

Juliana Maria Ramos Casanova Canedo

**O perfil global da resistência aos antibióticos em águas residuais: Uma revisão  
sistemática**

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2024



Juliana Maria Ramos Casanova Canedo

**O perfil global da resistência aos antibióticos em águas residuais: Uma revisão  
sistemática**

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2024

Juliana Maria Ramos Casanova Canedo

**O perfil global da resistência aos antibióticos em água residuais: Uma revisão  
sistemática**

Atesto a originalidade do trabalho

---

(Juliana Maria Ramos Casanova Canedo)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando  
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professor Doutor Ricardo Magalhães.

Porto, 2024

## **Resumo**

Os antibióticos são utilizados, na atualidade, para diversos fins, tais como a nível da saúde humana, como na veterinária ou para fins agrícolas. Esta intensa utilização promove a sua libertação para o meio ambiente, favorecendo a seleção de resistências. Esta resistência aos antibióticos emergiu como um problema de magnitude global, impulsionado pelo aumento das taxas de infeções bacterianas e respetivos tratamentos, numa escala mundial. A identificação de bactérias que possuem uma quantidade significativa de genes de resistência a antibióticos em águas residuais é um fator de risco amplamente reconhecido, associado ao agravamento da resistência aos antibióticos num nível global.

A presença dessas bactérias está ligada à seleção favorecida pelo uso intensivo de antibióticos e à criação de ambientes propícios para o surgimento de novos mecanismos de resistência devido à presença de resíduos de antibióticos nas águas residuais, nomeadamente nos mecanismos usados nos seus tratamentos. Este estudo tem como objetivo reunir, de maneira sistemática, as informações mais atualizadas relacionadas a essa problemática.

Palavras-chave: Resistências aos antibióticos; Tratamento de águas residuais; Transferência de genes.

## **Abstract**

Antibiotics are currently used for various purposes, including human healthcare, veterinary medicine, and agricultural applications. This extensive use leads to their release into the environment, promoting the emergence of antibiotic resistance. Antibiotic resistance has emerged as a global issue, driven by the rising rates of bacterial infections and their treatments on a worldwide scale. The identification of bacteria with a significant number of antibiotic resistance genes in wastewater is a widely recognized risk factor associated with the exacerbation of antibiotic resistance at a global level.

The presence of these bacteria is linked to the selective pressure exerted by intensive antibiotic use and the creation of environments conducive to the development of new resistance mechanisms due to the presence of antibiotic residues in wastewater, particularly within the treatment processes. This study aims to systematically gather the most up-to-date information related to this issue.

**Keywords:** Antibiotic resistance; Waste water treatment; Gene transfer.

*À minha família por todo o apoio incondicional.*

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, irmão e restante família por todo o apoio incondicional que me deram ao longo destes anos, por todas as palavras de força e incentivo constante, por todo o carinho e dedicação que tiveram por mim e por nunca me deixarem desistir. Sou-vos eternamente grata.

Agradeço também aos meus colegas e amigos, em especial à Ju, que me acompanhou e apoiou ao longo deste percurso de uma forma tão presente, proporcionando momentos de partilha e motivação.

Ao meu orientador, Professor Doutor Ricardo Magalhães pela constante disponibilidade que teve comigo para esclarecer dúvidas, pelas valiosas sugestões e pelas críticas que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À instituição Universidade Fernando Pessoa e a todos os docentes que me acompanharam e ensinaram ao longo destes anos e que fizeram crescer esta minha paixão pelo curso de Ciências Farmacêuticas.

A todos, o meu sincero agradecimento.

## Índice geral

Resumo .....	v
Abstract.....	vi
Agradecimentos .....	viii
Índice de figuras .....	xi
Índice de tabelas .....	xii
Lista de abreviaturas .....	xiii
I. Introdução.....	1
1.1. Motivação do trabalho .....	1
1.2. Antibióticos.....	1
1.3. Águas residuais hospitalares vs. Águas residuais comunitárias .....	3
1.4. Estações de tratamento das águas residuais .....	4
1.4.1. Tipos de tratamentos nas ETARs .....	5
1.4.1.1 Processo biológico – lamas ativadas.....	5
1.4.1.2. Tratamento biológico – Anaeróbio/anóxico .....	6
1.4.1.3 Tratamentos físico-químicos.....	6
1.5. Resistências aos antibióticos nas águas residuais .....	7
1.5.1. Genes de resistência a antibióticos.....	7
1.5.2. Transferência horizontal de genes.....	8
1.5.1.1. Conjugação .....	10
1.5.1.2. Transdução.....	10
1.5.1.3. Transformação natural .....	10
1.6. Objetivos.....	11
II. Metodologia .....	12
2.1. Estratégia de pesquisa .....	12
2.2 Qualidade dos artigos escolhidos.....	15
III. Resultados.....	28

3.1. Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de polimerase) .....	28
3.2. Teste de suscetibilidade antimicrobiana.....	29
3.2.1. Método de Kirby-Bauer .....	29
3.2.2. Método da microdiluição em placa .....	30
3.3. Antibióticos estudados .....	30
3.4. Genes de resistência.....	31
3.5. Tratamentos utilizados nas ETARs .....	33
IV. Conclusão.....	41
V. Bibliografia .....	43

## **Índice de figuras**

Figura 1 – Transferência horizontal de genes em bactérias (Adaptado de: (Karkman et al., 2018)).....	9
Figura 2: Fluxograma da pesquisa da revisão sistemática da literatura (Fonte: Page MJ, et al. BMJ 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71.).....	14
Figura 3: Risk Of Bias In Non-Randomized Studies of Interventions .....	27

