wastewater Sources and Their Association With Clinical Pathogens in South Africa. **Frontiers in veterinary science**, v. 8, p. 636715, 2021.

MCARTHUR, A. G. et al. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3348–3357, jul. 2013.

MICHALOPOULOS, A. S.; LIVADITIS, I. G.; GOUGOUTAS, V. The revival of fosfomycin. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. e732–e739, nov. 2011.

MIRYALA, S. K.; RAMAIAH, S. Exploring the multi-drug resistance in Escherichia coli O157:H7 by gene interaction network: A systems biology approach. **Genomics**, v. 111, n. 4, p. 958–965, jul. 2019.

MOHAPATRA, S. *et al.* Quaternary ammonium compounds of emerging concern: Classification, occurrence, fate, toxicity and antimicrobial resistance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 445, p. 130393, mar. 2023.

MOLINA-QUIROZ, R. C. *et al.* Cyclic AMP Regulates Bacterial Persistence through Repression of the Oxidative Stress Response and SOS-Dependent DNA Repair in Uropathogenic *Escherichia coli*. **mBio**, v. 9, n. 1, p. e02144-17, 7 mar. 2018.

MOLOGNONI, L.; DAGUER, H.; HOFF, R. B. Chapter 12 - Analysis of nitrofurans residues in foods of animal origin. *In*: GALANAKIS, C. M. (ed.). **Food Toxicology and Forensics**. [s.l.] Academic Press, 2021. p. 379–419.

MUKHERJEE, M. *et al.* Increased Antimicrobial and Multidrug Resistance Downstream of Wastewater Treatment Plants in an Urban Watershed. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 657353, 2021.

MUNK, P. *et al.* Genomic analysis of sewage from 101 countries reveals global landscape of antimicrobial resistance. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 7251, 1 dez. 2022.

MURPHY, A. *et al.* An Ohio State Scenic River Shows Elevated Antibiotic Resistance Genes, Including Acinetobacter Tetracycline and Macrolide Resistance, Downstream of Wastewater Treatment Plant Effluent. **Microbiology spectrum**, v. 9, n. 2, p. e0094121, out. 2021.

MURRAY, B. E.; ARIAS, C. A.; NANNINI, E. C. 30 - Glycopeptides (Vancomycin and Teicoplanin), Streptogramins (Quinupristin-Dalfopristin), Lipopeptides (Daptomycin), and Lipoglycopeptides (Telavancin). *In*: BENNETT, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. (eds.). **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 8. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. v. 1p. 377-400.e4.

MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.

NAEEMMUDEEN, N. M. *et al.* Trends in antimicrobial resistance in Malaysia. **The Medical Journal of Malaysia**, v. 76, n. 5, p. 698–705, set. 2021.

NAUTA, K. M.; HO, T. D.; ELLERMEIER, C. D. The Penicillin-Binding Protein PbpP Is a Sensor of β-Lactams and Is Required for Activation of the Extracytoplasmic Function σ Factor σ^{P} in Bacillus thuringiensis. **mBio**, v. 12, n. 2, p. e00179-21, 27 abr. 2021.

NÉRON, B. *et al.* IntegronFinder 2.0: Identification and Analysis of *Integrons* across Bacteria, with a Focus on Antibiotic Resistance in Klebsiella. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 700, 24 mar. 2022.

NESME, J.; SIMONET, P. The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 913–930, abr. 2015.

NKENGASONG, J. N.; TESSEMA, S. K. Africa Needs a New Public Health Order to Tackle Infectious Disease Threats. **Cell**, v. 183, n. 2, p. 296–300, out. 2020.

NOWBUTH, A. A. *et al.* Antimicrobial resistance from a One Health perspective in Zambia: a systematic review. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 12, n. 1, p. 15, 3 mar. 2023.

NUÑEZ, T. A. *et al.* Novel Mobile *Integrons* and Strain-Specific Integrase Genes within Shewanella spp. Unveil Multiple Lateral Genetic Transfer Events within The Genus. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1102, 26 maio 2022.

OSAGIE, E. A.; OLALEKAN, S. H. Multiple Drug Resistance: A Fast-Growing Threat. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 21, n. 2, 10 set. 2019.

PACHECO-SILVA, É.; SOUZA, J. R. D.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 111–122, 2014.

PADBERG, S. 2.6 - Anti-infective Agents. *In*: SCHAEFER, C.; PETERS, P.; MILLER, R. K. (eds.). **Drugs During Pregnancy and Lactation**. 3. ed. [S.l.]: Academic Press, 2015. p. 115–176.

PALMER, A. A.; SKINNER, B. W. Aminoglycosides. *In*: WEXLER, P. (ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. 4. ed. [S.l.]: Academic Press, 2024. v. 1p. 385–391.

PATEL, P. *et al.* Antibiotics. *In*: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

PEELA, S. C. M.; SHARMA, J.; SISTLA, S. **Structure of Macrolide Efflux Protein (MefA/E) in Streptococcus pneumoniae: An in silico approach**. Preprint, submetido em 22 jul. 2020. DOI: https://doi.org/10.1101/2020.07.21.213744. Disponível em: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.07.21.213744. Acesso em: 30 set. 2023.

PELLEY, J. W. (ed.). 17 - Protein Synthesis and Degradation. *In*: **Elsevier's Integrated Biochemistry**. [S.l.]: Elsevier, 2007. p. 147–158.

PEREIRA-MAIA, E. C. *et al.* Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.

PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2928, 30 nov. 2018.

PETINAKI, E. *et al.* Lincomycin Resistance Gene *lnu* (D) in *Streptococcus uberis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 626–630, fev. 2008.

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

PRAVEENA, S. M. *et al.* Pharmaceuticals residues in selected tropical surface water bodies from Selangor (Malaysia): Occurrence and potential risk assessments. **Science of The Total Environment**, v. 642, p. 230–240, nov. 2018.

PUCCI, M. J. *et al.* 5.17 - Recent Epidemiological Changes in Infectious Diseases. Em: CHACKALAMANNIL, S.; ROTELLA, D.; WARD, S. E. (eds.). **Comprehensive Medicinal Chemistry III**. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 511–552.

RECHT, M. I.; PUGLISI, J. D. Aminoglycoside Resistance with Homogeneous and Heterogeneous Populations of Antibiotic-Resistant Ribosomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2414–2419, set. 2001.

RIDLEY, C. P.; KHOSLA, C. Polyketides. *In*: SCHAECHTER, M. (ed.). **Encyclopedia of Microbiology**. 3. ed. [S.l.]: Academic Press, 2009. p. 472–481.

ROCHA, J. *et al.* Comparison of Culture- and Quantitative PCR-Based Indicators of Antibiotic Resistance in Wastewater, Recycled Water, and Tap Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 21, p. 4217, 30 out. 2019.

RODRÍGUEZ, E. A. *et al.* Metagenomic analysis of urban wastewater resistome and mobilome: A support for antimicrobial resistance surveillance in an endemic country. **Environmental Pollution**, v. 276, p. 116736, maio 2021.

ROUMPEKA, D. D. *et al.* A Review of Bioinformatics Tools for Bio-Prospecting from Metagenomic Sequence Data. **Frontiers in Genetics**, v. 8, 6 mar. 2017.

ROWE, W. P. M. *et al.* Overexpression of antibiotic resistance genes in hospital effluents over time. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1617–1623, jun. 2017.

SABBAGH, P. *et al.* Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 24, n. 2, fev. 2021.

SABRI, N. A. *et al.* Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 1, p. 102245, fev. 2020.

SAMBAZA, S. S.; NAICKER, N. Contribution of wastewater to antimicrobial resistance: A review article. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 34, p. 23–29, set. 2023.

SANTOS, J. A.; LAMERS, M. H. Novel Antibiotics Targeting Bacterial Replicative DNA Polymerases. **Antibiotics**, v. 9, n. 11, p. 776, 4 nov. 2020.

SAPULA, S. A. *et al.* The scope of antimicrobial resistance in residential aged care facilities determined through analysis of *Escherichia coli* and the total wastewater resistome. **Microbiology Spectrum**, p. e00731-23, 3 out. 2023.

SARKAR, P. *et al.* A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. **MedChemComm**, v. 8, n. 3, p. 516–533, 2017.

SCHAGES, L. *et al.* The Household Resistome: Frequency of β-Lactamases, Class 1 *Integrons*, and Antibiotic-Resistant Bacteria in the Domestic Environment and Their Reduction during Automated Dishwashing and Laundering. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 23, nov. 2020.

SCHOLAR, E. Sulfonamides. *In*: ENNA, S. J.; BYLUND, D. B. (eds.). **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 1–4.

SEEMANN, T. **Abricate: Mass screening of Contigs for antibiotic resistance genes.** GitHub: San Francisco, CA, USA., 2016. Disponível em: <https://github.com/tseemann/abricate>

SHARIFZADEH, S. *et al.* Chapter Two - Chemical tools for selective activity profiling of bacterial penicillin-binding proteins. *In*: WENCEWICZ, T. (ed.). **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 2020. v. 638p. 27–55.

SHENG, Z.-K. *et al.* Mechanisms of Tigecycline Resistance among Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6982–6985, nov. 2014.

SILVA, N. C. C. *et al.* Whole-genome sequencing reveals high genetic diversity of Streptococcus uberis isolated from cows with mastitis. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 321, dez. 2021.

SILVER, L. L. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 2, p. a025262, fev. 2017.

SINGHAL, L.; SINGH, C.; GAUTAM, V. 7.06 - Colistin. *In*: KENAKIN, T. (ed.). **Comprehensive Pharmacology**. Amsterdam Oxford Cambridge: Elsevier, 2022. v. 7, p. 123–135.

SONG, J.-H. Macrolide resistance and genotypic characterization of Streptococcus pneumoniae in Asian countries: a study of the Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 457–463, 12 fev. 2004.

SONO, T. M. *et al.* Current rates of purchasing of antibiotics without a prescription across sub-saharan Africa; rationale and potential programmes to reduce inappropriate dispensing and resistance. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, p. 14787210.2023.2259106, 23 set. 2023.

STA ANA, K. M.; MADRIAGA, J.; ESPINO, M. P. β-Lactam antibiotics and antibiotic resistance in Asian lakes and rivers: An overview of contamination, sources and detection methods. **Environmental Pollution**, v. 275, p. 116624, abr. 2021.

STALDER, T. *et al.* Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: *integrons*. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1669–1683, dez. 1989.

SU, X.; XU, J.; NING, K. Parallel-META: efficient metagenomic data analysis based on high-performance computation. **BMC Systems Biology**, v. 6, n. S1, p. S16, jul. 2012.

TADESSE, B. T. *et al.* Antimicrobial resistance in Africa: a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 616, dez. 2017.

TAŞ, N. *et al.* Metagenomic tools in microbial ecology research. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 67, p. 184–191, fev. 2021.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. S3–S10, jun. 2006.

TIAN, M. *et al.* Pollution by Antibiotics and Antimicrobial Resistance in LiveStock and Poultry Manure in China, and Countermeasures. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 539, 6 maio 2021.

TOOKE, C. L. *et al.* β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3472–3500, ago. 2019.

TOPIC POPOVIC, N. *et al.* Detection and diversity of aeromonads from treated wastewater and fish inhabiting effluent and downstream waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 235–242, out. 2015.

ULUSEKER, C. *et al.* A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms andPerspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 717809, 11 out. 2021.

UNGUREANU, V. Macrolides, lincosamides, streptogramines (MLS): mechanisms of action and resistance. **Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia (Bucharest, Romania: 1990)**, v. 55, n. 2, p. 131–138, 2010.

UNICEF. **UNICEF Zambia Statistics**. Disponível em: <https://www.unicef.org/zambia/hivaids>. Acesso em: 27 ago. 2024.

UNISSA, A. N. *et al.* Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 45, p. 474–492, nov. 2016.

US CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES 2019**. Atlanta: US Department of Health and Human Services, 2019. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>.

VALLE, M. *et al.* Locking and Unlocking of Ribosomal Motions. **Cell**, v. 114, n. 1, p. 123–134, jul. 2003.

VAN BAMBEKE, F. *et al.* Chapter 130 - Mechanisms of action. *In*: COHEN, J.; OPAL, S. M.; POWDERLY, W. G. (eds.). **Infectious Diseases**. 3. ed. London: Mosby, 2010. v. 2p. 1288–1307.

VAN BAMBEKE, F. *et al.* Chapter 137 - Mechanisms of Action. *In*: COHEN, J.; POWDERLY, W. G.; OPAL, S. M. (eds.). **Infectious Diseases**. 4. ed. London: Elsevier, 2017. v. 2p. 1162-1180.e1.

VARDANYAN, R.; HRUBY, V. Antibiotics. Em: **Synthesis of Best-Seller Drugs**. Amsterdam: Elsevier, Academic Press, 2016. p. 573–643.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO, E. What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? — An overview and a discussion on perspectives. **Science of The Total Environment**, v. 514, p. 467–491, maio 2015.

VIT, C. *et al.* Cassette recruitment in the chromosomal Integron of *Vibrio cholerae*. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 10, p. 5654–5670, 4 jun. 2021.

WALL, A. M.; SCHUETZ, J. D. Genetic Basis for Quantitative and Qualitative Changes in Drug Targets. *In*: BERTINO, J. R. (ed.). **Encyclopedia of Cancer**. 2. ed. San Diego, Calif: Academic Press, 2002. p. 273–277.

WALLER, D. G.; SAMPSON, A. P. S. 51 - Chemotherapy of infections. *In*: WALLER, D. G.; SAMPSON, A. P. S. (eds.). **Medical Pharmacology and Therapeutics**. 5. ed. Edinburgh: Elsevier, 2018. p. 581–629.

WANG, D.; FARHANA, F. Biochemistry, RNA Structure. *In*: **StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

WOEGERBAUER, M. *et al.* Involvement of aph(3′)-IIa in the formation of mosaic aminoglycoside resistance genes in natural environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 19 maio 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO list of critically important antimicrobials for human medicine (WHO CIA list)**. [s.l.] World Health Organization, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241512220>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO list of critically important antimicrobials for human medicine (WHO CIA list)**. [s.l.] World Health Organization, 2018a. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation**. Geneva: World Health Organization, 2018b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 3 nov. 2023.