## Índice de tabelas

Tabela 1: ROBINS-I, Wang et al. (2015).....	17
Tabela 2: ROBINS-I, Zhang et al. (2015) .....	18
Tabela 3: ROBINS-I, Amador et al. (2015).....	19
Tabela 4: ROBINS-I, Varela et al. (2016).....	20
Tabela 5: ROBINS-I, Buelow et al. (2018) .....	21
Tabela 6: ROBINS-I, Fernandes et al. (2019) .....	22
Tabela 7: ROBINS-I, Pärnänen et al. (2019).....	23
Tabela 8: ROBINS-I, Silva et al. (2022) .....	24
Tabela 9: ROBINS-I, Hutinel et al. (2022).....	25
Tabela 10: ROBINS-I, Kang et al. (2021).....	26
Tabela 11 – Artigos selecionados para a RS: país, objetivo e conclusão do estudo. ....	35
Tabela 12 – Artigos selecionados para a RS: amostra, identificação e unidades em que foram avaliadas as ARB e os ARG.....	38

### **Lista de abreviaturas**

AB – Antibiótico

ARB/BRA – Bactérias resistentes a antibióticos

ARGs – Antibiotic resistance genes (Genes de resistência a antibióticos)

DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

EGM – Elementos genéticos móveis

ESBLs –  $\beta$ -lactamases de espectro estendido

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

ETARFs – Estações de tratamento de águas residuais farmacêuticas

HAC – High antibiotic consumption (Elevado consumo de antibióticos)

ICEs – Integrative and conjugative elements (Elementos integrativos e conjugativos)

LAC – Low antibiotic consumption (Baixo consumo de antibióticos)

MAR – Multiple antibiotic resistance (Múltipla resistência a antibióticos)

MRB – Multidrug resistente bacteria (Bactérias multirresistentes)

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina

PCR – Polymerase chain reaction (Reação em cadeia de polimerase)

PMQR – Genes encoding plasmid mediated quinolone resistance (Genes que codificam resistência às quinolonas mediada por plasmídeos)

qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa quantitativo

## **I. Introdução**

### 1.1. Motivação do trabalho

Os genes de resistência a antibióticos são considerados contaminantes ambientais emergentes, que podem surgir em vários ambientes, tais como, águas subterrâneas, águas superficiais, no solo e em sedimentos, sendo, por isso, alvo de muitos estudos (Wang et al., 2015). Esses genes de resistência são considerados, na atualidade, uma preocupação na área da medicina, quer pela sua existência, quer pela capacidade de transferência entre microrganismos, podendo gerar problemas graves de saúde pública, pelo facto de interferir com o tratamento eficaz de infeções bacterianas, contribuindo para um aumento da mortalidade (Pazda *et al.*, 2019). A escassez de regulamentos, bem como de regimes de monitorização rigorosos contribuem para a permanência destas resistências aos antibióticos no meio ambiente (Uluseker *et al.*, 2021).

O aparecimento de resistência aos antibióticos nas bactérias está fortemente relacionado a atividades antropogénicas, tais como, o uso excessivo de antibióticos pela população, quer para fins de saúde humana, animal ou na pecuária, o descarte inadequado de medicamentos por parte da comunidade, o uso de lamas proveniente das ETARs como fertilizante para a agricultura, entre outros fatores (Uluseker *et al.*, 2021).

Este trabalho foi motivado pela crescente utilização de antibióticos na comunidade, que contribui para o aparecimento de resíduos de antibióticos em ambientes aquáticos, como as águas residuais, que favorecem a proliferação de bactérias que aportam genes de resistência a antibióticos. As estações de tratamento dessas águas apresentam, por isso, um papel crucial na diminuição da proliferação desses genes de resistência, impedindo que estes se disseminem e atinjam o meio ambiente.

### 1.2. Antibióticos

Os antibióticos são uma classe de fármacos antimicrobianos que inibem funções essenciais para a sobrevivência de bactérias. Este grupo de fármacos é amplamente utilizado para tratar e prevenir doenças infecciosas de origem bacteriana em humanos e outros animais. Atualmente estima-se que a maioria das infecções provocadas por bactérias resistentes a antibióticos (ARB) ocorre em hospitais, aumentando os riscos associados aos tratamentos médicos e prejudicando a visão dos hospitais como locais seguros de tratamento de doenças (Lerminiaux et al., 2019).

A pressão seletiva desta classe de fármacos inibe bactérias suscetíveis a antibióticos, promovendo um aumento da quantidade de bactérias resistentes a antibióticos, assim como a seleção de mutações e a transferência horizontal de genes entre bactérias (Zhang et al., 2015). A enorme quantidade de antibióticos utilizada na atualidade promove o aparecimento de resíduos de antibióticos que atingem as águas residuais, promovendo essa pressão seletiva, o que favorece a seleção de genes de resistência em microrganismos como as bactérias, podendo ser transferidos inter ou intraespécies bacterianas. Este ciclo só é mantido se os resíduos de antibióticos continuarem a atingir esses ambientes aquáticos, pois só assim é mantida essa pressão seletiva (Machowska *et al.*, 2018).

Estes medicamentos, quando consumidos pelo ser humano são metabolizados no organismo e excretados através da urinas e fezes e, posteriormente, atingem o ambiente através da descarga de fluxos de águas residuais (Rout et al., 2021). A elevada quantidade de antibióticos que atinge as águas residuais, favorece a seleção de ARBs e genes de resistência a antibióticos (ARGs) que chegam aos ambientes naturais. O aumento da resistência aos antibióticos por parte dos agentes patogênicos microbianos emergentes consiste num problema de saúde pública global (Barancheshme *et al.*, 2017).

O crescimento da resistência aos antibióticos consiste uma ameaça à eficácia destes medicamentos na atualidade e no futuro, sendo crucial a utilização racional destes medicamentos por parte da população.

A manutenção e propagação de resistências aos antibióticos durante o tratamento das águas residuais pode ser devida a dois principais fatores: (1) transferência horizontal de genes que apresentam resistência a esta classe de fármacos, entre bactérias; (2) sobrevivência ou seleção de bactérias com resistência aos antibióticos, que conseqüentemente provoca um aumento da quantidade de genes de resistência nos efluentes (Fernandes *et al.*, 2019).

### 1.3. Águas residuais hospitalares vs. Águas residuais comunitárias

As águas residuais hospitalares e as águas residuais comunitárias (municipais) apresentam diferenças relativas à presença de genes de resistência aos antibióticos presentes em bactérias.

O microbioma das águas residuais contém uma grande variedade de bactérias que aportam genes que as tornam resistentes a antibióticos. Estas bactérias adquirem esses genes de resistência devido à pressão seletiva que é mantida nas águas residuais, pela quantidade de resíduos de antibióticos aí presentes, com maior relevância em águas residuais de origem hospitalar (Lepper *et al.*, 2023). É por isso, de extrema importância, analisar e comparar as águas residuais de origem hospitalar e de origem comunitária, para que mais facilmente se consiga entender essas diferenças.

As águas residuais de origem hospitalar tendem a ter uma maior quantidade de bactérias e genes de resistência a antibióticos, comparativamente com as águas residuais de origem comunitária, devido ao facto de mais regularmente nos hospitais serem prescritos e administrados antibióticos mais fortes para tratar doenças específicas de origem bacteriana, promovendo a seleção de bactérias mais resistentes (Gašpar *et al.*, 2021).

O facto de as águas residuais hospitalares terem um aporte superior de bactérias e genes de resistência a antibióticos, comparativamente com as águas residuais municipais, isto pode ser importante para mais facilmente se conseguir contrariar este fator. Ou seja, no caso de serem detetados genes de resistência específicos de determinados antibióticos nas águas residuais, pode-se mitigar este fator por exemplo prescrevendo outros antibióticos durante alguns anos a nível clínico. Assim, estas resistências podem ser extintas sendo depois possível retomar a prescrição desses fármacos, pois só aparecem bactérias e genes de resistência a antibióticos nas águas residuais se forem prescritos antibióticos que possam gerar essas resistências, mantendo a pressão seletiva desta classe de fármacos sobre as bactérias. Ao não serem prescritos esses antibióticos, as bactérias acabam por sofrer pressões seletivas nesses ambientes que limitam a presença dos seus genes de resistência.

#### 1.4. Estações de tratamento das águas residuais

De entre todos os ambientes aquáticos poluídos devido a atividades antropogénicas, as estações de tratamento de águas residuais (ETARs) são consideradas o principal reservatório de microrganismos resistentes (Marutescu et al., 2023).

As estações de tratamento das águas residuais são consideradas tecnologias padrão para a remoção/eliminação de uma enorme variedade de agentes poluentes, onde se incluem partículas em suspensão e coloidais, substâncias orgânicas dissolvidas, nutrientes e agentes patogénicos que habitam nas águas residuais, como são o caso das bactérias, genes de resistência e antibióticos (Rout et al., 2021). Um tratamento adequado das águas residuais é de extrema importância antes destas águas serem lançadas nos rios, lagos ou sistemas de esgotos, de maneira a evitar a propagação de ARB e ARGs no ambiente (Barancheshme et al., 2017).

A eficácia dos processos de tratamento das águas residuais para a remoção de ARB e ARGs são um tema de estudo importante e de extrema relevância, com o objetivo de determinar qual ou quais os tratamentos mais eficazes para esse efeito. Este conhecimento vai permitir, com maior facilidade, o desenvolvimento de padrões de qualidade nas ETARs (Marutescu et al., 2023).

As lamas ativadas presentes nas ETARs são ricas em nutrientes e apresentam uma quantidade elevada de bactérias, que têm um importante papel no controlo da poluição da água. O facto de existir esta elevada carga de matéria orgânica e uma alta densidade bacteriana nas ETARs, fica favorecido um ambiente que promove o contacto célula-célula e a troca de genes, tornando-se, as ETARs, locais de reservatório de bactérias com genes de resistência a antibióticos (Wang *et al.*, 2015).

#### 1.4.1. Tipos de tratamentos nas ETARs

As ETARs podem apresentar quatro fases de tratamento das águas residuais: 1) tratamento preliminar, onde as águas residuais que atingem a ETAR são filtradas e são, desta forma separados os resíduos de maiores dimensões (tratamento físico-químico); 2) tratamento primário, onde, por decantação primária, as partículas sólidas em suspensão são eliminadas pela ação da gravidade; 3) tratamento secundário, biológico (aeróbio ou anaeróbio), através da ação de bactérias, que digerem a matéria orgânica presente na água, que, de seguida, sofre decantação secundária, processo físico-químico, promovendo o depósito das lamas que resultaram da ação dessas bactérias; e o 4) tratamento terciário, onde são removidos todos os nutrientes em excesso, tornando as águas mais puras. Por fim, a água retoma à natureza através das regas, na agricultura, entre outros (SIMDOURO, 2017).

##### 1.4.1.1 Processo biológico – lamas ativadas

O processo de lamas ativadas, é um mecanismo de tratamento biológico, disponível na fase de tratamento secundário das águas residuais, mais utilizado na atualidade. Este processo tem como objetivo principal eliminar a matéria orgânica que permaneceu dissolvida após o tratamento primário, utilizando bactérias que se alimentam de matéria orgânica e a transformam em dióxido de carbono, água e energia (Atlas\_Copco, 2024).

Este processo de tratamento das AR apresenta como vantagens a sua simplicidade de mecanismos, visto que apenas é constituído por duas fases de tratamento: o arejamento e a decantação, o que lhes permite também ocupar pouco espaço, uma vez que os equipamentos são compactos. Trata-se também de um processo mais ecológico, uma vez que não apresenta problemas convencionais como por exemplo o caso dos odores, entre outros (Air\_Liquide, 2024). Porém, este tratamento apresenta desvantagens, tais como necessitar de manutenção contínua e o facto de os equipamentos consumirem elevada quantidade de energia (Wang et al., 2018).

#### 1.4.1.2. Tratamento biológico – Anaeróbio/anóxico

Os processos de tratamento anaeróbio ocorrem na ausência de oxigénio, através de microrganismos que sobrevivem neste ambiente e que convertem os contaminantes orgânicos presentes nas águas residuais em gás metano e dióxido de carbono (VEOLIA, 2024).