YAMBA, K. *et al.* Phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility profiles of Gram-negative bacteria isolated from bloodstream infections at a referral hospital, Lusaka, Zambia. **PLOS Global Public Health**, v. 3, n. 1, p. e0001414, 31 jan. 2023.

YANG, Q. *et al.* Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 7376–7416, 1 jan. 2021.

ZHANG, J. *et al.* Nitroimidazole-containing compounds and their antibacterial and antitubercular activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 376–388, out. 2019.

ZHANG, T. *et al.* Metagenomic insights into the antibiotic resistome in freshwater and seawater from an Antarctic ice-free area. **Environmental Pollution**, v. 309, p. 119738, set. 2022.

ZHANG, Y. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 790–795, 30 set. 2003.

ZHANG, Y. *et al.* Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, p. 2.4.03, 15 ago. 2014.

ZHANG, Y. *et al.* The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes. **Biosafety and Health**, v. 5, n. 1, p. 14–20, fev. 2023a.

ZHANG, Y. *et al.* Fate of antibiotic resistance genes and bacteria in a coupled water-processing system with wastewater treatment plants and constructed wetlands in coastal eco-industrial parks. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 252, p. 114606, mar. 2023b.

ZHENG, H.-S. *et al.* Electro-peroxone pretreatment for enhanced simulated hospital wastewater treatment and antibiotic resistance genes reduction. **Environment International**, v. 115, p. 70–78, jun. 2018.

ZHOU, J. *et al.* Breaking down the cell wall: Still an attractive antibacterial strategy. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 952633, 23 set. 2022.

ZINNER, S. H.; MAYER, K. H. 33 - Sulfonamides and Trimethoprim. *In*: BENNET, J. E.; DOLIN, R.; BLASER, M. J. (eds). **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 8 ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2015. v. 1, p. 410-418.e2.

APÊNDICE

Tabela adicional (S1) disponível em:

https://doi.org/10.17605/OSF.IO/HTC7K

ANEXO 1 - Classificação dos antibióticos e antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana de acordo com seu mecanismo de ação.

Anexo 1. Classificação dos antibióticos e antimicrobianos criticamente importantes para a saúde humana de acordo com seu mecanismo de ação. Lista dos antimicrobianos criticamente mais importantes na saúde humana de acordo com a OMS-ACI 2018 para a gestão da RAM. Antimicrobianos classificados pelo mecanismo que atuam dentro da célula do patógeno, o fim para o qual são designados e possível mecanismo de RAM bacteriana que pode ser encontrado para o agente.

Mecanismo de Ação	*Classificação*			*Antimicrobiano/ Antibiótico*	*Mecanismo de Resistência*	*Importância (OMS-ACI 2018)*	*Comentários*
Inibição da síntese da parede celular	**B-lactâmicos**	**Penicilinas**	naturais, aminopenicilinas e antipseudomonal	Ampicilina Ampicilina / sulbactam Amoxicilina Amoxicilina / clavulanato Azlocilina Carbenicilina Mezlocilina Penicilina G Penicilina V Piperacilina Piperacilina / tazobactam Ticarcilina Ticarcilina / clavulanato	Penicilina: Modificação do alvo Modificação / degradação do antibiótico Mudanças de expressão Efluxo do antibiótico Redução da permeabilidade	Criticamente importante	Terapia limitada para sífilis (penicilinas naturais) *Listeria*, *Enterococos* spp. (aminopenicilinas) e MDR *Pseudomonas* spp. (antipseudomonal) Possível transmissão de *Enterococcus* spp., Enterobacteriaceae incluindo *Escherichia coli*, bem como *Pseudomonas aeruginosa* de fontes não-humanas*
			Antiestafilocócico	cloxacilina dicloxacilina flucloxacilina oxacilina nafcilina		Alta importância	*S. aureus* incluindo SARM podem ser transferidos para pessoas a partir de animais
			Aminopenicilinas	Mecilinam		Alta importância	Potencial transmissão de Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli*, de fontes não humanas. Infecções MDR *Shigella* spp. Podem ser um problema regional
		Cefalosporinas	1ª geração	**Cefalexina** Cefalotina Cefradina Cefazolina		Alta importância	Transmissão potencial de Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli*, de fontes não humanas
			2ª geração	Cefaclor Cefamandol Cefuroxima Loracarbefe Cefamicina Cefotetano Cefoxitina			
			3ª geração	Cefixima Cefoperazona cefoperazona/sulbactam cefotaxima cefpodoxima ceftazidima ceftizoxima		Criticamente importante	**Terapia limitada para meningite bacteriana aguda e doença causada por Salmonella spp. Em crianças.** **Terapia limitada para**

Inibição da síntese da parede celular	**B-lactâmicos**	**Cefalosporinas**	4ª geração	Cefepima cefoselis cefpiroma			**infecções causadas por Enterobacteriaceae MDR, cuja incidência está aumentando em todo o mundo.** **Além disso, as cefalosporinas de 4ª geração fornecem terapia limitada para o tratamento empírico de pacientes neutropênicos com febre persistente.** **Pode resultar da transmissão de Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli* e Salmonella spp., de fontes não humanas.**
			5ª geração	Ceftarolina – fosamil Ceftobiprole		Criticamente importante	
		Carbapenêmicos (e outros penems)		Meropenem Ertapenem Faropenem Imipenem	Carbapenem: Modificação / degradação do antibiótico	Criticamente importante	Terapia limitada como parte do tratamento de doenças causadas por bactérias Gram-negativas MDR Transmissão potencial de Enterobacteriaceae incluindo *E. coli* e *Salmonella*
		Monobactam		**Astreonam** Carumonam	Astreonam: Modificação / degradação do antibiótico	Criticamente importante	Terapia limitada para infecções com gram-negativos MDR, especialmente com outras opções limitadas, incluindo ESBLs. Pode resultar da transmissão de Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli*, de fontes não humanas
	Outros inibidores de parede celular	**Glicopeptídeos** **&** **Lipoglicopeptideos**		Teicoplanina Vancomicina Televancina Ramoplanin Avoparcina Oritavancina Dalbavancina	Redução da permeabilidade Efluxo do antibiótico Mudanças de expressão	Criticamente importante	Terapia limitada para infecções causadas por MDR SARM e MDR *Enterococcus* spp. Potencial transmissão de *Enterococcus* spp. E SARM de fontes não humanas
		Isoniazida		**Isoniazida**	Mudanças de expressão Modificação do alvo	Criticamente importante	Antibiótico utilizado exclusivamente como primeira escolha no combate à Tuberculose
		Etambutol		**Etambutol**	Mudanças de expressão Modificação do alvo	Criticamente importante	Antibiótico utilizado exclusivamente como primeira escolha associado à outras drogas no combate à Tuberculose.
		Peptídeo Cíclico		**Bacitracina**	Efluxo do antibiótico Mudanças de expressão	Importante	
		Fosfomicina		**Fosfomicina**	Mudanças de expressão Modificação do alvo Modificação / degradação do antibiótico	Importante	Pode ser uma das terapias limitadas para *E. coli* produtora de toxina ShigaO157 em certas áreas geográficas