A quantidade de ARGs nas águas residuais quando o tratamento da ETAR é realizado na ausência de oxigénio é significativamente menor do que quando o tratamento é realizado na presença de oxigénio. Assim, pode-se afirmar que os tratamentos anaeróbio e anóxico são mais eficazes na remoção de ARGs do que o tratamento aeróbio, uma vez que os microrganismos têm maior dificuldade em sobreviver em condições anaeróbias, inibindo a propagação de genes de resistência (Du et al., 2015).

#### 1.4.1.3 Tratamentos físico-químicos

Os tratamentos físico-químicos são todos aqueles que envolvem reações químicas para remoção física de metais pesados, partículas sólidas, nutrientes e compostos químicos que são de difícil decomposição biologicamente, ou seja, que não são biodegradáveis. Nestes processos incluem-se a filtração, desinfecção UV, ozonização, entre outros (Patel *et al.*, 2021). Estes tipos de tratamentos tendem a ser mais eficazes na remoção de genes de resistência a antibióticos porque inativam bactérias, degradando o seu material genético, impedindo desta forma a disseminação de ARGs no meio ambiente.

A combinação de tratamentos biológicos com tratamentos físico-químicos nas ETARs pode tornar-se uma vantagem na diminuição de genes de resistência pois, como o tratamento biológico não é tão eficaz na remoção desses genes, podendo favorecer a transferência horizontal destes entre bactérias, essa combinação de tratamentos é recomendada para que se verifique uma remoção mais eficaz dos genes de resistência a antibióticos nas águas residuais.

### 1.5. Resistências aos antibióticos nas águas residuais

As estações de tratamento de águas residuais recolhem águas residuais municipais, águas residuais provenientes de indústrias, explorações agrícolas e de hospitais. Desta forma, recebem constantemente uma grande variedade de contaminantes, servindo de reservatório ambiental para bactérias resistentes aos antibióticos, favorecendo a transferência horizontal de genes entre elas e, por conseguinte verifica-se um aumento da propagação de ARGs entre diferentes espécies bacterianas (Karkman *et al.*, 2018).

A elevada carga de matéria orgânica e a densidade bacteriana nas ETARs criam um ambiente favorável para o contacto entre células, permitindo assim a transferência de genes de resistência entre elas, tornando-as resistentes aos processos de tratamento das águas residuais (Wang *et al.*, 2015).

As concentrações sub-inibitórias de antibióticos presentes nas águas residuais induzem uma pressão seletiva sobre as bactérias, considerando-se um dos fatores de resistência que favorece a transferência horizontal de genes intraespécies e interespécies (Silva *et al.*, 2022). Assim, os agentes patogénicos tornam-se resistentes a esta classe de fármacos, não só pela pressão seletiva mas também pela aquisição de genes de resistência, transportados por elementos genéticos móveis, ou através de mutações cromossómicas (Hutinel *et al.*, 2022).

#### 1.5.1. Genes de resistência a antibióticos

As águas residuais, assim como as estações de tratamento de águas residuais podem servir de reservatório ambiental de resistência a antibióticos, sendo considerados locais chave para a transferência horizontal de genes, contribuindo para a disseminação de genes de resistência a antibióticos entre microrganismos, nomeadamente bactérias (Karkman *et al.*, 2018). É importante compreender quais os principais grupos bacterianos que são veículos de ARGs para mais facilmente identificar quais os indicadores bacterianos de ARGs que apresentam a capacidade de sobreviver ao tratamento, a fim de maximizar a redução ou eliminar estes grupos (Fernandes *et al.*, 2019).

São vários os fatores que estão relacionados com a persistência e disseminação de genes de resistência nas águas residuais. Entre eles enquadra-se o uso excessivo de antibióticos na população, quer para fins humanos, quer veterinários, a temperatura ambiente, que quanto mais quente e seca, mais favorável para a proliferação de agentes patogénicos e o tamanho da ETAR, que quanto menor for, mais pronunciados são os picos de ARGs (Pärnänen *et al.*, 2019).

#### 1.5.2. Transferência horizontal de genes

A disseminação da resistência bacteriana, por meio de mecanismos como a transferência horizontal de genes, tem sido alvo de estudo na atualidade pois trata-se de uma das principais causas de resistência a antibióticos (Wang, 2023). A transferência horizontal de genes permite que bactérias sensíveis a determinado antibiótico adquiram novo material genético, proveniente de outras bactérias (resistentes ao antibiótico), tornando-se resistentes. Essa transferência pode ser por três mecanismos: conjugação, transdução e transformação natural, através de plasmídeos, bacteriófagos e DNA extracelular, respetivamente (Lerminiaux *et al.*, 2019).

Assim, os plasmídeos, bacteriófagos e o DNA extracelular são considerados os três principais condutores da transferência horizontal de genes através dos processos de conjugação, transdução e transformação natural entre as bactérias. Esta transferência genética por estes três mecanismos é favorecida entre organismos filogeneticamente semelhantes, porém pode ocorrer entre organismos filogeneticamente distantes (Lerminiaux *et al.*, 2019).

É no citoplasma das bactérias que se encontra localizado o seu genoma, isolado do exterior por uma ou mais membranas, dependendo do tipo de bactéria, limitando a passagem do DNA, sendo necessários mecanismos específicos de transferência desse DNA de uma bactéria para o genoma de outra (Daubin et al., 2016).

Para evitar a propagação de ARGs entre as bactérias ambientais, é essencial que se compreendam esses mecanismos que impulsionam a sua transmissão, tal como esquematizado na Figura 1.

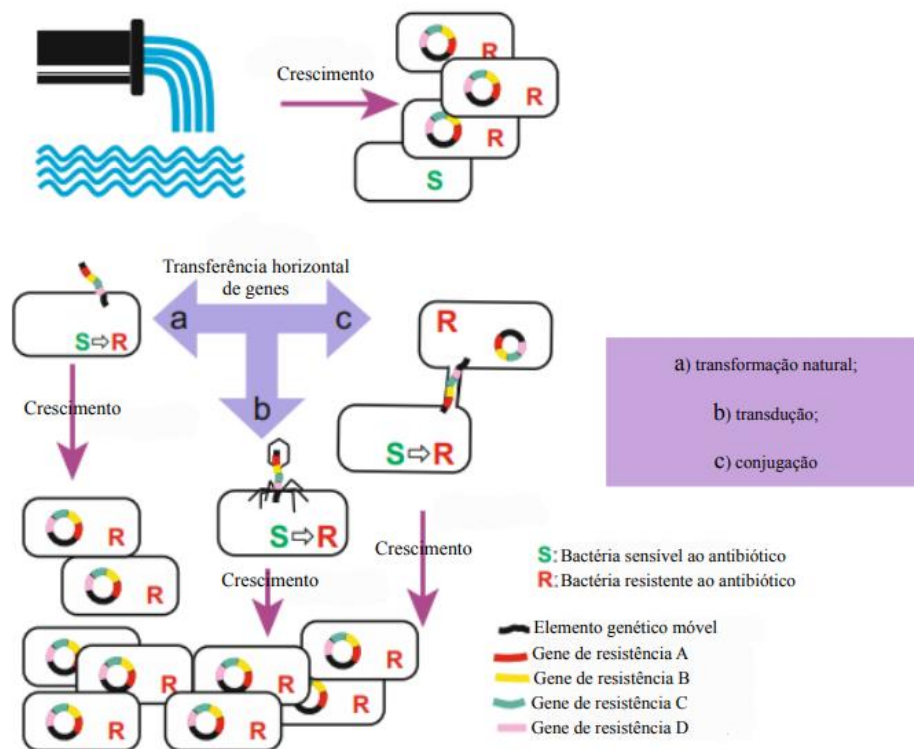


Figura 1 – Transferência horizontal de genes em bactérias (Adaptado de: (Karkman et al., 2018))

#### 1.5.1.1. Conjugação

A conjugação bacteriana foi descoberta pela primeira vez em 1946, em *E.coli*, através do contacto físico entre duas células, onde o material genético é transferido de uma célula (doadora) para outra (recetora). Um conjunto de elementos genéticos móveis, denominados de elementos integrativos e conjugativos (ICEs), foi descoberto em genomas bacterianos, que têm a capacidade de se transferir de uma bactéria para outra, promovendo, desta forma, a disseminação de ARGs no ambiente (Sun, 2018).

A conjugação é então considerada um mecanismo unidirecional de transmissão de DNA de uma célula para outra, através, por exemplo, de um plasmídeo (Daubin et al., 2016). Os plasmídeos disseminam-se pelas populações bacterianas principalmente através do mecanismo de conjugação. Estes elementos genéticos têm a capacidade de se replicarem independentemente do DNA cromossómico e persistem por mais tempo quando transportam genes úteis para a célula hospedeira, como é o caso dos ARGs na presença de antibióticos (Lerminiaux et al., 2019).

#### 1.5.1.2. Transdução

A transdução, apresenta um papel importante na transferência de ARGs e de fatores de virulência, pois trata-se da transferência de DNA de uma bactéria para outra, por meio de um bacteriófago, ou seja, de um vírus que infeta bactérias (Jiang *et al.*, 2018). A transdução pode ser generalizada, ocorrendo a transmissão de qualquer gene, ou restrita, limitando-se à transmissão de alguns genes específicos. A transferência de ARGs através da transdução generalizada é elevada, comparativamente com a transferência de ARGs através da transdução restrita (Fillol-Salom *et al.*, 2019).

Os bacteriófagos, ou fagos, adquirem esses genes de resistência a antibióticos por meio de cromossomas e plasmídeos de bactérias, devido à excisão ou encapsidação imprecisa do genoma do fago (Pires *et al.*, 2023). Algumas espécies de bactérias utilizam este mecanismo como vantagem e adquirem bacteriófagos com o objetivo de facilitar a troca genética (Daubin *et al.*, 2016).

#### 1.5.1.3. Transformação natural

A transformação natural, apesar de não ser tão importante na transferência de ARGs, devido ao facto de não se basear na transmissão de elementos genéticos móveis, trata-se do processo pelo qual um microrganismo capta DNA livre presente no meio, verificando-se a absorção, incorporação e expressão funcional desse DNA extracelular (Winter *et al.*, 2021).

Apesar de ser possível o mecanismo de transformação natural durante o processo de infeção, as evidências são mínimas no que toca ao facto de que essa transformação natural contribui para a transmissão de ARGs entre bactérias em ambientes clínicos, tais como hospitais. No entanto, esta falta de evidência pode dever-se ao facto de ser difícil de se detetar a captação e recombinação do DNA que se encontra livre no meio, denominado de DNA exógeno (Lerminiaux *et al.*, 2019).

#### 1.6. Objetivos

Esta revisão sistemática da literatura permite abordar o tema da resistência a antibióticos nas águas residuais. Pretende também avaliar e comparar criteriosamente dez estudos relacionados com a pesquisa de genes de resistência em águas residuais, tais como águas provenientes de hospitais ou da comunidade (águas urbanas), entre outras.

Os objetivos desta revisão sistemática são (1) identificar quais os genes de resistência a antibióticos mais prevalentes nas águas residuais; (2) quais os tratamentos utilizados nas ETARs para minimizar/neutralizar as bactérias que aportam genes de resistência; (3) qual o tratamento mais eficaz utilizado nas ETARs para essa remoção de resistências e (4) quais os métodos mais frequentemente utilizados na deteção de genes de resistência.

## II. Metodologia

Foi realizada uma revisão sistemática, estruturada segundo a *checklist* do PRISMA (PRISMA, 2020), que teve por base a seleção de diversos artigos relacionados com o tema, de acordo com o fluxograma do PRISMA. A qualidade desses artigos foi avaliada e esquematizada.