Inibição da síntese da parede celular	**Desestabilizadores de membrana**	**Polimixina**		**Colistina** [1] (ou Polimixina E)	Mudança do alvo Mudanças da expressão	Alta importância	As polimixinas podem ser a única terapia disponível para o tratamento de algumas infecções Gram-negativas MDR, por ex. *Pseudomonas* spp.
				Polymixina B		Alta importância	Terapia limitada para infecções bacterianas MDR Gram negativas, por ex., aquelas causadas por *Acinetobacter* spp. E *Pseudomonas aeruginosa*
		Lipopeptídeo		Daptomicina	Modificação / degradação do antibiótico Modificação do alvo	Criticamente importante	Terapia limitada para infecções causadas por *S. aureus* MDR. Potencial transmissão de *Enterococcus* spp. E MDR *S. aureus* de fontes não humanas
		Pirazinamida		Pirazinamida*	Modificação do alvo	Criticamente importante	Fármaco de primeira linha utilizada no tratamento da Tuberculose
Inibição da síntese de proteínas	**Subunidade ribossômica anti-30S**	**Aminoglicosídeos**	s/ desoxistreptamina	**Estreptomicina**	Modificação / degradação do antibiótico	Criticamente importante	Estreptomicina Terapia limitada como parte do tratamento da endo*CARD*ite enterocócica e da tuberculose multirresistente A transmissão potencial de *Enterococcus* spp., Enterobacteriaceae (incluindo *E. coli*) e *Mycobacterium* spp. De fontes não humanas
			anel de desoxistreptamina 4,6-dissubstituído	**Gentamicina** Amicacina Arbecacina Netilmicina Tobramicina	Gentamicina: Modificação do alvo Modificação / degradação do antibiótico Redução da permeabilidade Efluxo do antibiótico		
			anel de desoxistreptamina 4,5-dissubstituída	**Neomicina**	Modificação / degradação do antibiótico	Alta importância	Potencial transmissão de bactérias Gram negativas com resistência cruzada à estreptomicina a partir de fontes não humanas
			Outros aminoglicosídeos	**Espectinomicina**	Modificação / degradação do antibiótico		
		Tetraciclinas		**Doxiciclina** Clortetraciclina Clomociclina Demeclociclina Eravaciclina Linmeciclina Metaciclina Minociclina Omadaciclina Oxitetraciclina Penimepiciclina	Doxiciclina: Modificação do alvo Proteção do alvo Efluxo do antibiótico Redução da permeabilidade	Alta importância	Terapia limitada para infecções causadas por *Chlamydia* spp. E *Rickettsia* spp.

			Rolitetraciclina Tetraciclina			
Inibição da síntese de proteínas	**Subunidade ribossômica anti-30S**	**Glicilciclinas**	**Tigeciclina**	Proteção do alvo Efluxo do antibiótico	Criticamente importante	Terapia limitada para infecções por Enterobacteriaceae MDR. Terapia limitada para infecções causadas por SARM. Pode resultar da transmissão de SARM e Enterobacteriaceae de fontes não humanas
	Subunidade ribossômica anti-30S	**Macrolídeos** (incluindo compostos de 14, 15, 16 membros), cetolídeos	**Azitromicina** Claritromicina Eritromicina Midecamicina Roxitromicina Espiramicina Telitromicina	Azitromicina: Redução da permeabilidade Modificação do alvo Efluxo do antibiótico Modificação / degradação do antibiótico	Criticamente importante	Terapia limitada para infecções por *Legionella*, *Campylobacter* e *Salmonella* MDR. Potencial transmissão de *Campylobacter* spp. De fontes não humanas
		Anfenicóis	**Cloranfenicol** Trianfenicol	Cloranfenicol: Modificação do alvo Efluxo do antibiótico Modificação / degradação do antibiótico	Alta importância	Pode ser uma das terapias limitadas para meningite bacteriana aguda, febre tifóide e infecções respiratórias em certas áreas geográficas
		Lincosamida	**Clindamicina** Lincomicina	Clidamicina: Modificação do alvo Efluxo do antibiótico Modificação / degradação do antibiótico	Alta importância	Pode resultar da transmissão de *Enterococcus* spp. E *S. aureus*, incluindo SARM, de fontes não humanas.
		Oxazolidinonas	**Linezolida**	Modificação do alvo Efluxo do antibiótico	Criticamente importante	Terapia limitada para infecções causadas por *S. aureus* MDR e *Enterococcus* spp. Potencial transmissão de *Enterococcus* spp. E MDR *S. aureus* de fontes não humanas
		Estreptogramina	Quinupristina/**dalfo-pristina** Pristinamicina	Dalfopristina: Modificação do alvo Efluxo do antibiótico Modificação / degradação do antibiótico	Alta importância	Terapia limitada para infecções MDR causadas por *Enterococcus faecium* e *S. aureus* Potencial transmissão de *Enterococcus* spp. E MDR *S. aureus* de fontes não humanas
	EF-G	**Fusidanos**	**Ácido fusídico**	Redução da Permeabilidade Proteção do alvo	Alta importância	Pode ser uma das terapias limitadas para tratar infecções MDR por *S. aureus* em certas áreas geográficas
Inibição da Síntese de DNA	**Quinolonas & Fluoroquinolonas**		Cinoxacina Ácido nalidíxico Ácido pipemídico **Ciprofloxacina**	Ciprofloxacina: Modificação do alvo Proteção do alvo	Criticamente importante	Terapia limitada para *Campylobacter* spp., doença invasiva causada por *Salmonella* spp. E infecções MDR *Shigella* spp.