Esta revisão sistemática permite responder às seguintes questões de investigação: quais os genes de resistência mais prevalentes nas águas residuais?; qual o tratamento utilizado nas ETARs mais eficaz na remoção desses genes de resistência?; E qual a técnica mais eficaz na deteção desses genes de resistência?. Para formular estas questões recorreu-se à estratégia PICO, onde a população, “P”, em estudo corresponde às bactérias que aportam genes de resistência a antibióticos, a intervenção, “I”, corresponde aos genes de resistência que foram estudados, a comparação, “C”, corresponde às várias ETARs e ao estudo das diferentes águas residuais (hospitalares ou comunitárias) e o *Outcome*, “O”, ou seja o desfecho, corresponde aos resultados obtidos.

### 2.1. Estratégia de pesquisa

Para a presente revisão sistemática da literatura, a pesquisa foi realizada entre outubro de 2023 e fevereiro de 2024, nas seguintes bases de dados: PubMed, Science Direct e B-on, utilizando os termos de pesquisa: “antibiotic resistance”, “wastewater” e “gene transfer”, associados com o operador booleano “AND”, de acordo com a seguinte equação de pesquisa: (“antibiotic resistance” AND “wastewater” AND “gene transfer”).

Apenas foram escolhidos artigos que fossem relevantes para o tema em questão e que estudassem genes de resistência nas águas residuais. Foram excluídos todos os artigos aos quais não existe acesso à sua versão integral, artigos que não abordam o tema em questão e artigos de revisão. De entre os critérios de inclusão, selecionaram-se apenas artigos em inglês, publicados entre novembro de 2013 e janeiro de 2024, que relatam resistência bacteriana em águas residuais. Foi ainda pesquisada informação adicional em sites usando o motor de busca Google.

Encontra-se esquematizado abaixo, na Figura 2, o fluxograma da pesquisa nas bases de dados, com o número de artigos encontrados e o número de artigos escolhidos para o estudo desta revisão sistemática.

A equação booleana foi construída com o objetivo de permitir uma pesquisa eficaz e abrangente e garantir a precisão exigida neste tipo de estudo. Desta pesquisa resultaram 10 artigos, sem duplicação, sendo, pela leitura do título excluídos 56 artigos pois não se encontravam de acordo com os critérios previamente definidos, devido ao facto de alguns estudos não terem sido realizados em águas residuais. Dos 31 artigos selecionados, após a leitura do resumo, foram excluídos 7 artigos porque não estudavam genes de resistência nas águas residuais. Dos 24 artigos selecionados para a leitura integral, 14 foram excluídos, uma vez que, não abordavam de forma clara as técnicas de detecção de genes de resistência ou o tipo de tratamento utilizado para as águas residuais. No total foram selecionados dez artigos que se enquadravam nos critérios descritos acima.

Realizou-se a extração de dados dos dez artigos selecionados para a revisão, considerando os autores, os países em que foram realizados os estudos, o objetivo de cada estudo em causa, a conclusão a que chegaram, o tipo de amostras colhidas, o tipo de identificação das amostras e as unidades em que foram detetados os genes de resistência. Estas informações foram descritas e organizadas nas tabelas 1 e 2 abaixo, para mais facilmente visualizar e comparar os estudos dos vários artigos.

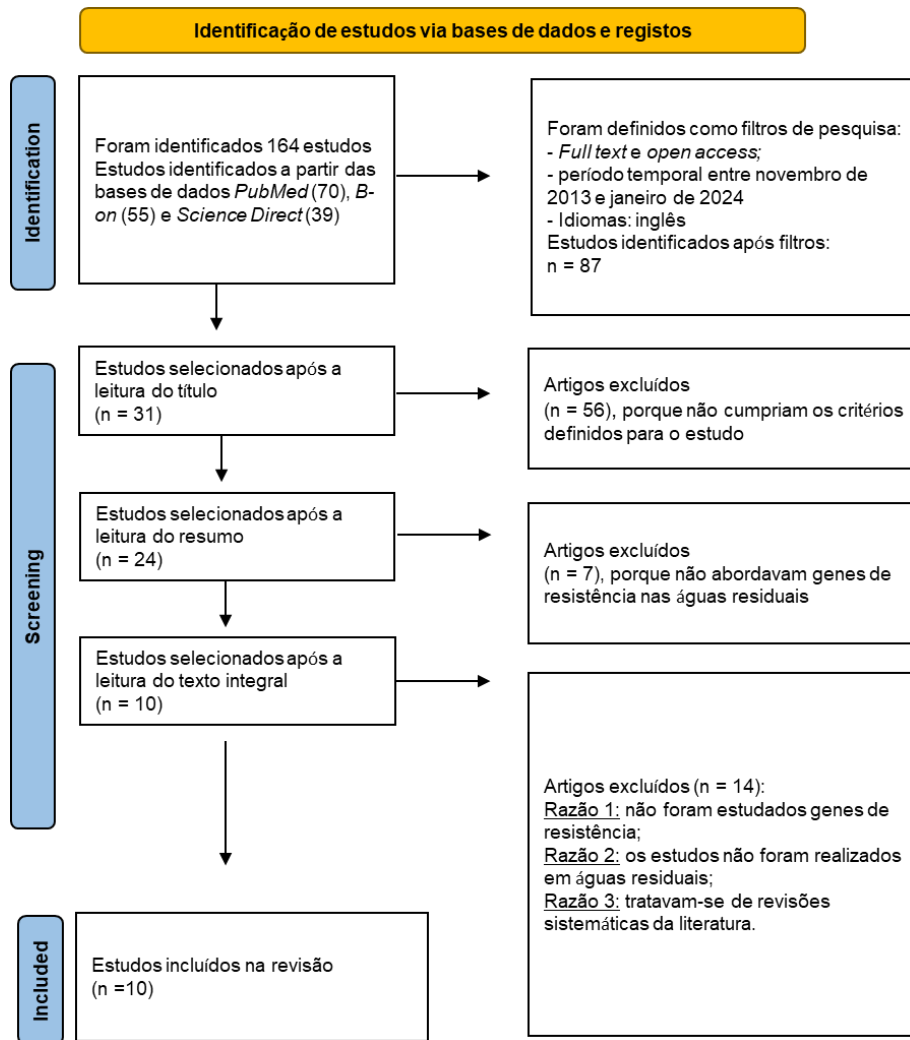


Figura 2: Fluxograma da pesquisa da revisão sistemática da literatura (Fonte: Page MJ, et al.