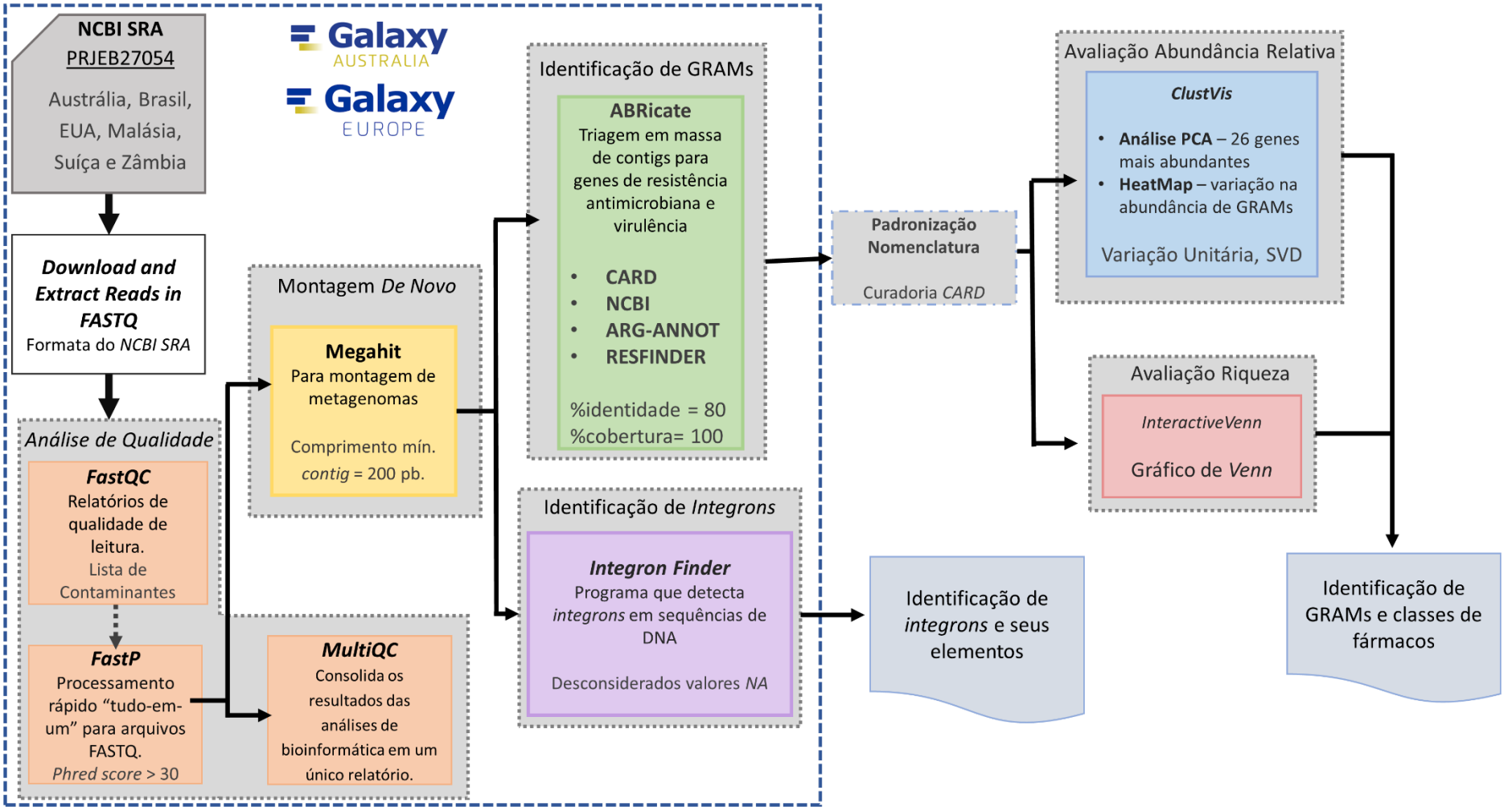
Inibição da Síntese de DNA	**Quinolonas & Fluoroquinolonas**		Enoxacina Gatifloxacino Gemifloxacina Levofloxacina Lomefloxacina Moxifloxacina Norfloxacina Ofloxacina Esparfloxacina	Efluxo do antibiótico Modificação / degradação do antibiótico Redução da permeabilidade		Potencial transmissão de *Campylobacter* spp. E Enterobacteriaceae incluindo *E. coli* e Salmonella spp. De fontes não humanas
	Grupo nitrocomposto	**Nitroimidazóis**	**Metronidazol*** Tinidazol Ornidazol Secnidazol	Metronidazol: Modificação / degradação do antibiótico	Importante	Antimicrobiano utilizado no tratamento de giardíase, amebíase e tricomoníase. Pode ser uma das terapias limitadas para algumas infecções anaeróbicas, incluindo C. *difficile*, em certas áreas geográficas Avaliação baseada apenas em propriedades antibacterianas
		Nitrofuranos	**Nitrofurantoína** Furazolidona	Nitrofurantoína: Efluxo do antibiótico Modificação do alvo	Importante	-
Inibidores de Síntese de RNA	**Ansamicinas**		**Rifampicina** Rifabutina Rifaximina	Rifampicina: Redução da permeabilidade Modificação / degradação do antibiótico Modificação do alvo	Criticamente importante	A terapia limitada como parte do tratamento de doenças micobacterianas, incluindo tuberculose, e a terapia medicamentosa única pode selecionar resistência Potencial transmissão de Mycobacterium spp. De fontes não humanas
	Mupirocina		**Mupirocina**	Modificação do alvo	Alta importância	Pode ser uma das terapias limitadas para infecções tropicais de *S. aureus* em certas áreas geográficas Transmissão potencial de SARM de fontes não humanas
Inibidores da síntese de ácido fólico	**Inibidores da diidrofolato redutase (DHFR)**	**Trimetoprima**	**Trimetoprima**	Trimetoprima: Modificação do alvo	Alta importância	Pode ser uma das terapias limitadas para meningite bacteriana aguda e outras infecções em certas áreas geográficas Transmissão potencial de Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli*, de fontes não humanas
	Inibidores do Ácido Fólico	**Sulfonamida**	**Sulfametoxazol**	Sulfametoxazol: Modificação do alvo Modificação do alvo Mudança da expressão		

Fonte: Elaborada pelo autor com base em (ABUSHAHEEN *et al.*, 2020; BOOLCHANDANI; D'SOUZA; DANTAS, 2019; DING *et al.*, 2023; HAN *et al.*, 2020; KANCHUGAL P; SELMER, 2020; PETERSON; KAUR, 2018; SHENG *et al.*, 2014; WOEGERBAUER *et al.*, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016, 2018a). [1] Teve seu uso abandonado durante alguns anos devido elevada incidência de nefrotoxicidade e de neurotoxicidade, porém, nas últimas décadas, o elevado número de surtos hospitalares provocados por bactérias Gramnegativo MDR, levou a re-introdução da colistina como fármaco de último recurso (DA SILVA, 2018).

* Mecanismos de resistência ainda não bem compreendidos.

ANEXO 2 - Fluxo de trabalho do delineamento metodológico embarcando todos os procedimentos e etapas empregados no estudo.

Anexo 2. Fluxo de trabalho do delineamento metodológico embarcando todos os procedimentos e etapas empregados no estudo.



ANEXO 3 - Dados gerais das bibliotecas dos seis países utilizadas nas análises.

Anexo 3. Dados gerais das bibliotecas dos seis países utilizadas nas análises.

Acesso	Tamanho (*Bytes*)	Ano Coleta	País	Continente	Latitude	Longitude
ERR2607374	591.22 Mb	2016	Austrália	Oceania	-35.246401	148.969753
ERR2607375	477.66 Mb	2016	Austrália	Oceania	-35.246401	148.969753
ERR2607376	2.79 Gb	2016	Austrália	Oceania	-35.246401	148.969753
ERR2607377	2.72 Gb	2016	Austrália	Oceania	-35.246401	148.969753
ERR2607378	466.81 Mb	2016	Austrália	Oceania	-37.9768333	144.6383056
ERR2607379	4.49 Gb	2016	Austrália	Oceania	-37.9768333	144.6383056
ERR2607380	209.93 Mb	2016	Austrália	Oceania	-37.9768333	144.6383056
ERR2607381	2.03 Gb	2016	Austrália	Oceania	-37.9768333	144.6383056
ERR2607382	766.35 Mb	2016	Austrália	Oceania	-37.9768333	144.6383056
ERR2607383	1.94 Gb	2016	Austrália	Oceania	-35.246401	148.969753
ERR2607392	298.25 Mb	2016	Brasil	América do Sul	-19.8957389	-43.8791361
ERR2607393	2.57 Gb	2016	Brasil	América do Sul	-19.8957389	-43.8791361
ERR2607394	4.33 Gb	2016	Brasil	América do Sul	-1.35673	-48.44536
ERR2607395	1.92 Gb	2016	Brasil	América do Sul	-1.35673	-48.44536
ERR2607396	4.80 Gb	2016	Brasil	América do Sul	-1.35673	-48.44536
ERR2607397	2.75 Gb	2016	Brasil	América do Sul	-19.8957389	-43.8791361
ERR2607416	1.35 Gb	2016	Suíça	Europa	46.9722222	7.4285
ERR2607417	910.65 Mb	2016	Suíça	Europa	46.9722222	7.4285
ERR2607418	618.17 Mb	2016	Suíça	Europa	46.9722222	7.4285
ERR2607419	393.40 Mb	2016	Suíça	Europa	46.9722222	7.4285
ERR2607420	1.61 Gb	2016	Suíça	Europa	46.9722222	7.4285
ERR2607421	1.80 Gb	2016	Suíça	Europa	46.9722222	7.4285
ERR2607422	1.38 Gb	2016	Suíça	Europa	46.9722222	7.4285

ERR2607502	977.58 Mb	2016	Malásia	Ásia	3.1832333	101.71125
ERR2607503	428.50 Mb	2016	Malásia	Ásia	3.1832333	101.71125
ERR2607504	2.46 Gb	2016	Malásia	Ásia	3.1832333	101.71125
ERR2607505	3.59 Gb	2016	Malásia	Ásia	3.1832333	101.71125
ERR2607506	1.71 Gb	2016	Malásia	Ásia	3.1832333	101.71125
ERR2607551	947.69 Mb	2016	EUA	América do Norte	47.6038321	-122.3300624
ERR2607552	414.13 Mb	2016	EUA	América do Norte	47.6038321	-122.3300624
ERR2607553	2.88 Gb	2016	EUA	América do Norte	47.6038321	-122.3300624
ERR2607554	2.81 Gb	2016	EUA	América do Norte	47.6038321	-122.3300624
ERR2607555	1.89 Gb	2016	EUA	América do Norte	41.8755546	-87.6244212
ERR2607556	2.05 Gb	2016	EUA	América do Norte	41.8755546	-87.6244212
ERR2607557	857.21 Mb	2016	EUA	América do Norte	41.8755546	-87.6244212
ERR2607558	919.00 Mb	2016	EUA	América do Norte	41.8755546	-87.6244212
ERR2607559	4.01 Gb	2016	EUA	América do Norte	41.8755546	-87.6244212
ERR2607560	1.87 Gb	2016	EUA	América do Norte	41.8755546	-87.6244212
ERR2607596	522.21 Mb	2016	Zambia	África	-15.39344	28.29661
ERR2607597	2.73 Gb	2016	Zambia	África	-15.39344	28.29661
ERR2607598	1.88 Gb	2016	Zambia	África	-12.812009	28.25529
ERR2607599	4.80 Gb	2016	Zambia	África	-12.812009	28.25529
ERR2607600	856.81 Mb	2016	Zambia	África	-12.812009	28.25529
ERR2607601	2.11 Gb	2016	Zambia	África	-12.812009	28.25529
ERR2607602	5.49 Gb	2016	Zambia	África	-12.812009	28.25529
ERR2607603	8.68 Gb	2016	Zambia	África	-12.812009	28.25529
ERR2607604	2.31 Gb	2016	Zambia	África	-12.812009	28.25529
ERR2607605	3.26 Gb	2016	Zambia	África	-15.39344	28.29661

ANEXO 4 - Resultado MultiQC dos cortes e leituras filtradas realizado pelo FastP para cada biblioteca

Anexo 4. Resultado MultiQC dos cortes e leituras filtradas realizado pelo FastP para cada biblioteca

Category	Passed Filter	Low Quality	Too Many N	Too short
ERR2607374	6694766	2026102	1576	43016
ERR2607375	4710890	1859966	796	694
ERR2607376	20370820	3753774	4726	16262420
ERR2607377	26339090	11385164	3306	513316
ERR2607378	6667054	714630	2604	34276
ERR2607379	62667376	8897762	20020	0
ERR2607380	2516874	607788	182	10554
ERR2607381	23174370	7570038	1488	0
ERR2607382	10686206	1520168	6238	415388
ERR2607383	25833022	3239880	15840	3614408
ERR2607392	3569958	870270	942	58222
ERR2607393	26732628	9460100	4458	179608
ERR2607394	64499088	6569944	24086	0
ERR2607395	24280462	5491950	2082	0
ERR2607396	69522434	7943322	25628	3520518
ERR2607397	39487628	4522096	14182	2296296
ERR2607416	19100682	2464372	6496	534
ERR2607417	13028794	1335154	4940	183762
ERR2607418	7006240	2111718	534	102
ERR2607419	4767734	1115530	388	56520
ERR2607420	11863734	2382212	2608	9133768
ERR2607421	16440300	8469002	1734	146996
ERR2607422	19150288	2647874	6662	1050846
ERR2607502	13817452	1664572	5032	0
ERR2607503	5067662	1352614	448	0
ERR2607504	30356676	5295736	12788	1241452
ERR2607505	18041158	28380520	1342	0
ERR2607506	22901170	3491962	7268	500490
ERR2607551	13514636	1620468	4858	2376
ERR2607552	4977418	1275392	432	748
ERR2607553	29115666	11437950	4426	0
ERR2607554	40854976	5387982	14084	505174
ERR2607555	26417564	3670864	8968	0
ERR2607556	30376306	3277798	11396	0
ERR2607557	9642136	3012548	668	102
ERR2607558	11228222	2689780	900	0
ERR2607559	18465086	4228398	4136	36124430
ERR2607560	17928966	7157614	2492	1374872
ERR2607596	6186264	1548988	1604	117574
ERR2607597	28415298	10035440	4734	151950
ERR2607598	27627416	2962710	10520	468
ERR2607599	66345016	9560676	21890	267698
ERR2607600	10291672	2549562	792	128
ERR2607601	23566368	8148414	1628	488
ERR2607602	60210036	9476096	26080	16325384
ERR2607603	85270910	36180050	10272	647888
ERR2607604	32765150	4007958	11826	1975608
ERR2607605	46542770	5433140	16536	2759914
Total:	1.189.036.432	270.806.048	336.636	99.517.988

ANEXO 5 - Descrição de riqueza dos genes (elementos) compartilhados entre as anotações de cada banco de dados.

Anexo 5. Descrição de riqueza dos genes (elementos) compartilhados entre as anotações de cada banco de dados.