BMJ 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71.)

## 2.2 Qualidade dos artigos escolhidos

Para avaliar a qualidade dos estudos selecionados para esta revisão sistemática utilizou-se a ferramenta ROBINS-I (Risk Of Bias In Non-Randomized Studies of Interventions), que avalia o risco de viés, ou seja, de erros de artigos não randomizados, mas que pode ser adaptada para outros tipos de estudos, como é o caso destes, que avaliam a presença de genes de resistência nas águas residuais.

Em primeiro lugar, para essa avaliação teve-se em conta se os artigos selecionados abordavam diretamente genes de resistência nas águas residuais e se as águas residuais analisadas eram águas residuais de origem doméstica, hospitalar ou industrial. Outro fator para a avaliação foi se os métodos utilizados para a detecção e quantificação dos genes de resistência nas águas estavam descritos de forma clara e detalhada.

A ferramenta ROBINS-I divide-se em sete principais domínios, que detetam erros sistemáticos que decorrem do processo de pesquisa.

O primeiro domínio, “Bias due to confounding”, permite avaliar se os estudos selecionados conseguiram controlar viés/erros de confusão que influenciam a detecção ou quantificação de genes de resistência, como pode ser o caso do tipo de águas residuais, as condições ambientais/climáticas, tipos de tratamento utilizado nas ETARs, entre outros. É importante que esses fatores de confusão estejam bem explícitos ao longo do estudo.

O segundo domínio, “Bias in selection of participants”, permite verificar se a amostragem das águas residuais está relacionada com a população alvo (AR da comunidade vs AR hospitalar) e se estas foram representativas. As diferenças nos locais de recolha das amostras devem ser bem identificadas para não provocar erros de interpretação na análise dessas amostras.

O terceiro domínio, “Bias in classification of interventions”, avalia se os tipos de genes de resistência foram consistentes e validados nos artigos, ou seja, se as amostras colhidas nos diferentes locais foram analisadas e interpretadas de forma explícita, clara e objetiva.

O quarto domínio, “Bias due to deviations from intended interventions”, permite determinar se existiram desvios durante o estudo que possam ter influenciado os resultados obtidos (exemplo: mudanças nas metodologias de detecção de ARGs ou tipos de colheita de amostras diferentes). Avalia também se as amostras colhidas ao longo do estudo tiveram a mesma metodologia de análise, ou se foram analisadas de forma diferente.

O quinto domínio, “Bias due to missing data”, permite verificar se existiram dados ausentes significativos que possam ter enviesado os resultados ou se os estudos relataram a ausência de certos genes de resistência.

O sexto domínio, “Bias in measurement of outcomes”, avalia se os métodos utilizados para a detecção de genes de resistência foram robustos, reprodutíveis e apropriados, ou seja, se as técnicas para detecção desses genes tiveram estudos passados que comprovassem que eram técnicas fiáveis, com resultados fidedignos, para poderem ser utilizadas nestes estudos.

Por último, o sétimo domínio, “Bias is selection of reported result”, permite analisar se os estudos selecionados relatam, de forma seletiva, os genes de resistência com base nos resultados desejados ou se foram relatados todos os genes avaliados. Avalia também se os dados foram organizados de forma clara para mais facilmente serem interpretados pelos leitores.

Nas tabelas 1 a 10 apresentadas em seguida, foram organizados esses sete domínios abordados na ferramenta ROBINS-I, com as devidas justificações de acordo com o tipo de risco considerado sobre cada um dos domínios. Dos dez artigos em estudo analisados para esta revisão sistemática, apenas dois apresentaram risco moderado de erros. Os restantes apresentaram risco baixo de erros. Na figura 3 foi organizado o esquema referente à qualidade dos artigos da ferramenta ROBINS-I.

Tabela 1: ROBINS-I, Wang et al. (2015)

1. Bias due to confounding	Risco baixo, pois os tipos de tratamentos utilizados nas cinco ETARs foram distinguidos de forma clara, assim como o tipo de efluente que receberam.
2. Bias in selection of participants into the study	Risco baixo, pois as amostras foram colhidas nas diferentes ETARs de uma forma representativa de cada tratamento utilizado.
3. Bias in classification of interventions	Risco baixo, pois o método utilizado para deteção de ARGs foi consistente em todas as ETARs em estudo.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco baixo, pois o tipo de colheita das amostras foi igual nas cinco ETARs em estudo, assim como a extração de DNA para deteção de ARGs.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, pois não foram relatados dados não obtidos ou incompletos.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco baixo, pois o estudo utilizou técnicas para deteção de ARGs que já estão bem validadas e estudadas, tais como PCR.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois foram relatados todos os resultados obtidos, ou seja, os genes encontrados, nas diferentes ETARs, de acordo com os vários tipos de tratamentos utilizados.
Overall bias	Risco de viés baixo.

Tabela 2: ROBINS-I, Zhang et al. (2015)

1. Bias due to confounding	Risco baixo, pois as três ETARs em estudo apresentam os tipos de tratamento bem explícitos, assim como o tipo de AR que recebem.
2. Bias in selection of participants into the study	Risco baixo, pois as amostras colhidas são representativas do tipo de ETAR e do tipo de tratamento que esta apresenta.
3. Bias in classification of interventions	Risco moderado, pois a maioria das bactérias heterotróficas não são cultiváveis e um dos testes de detecção de ARGs foi através do método de Kirby Bauer que pode levar a erros de detecção. No entanto foi utilizada a técnica de qPCR para essa análise.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco baixo pois o tipo de colheita foi realizada de forma consistente nas três ETARs em estudo, e até foi avaliado em dois meses do ano diferentes.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, pois não foram relatados dados não obtidos ou incompletos.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco baixo, pois as técnicas utilizadas para detecção de ARGs já estão bem estudadas, como o caso do q PCR e teste de suscetibilidade antimicrobiana no meio de Mueller-Hinton Agar.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois todos os resultados foram explícitos e analisados.
Overall bias	Risco de viés baixo.