Banco de Dados	total	Elementos (anotação funcional)
ARG-ANNOT, CARD, NCBI, RESFINDER	127	dfrA19, sul1, mef(B), OKP-B-8, dfrA20, lnuD, tet(39), dfrA8, tet(B), tet(32), dfrA1, EreB, EBR-1, tet(40), ErmT, aadA14, CTX-M-15, AAC(3)-Id, CARB-5, AAC(3)-Iid, dfrA12, mphG, catB2, cfxA4, aadA6, QnrS2, ErmA, tet(36), ErmG, tet(X), OXA-5, AER-1, tet(S), KPC-2, GES-16, tet(M), OXA-2, GES-2, CTX-M-3, tet(A), OXA119, GES-20, OXA-198, tetA(P), lsaC, EreA, OXA-392, OXA-46, OXA-58, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, ErmB, OXA-9, ErmF, OXA-209, OXA-347, aadA15, floR, aadA7, ACT-6, dfrB5, aadA2, ANT(6)-Ib, QnrVC4, OXA-4, OXA1, ACI-1, dfrA3, tet(D), OXA-211, dfrA14, arr-3, AAC(6')-Iia, VEB-1, tet(O), GES-1, sul3, OXA-10, dfrA17, catB8, AAC(6')-Ia, tet(Y), mef(C), tet(L), aadA4, sul4, sul2, OXA-20, ROB-1, SHV-187, mphA, dfrA21, dfrA27, CARB-8, TLA-1, aadA16, lnuC, OXA-205, tet(44), OXA-129, CMY-48, cmlB1, tet(G), EreD, CTX-M-14, QnrB19, ANT(2'')-Ia, aadA10, ANT(6)-Ia, cfxA6, OXA-101, dfrG, QnrS1, aadA13, OXA-21, AAC(3)-Ib, catB3, aadA5, tet(W), VEB-3, dfrA5, msrE, BKC-1, tet(Q), tet(C), ErmX, QnrVC1
ARG-ANNOT, CARD, NCBI	14	TEM-150, catA8, ANT(3'')-IIa, vanU, arr-2, dfrF, VEB-9, NPS-1, aadA27, cmlA5, AIM-1, cmlA4, aadS, ANT(3'')-IIc
CARD, NCBI, RESFINDER	25	ACT-4, lsaE, OXA-282, dfrA7, APH(3')-VIII, CARB-16, OXA-464, APH(3')-Via, lnuG, AAC(6')-Il, mphE, dfrA22, aadA11, dfrA23, OXA-280, APH(3')-VI, dfrA15, QnrD1, QnrE1, AAC(6')-Ib', TEM-1, OXA-281, OXA-420, OXA333, dfrA32
ARG-ANNOT, CARD, RESFINDER	16	dfrA25, CARB-10, APH(3'')-Ia, AAC(6')-32, FosA5, OXA-309, catQ, MOX-6, oqxA, catS, OXA-212, AAC(6')-Ir, FosA6, OXA-372, AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, aadA17
ARG-ANNOT, NCBI, RESFINDER	14	nimA, lnuF, MCR-5.1, CMY-27, QnrB1, catA1, msrD-mel, nimE, BRO-1, aadA, lnuB, catA2, mefA-mel, CMY-4
CARD, NCBI	13	Lreu_cat-TC, arr-8, OXA-664, mef(En2), EBR-2, TLA-2, cfxA2, AAC(6')-Ib4, SAT-4, GES-14, VEB-2, APH(3')-IIIa, TEM-135
ARG-ANNOT, CARD	9	EreA2, mef(E), QnrB5, Ecol_ampC1_BLA, FosA2, ampH, CARB-3, SHV-40, aphA15
CARD, RESFINDER	10	OXA-373, OXA-427, MCR-9, AAC(6')-Ib-cr, oqxB ,OXA-275, AAC(3)-Ia, OKP-B-6, mdtA, cfrC
ARG-ANNOT, NCBI	9	catA13 ,cmlA10, VEB-15, APH(3')-Ia, dfr7, cfxA, AAC(6')-Ib, nimD, AAC(3)-I
NCBI, RESFINDER	5	APH(3')-XV, CARB-2, arr-6, FosA, SHV-196
ARG-ANNOT, RESFINDER	5	AAC(3)-IIa ,dfrA29, MIR-1, aadA24, APH(3'')-III
CARD	75	MCR-5, linG, mdtO, abeS, evgS, lmrD, eptA, ICR-Mo, Mel, kdpE, Ecol_ampC_BLA, MexD, mdtE, baeS, Kpne_OmpK37, smeD, QnrB17, Kpne_KpnF, tolC, OXA-33, RSA-1, mdtF, mphB, AAC(6')-Ib7, tet(X3), Ccol_ACT_CHL, Ecol_mdfA, marA, qacH, acrB, Kpne_KpnH, gadW, RCP-1, H-NS, Eclo_acrA, CMY-59, acrD, mdtB pmrF, baeR,Ecol_emrE, mdtM, BRO-2, acrF, Ecol_acrA, MIR-5, msbA, ErmR, acrS, OprN, catII, mdtC, ErmY, cpxA, SAT-1, CRP, mdtG, ErmD, bacA, gadX, aad(6), Kpne_acrA, mdtN, Kpne_KpnG, AAC(6')-Ib10, evgA, yojI, catI, mdtH, ugd, Kpne_KpnE, mdtP, acrE, AAC(6')-Ib9, ramA
NCBI	55	AAC(3)-IIe, ANT(9)-Ia, OXA-732, OXA-643, MIR-9, APH(2'')-If, aacA34, fosA2, oqxA7, catP, CatA16, SAT-2, OKP-B-34, vanXY-c4, MCA, fosA6, RCP, RSD2-2, EC-18, AAC(6')-Ib-D181Y, APH(2'')-Ih, oqxA6, EC, cmlA9, AAC(6')-Ib-AKT, aacA-ACI5, OXA-651, MOX-13, AAC(6')-Ib-G, aacA32, QnrS3, EC-15, OXA-827, lnu(AN2), cfr-Cb, oqxB19, VEB-19, QnrS4, OXA-368, bla-A, RSD2-1, EC-19. oqxA9, OXA-504, aadA22, oqxA8, AAC(6')30, CARB-50, OXA-644, MCR-10.1, aadA12, oqxA10, oqxB16, fosA5,OXA-641
ARG-ANNOT	24	Mef(En2), QnrD, Penicillin_Binding_Protein_Ecoli, dfr22, oqxBgb, aphA6, SAT-2A, TEM-106, dfr23, SAT-4A, MCR-9.1, vanA-G, ACT-3, tet(R), tetR(G), CARB-49, dfrA15b, TEM-105, OKP-B-10, Ecol_ampH, catA9, OXA-228, dfr32, Ecol_ampC2_BLA
RESFINDER	14	GES-5, OXA-490, AAC(6')-Ib-Hangzhou, TEM-52b, cmlA1, TEM-1A, nimH, tet(O/32/O), NPS, OXA-491, ANT(3'')-Ia, cat, cat(pC194), cfxA3

ANEXO 6 - Descrição de riqueza dos genes (elementos) compartilhados entre as anotações de cada país.

Anexo 6. Descrição de riqueza dos genes (elementos) compartilhados entre as anotações de cada país.

Países	total	Elementos (anotação funcional)
Austrália, Brasil, EUA, Malásia, Suíça, Zambia	30	sul1, tet(39), mel, lsaE, mphG, aadA6, tet(X), OXA-2, mef(E), qacH, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, ErmB, ErmF, mphE, OXA-211, aadS, tet(O), OXA10, mef(C), sul2, EreD, ANT(2'')-Ia, ANT(6)-Ia, aadA, lnuB, mefA-mel, aadA5, tet(W), msrE
Austrália, Brasil, EUA, Malásia, Zambia	20	lnuD, tet(32), tet(40), QnrS2, tet(M), tet(A), EreA, gadW, aadA7 ,H-NS, AAC(6')-Ib4, acrS, bla-A, lnuC, QnrB19, CRP, APH(3'')-III, APH(3')-IIIa, tet(Q), tet(C)
Austrália, Brasil, EUA, Suíça, Zambia	4	MCA, aadA27, OXA-1, msrD-mel
Austrália, Brasil, Malásia, Suíça, Zambia	5	ANT(3'')-IIa, marA, ANT(3'')-Ia, OXA-101, AAC(6')-Ib'
Austrália, EUA, Malásia, Suíça, Zambia	1	aadA11
Austrália, Brasil, EUA, Suíça	1	OXA-827
Austrália, Brasil, EUA, Zambia	2	mef(B), QnrB5
Austrália, Brasil, Malásia, Suíça	1	AAC(6')-Ib
Austrália, Brasil, Malásia, Zambia	44	OXA-732, kdpE, Ecol_ampC_BLA, catA16, APH(3'')-Ia, EreA2, cmlA1, AER-1, mdtF, mphB, OXA-119, Ecol_mdfA, catQ, floR, APH(3')-Ia, cmlA5, aadA2, ACI-1, baeR, dfrA14, mdtM, Ecol_acrA, FosA2, GES-1, tet(R), ampH, tetR(G), ErmR, SHV-187, Ecol_ampH, tet(G), cpxA, bacA, gadX, FosA, evgA, catB3, mdtA, Kpne_KpnE, mdtP, AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, AAC(6')-Ib9, Ecol_ampC2_BLA, ramA
Austrália, Brasil, Suíça, Zambia	3	vanA-G, OXA-205, OXA-644
Austrália, EUA, Malásia, Zambia	4	mdtE, tet(S), TEM-105, TEM-1
Austrália, Malásia, Suíça, Zambia	1	Ecol_emrE
Brasil, EUA, Malásia, Zambia	2	dfrF, GES-2
EUA, Malásia, Suíça, Zambia	1	OXA-5
Austrália, Brasil, EUA	2	aphA6, APH(3')-VI
Austrália, Brasil, Malásia	2	aad(6), OXA-281
Austrália, Brasil, Suíça	1	OXA-333
Austrália, Brasil, Zambia	14	GES-5, ICR-Mo, cmlA9, OXA-209, arr-3, EC-15, AAC(6')-IIa, Ecol_ampC1_BLA, GES-14, CARB-8, OXA-212, aadA10, ErmD, aadA13
Austrália, Malásia, Zambia	18	mdtO, eptA, ErmA, Kpne_KpnF, fosA5, tolC, EC-18, aadA24, acrB, Kpne_KpnH, oqxA, msbA, aadA22, FosA6, Kpne_KpnG, yojI, mdtH, acrE
Austrália, Suíça, Zambia	1	OXA-280
Brasil, EUA, Malásia	2	SAT-4A, SAT-4
Brasil, EUA, Zambia	2	cfxA2, mphA
Brasil, Malásia, Zambia	6	baeS, APH(2'')-Ih, VEB-9, OXA-392, OXA-347, cfxA6
Brasil, Suíça, Zambia	2	OXA-464, OXA-129
Austrália, Brasil	2	linG, lnuF
Austrália, EUA	2	CARB-16, CARB-49
Austrália, Malásia	5	QnrD, OXA-651, AAC(6')-Ib-G, QnrD1, MCR-10.1
Austrália, Zambia	12	Penicillin_Binding_Protein_Ecoli, NPS-1, Eclo_acrA, mdtB, pmrF, NPS, catB8, aadA4, AAC(6')-Ib-cr, aadA16, mdtG, oqxA10
Brasil, EUA	3	mef(En2), lnu(AN2), TLA-1
Brasil, Suíça	2	catA13, Ccol_ACT_CHL
Brasil, Zambia	18	OXA-490, SAT-2, tet(36), SAT-2A, RSD2-2, arr-2, CARB-2, OXA-491, catA1, dfrA15b, cfxA, tet(44), dfrA15, cmlB1, CARB-3, SAT-1, catI, cfxA3
EUA, Malásia	1	ErmG
EUA, Suíça	3	CARB-5, aadA15, cfrC
EUA, Zambia	1	OXA-58
Malásia, Zambia	11	evgS, oqxA6, AIM-1, QnrVC4, acrD, VEB-1, tet(L), Kpne_acrA, mdtN, QnrS1, ErmX

Suíça, Zambia	5	QnrB17, GES-20, QnrB1, OXA-4, cat
Austrália	31	OXA-373, ACT-4, abeS, lmrD, TEM-52b, CARB-10, EBR-1, AAC(3)-Id, smeD, TEM-106, CTX-M-3, AAC(6')-Ib-AKT, EBR-2, ACT-3, ACT-6, tet(O/32/O), OXA-368, OXA-275, oqxA9, ANT(3'')-IIc, CMY-48, CARB-50, CTX-M-14, QnrE1, OXA-228, AAC(3)-Ia, AAC(3)-I, AAC(6')-Ib10, AAC(3)-Ib, BKC-1, TEM-135
Brasil	30	TEM-150, OXA-664, aadA14, AAC(6')-32, APH(3')-XV, TEM-1A, APH(3')VIII, KPC-2, GES-16, tet(X3), cmlA10, OXA-198, lsaC, OXA-9, aacA-ACI5, TLA-2, APH(3')-VIa, AAC(6')-Il, aacA32, cmlA4, sul3, AAC(6')-Ia, tet(Y), OXA-20, ROB-1, dfrA21, AAC(6')-30, AAC(6')-Ir, aphA15, VEB-3
EUA	13	dfrA20, vanXY-c4, cfxA4, OXA-282, lnuG, ANT(6)-Ib, QnrS3, BRO-2, QnrS4, BRO-1, aadA12, OXA-420, aadA17
Malásia	18	ANT(9)-Ia, OKP-B-8, MIR-9, APH(2'')-If, aacA34, AAC(6')-Ib-Hangzhou, MIR-1, oqxA7, OKP-B-34, Kpne_OmpK37, MCR-9, MCR-9.1, MIR-5, OprN, EC-19, OKP-B-10, oqxA8, OKP-B-6
Suíça	2	OXA-33, cfr-Cb
Zambia	83	MCR-5, dfrA19, catA8, AAC(3)-IIe, Lreu_cat-TC, dfr22, AAC(3)-IIa, OXA643, oqxBgb, arr-8, dfrA8, tet(B), dfrA25, dfrA29, vanU, dfrA1, EreB, OXA427, nimA, ErmT, CTX-M-15, catP, AAC(3)-IId, dfrA12, MexD, catB2, RCP, dfrA7, RSA-1, OXA-309, MCR-5.1, AAC(6')-Ib-D181Y, AAC(6')-Ib7, dfr23, CMY-27, tetA(P), EC, OXA-46, VEB-15, MOX-6, catS, RCP-1, nimH, MOX13, dfrB5, CMY-59, dfr7, dfrA3, tet(D), dfrA22, acrF, arr-6, dfrA17, dfrA23, oqxB19, VEB-19, sul4, dfrA27, RSD2-1, oqxB, nimE, OXA-504, catII, catA9, mdtC, ErmY, VEB-2, OXA-372, dfrG, catA2, oqxB16, nimD, OXA-641, OXA21, cat(pC194), dfr32, SHV-40, SHV-196, ugd, dfrA5, dfrA32, QnrVC1, CMY-4