Tabela 3: ROBINS-I, Amador et al. (2015)

1. Bias due to confounding	Risco moderado, pois o uso de antibióticos pela comunidade pode ter variado ao longo do estudo, de acordo com a altura em que foram realizadas as colheitas das amostras. No entanto, o local e tipo de amostras colhidas foi bem explícito, assim como o tipo de tratamento.
2. Bias in selection of participants into the study	Risco baixo, pois neste estudo, apenas foi analisada uma ETAR, onde foram colhidas seis amostras de locais distintos. Também foram analisadas águas superficiais para além das residuais, com o objetivo de comparar a quantidade de ARGs presentes.
3. Bias in classification of interventions	Risco baixo pois os métodos utilizados para deteção de ESBLs e Amp C foi o PCR e teste de suscetibilidade antimicrobiana, que foram bem explícitos.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco baixo, pois o tipo de colheita foi consistente e preciso nos diferentes locais em estudo.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, pois não foram relatados dados não obtidos ou incompletos.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco baixo, pois as técnicas de deteção desses genes foram PCR e teste de suscetibilidade antimicrobiana, que são técnicas amplamente utilizadas para este tipo de deteção.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois foram expostos todos os resultados obtidos nos diferentes locais de colheita de amostras.
Overall bias	Risco de viés baixo.

Tabela 4: ROBINS-I, Varela et al. (2016)

1. Bias due to confounding	Risco moderado, pois o estudo pode ser influenciado por fatores como o tipo de AR utilizadas, municipais ou hospitalares, o consumo de antibióticos pode variar, e o tipo de saneamento.
2. Bias in selection of participants into the study	Risco moderado pois as <i>Aeromonas spp.</i> são bactérias que apresentam como habitat natural típico ambientes aquáticos, logo isto pode conduzir a erros tais como uma maior quantidade destas bactérias em determinadas colheitas de amostras, que pode indicar maior número de genes de resistências.
3. Bias in classification of interventions	Risco moderado, pois a técnica utilizada para a detecção de genes de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos não foi explícita de forma clara.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco baixo, pois todas as colheitas foram realizadas da mesma forma nos vários locais.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, pois não foram relatados dados não obtidos ou incompletos.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco moderado pois técnica utilizada para detecção de genes foi o PCR, no entanto esta não se encontra bem explícita.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois os resultados foram todos apresentados de forma clara e objetiva.
Overall bias	Risco de viés moderado.

Tabela 5: ROBINS-I, Buelow et al. (2018)

1. Bias due to confounding	Risco moderado, devido a fatores como o uso de antibióticos pela comunidade em comparação com o hospital.
2. Bias in selection of participants into the study	Risco baixo, pois as amostras foram colhidas de vários ambientes, quer provenientes de uma zona que recebeu esgoto hospitalar, quer de zonas que não recebiam esgoto hospitalar. Assim, foi possível comparar e analisar as diferenças entre as AR provenientes de um hospital, quer AR da comunidade.
3. Bias in classification of interventions	Risco baixo, pois a amostragem foi representativa dos vários locais de colheita e foi demonstrada de forma clara.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco moderado, pois todas as amostras foram colhidas e analisadas de forma clara e consistente, no entanto as análises do esgoto hospitalar não foram registadas de forma regular.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, pois não foram relatados dados não obtidos ou incompletos.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco baixo, pois a técnica utilizada para deteção dos genes de resistência foi o qPCR, que é uma técnica bastante estudada.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois os resultados foram demonstrados para todos os tipos de colheitas de forma organizada e clara.
Overall bias	Risco de viés baixo.

Tabela 6: ROBINS-I, Fernandes et al. (2019)

1. Bias due to confounding	Risco moderado pois, as três ETARs em estudo apresentam tratamentos distintos ou recebem águas provenientes de diferentes locais, assim como o uso de antibióticos pela comunidade e a poluição pode variar, ainda que as ETARs estejam localizadas próximas umas das outras.
2. Bias in selection of participants into the study	Risco baixo, pois as ETARs escolhidas estão localizadas próximas umas das outras.
3. Bias in classification of interventions	Risco baixo, pois a distinção feita entre as três ETARs é clara e os resíduos obtidos foram bem explícitos.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco moderado, pois as amostras foram colhidas em alturas do ano diferentes, assim como em anos diferentes.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, pois não foram relatados dados não obtidos ou incompletos.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco baixo, pois foi através do qPCR que se detetaram os genes de resistência presentes nas amostras colhidas.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois os resultados foram todos demonstrados de forma clara.
Overall bias	Risco de viés baixo.

Tabela 7: ROBINS-I, Pärnänen et al. (2019)

1. Bias due to confounding	Risco alto, pois o tipo de tratamento das ETARs, o consumo de antibióticos, a incidência de infeções, o tipo de AR, são fatores que variam de acordo com o país em estudo.
2. Bias in selection of participants into the study	Risco baixo, pois as ETARs selecionadas para analisar pertencem aos vários países da Europa em estudo.
3. Bias in classification of interventions	Risco baixo, pois para todas as amostras em estudo foi utilizado o qPCR para deteção dos vários genes de resistência presentes nas AR.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco moderado, pois as amostras foram colhidas de igual forma nas diferentes ETARs, no entanto as amostras do afluente da ETAR da Irlanda não estavam disponíveis.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, uma vez que nem todas as amostras pretendidas conseguiram ser colhidas.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco baixo, pois a técnica de deteção dos genes de resistência é confiável e bem estudada.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois todos os resultados das amostras analisadas foram apresentados de forma clara.
Overall bias	Risco de viés moderado.

Tabela 8: ROBINS-I, Silva et al. (2022)

1. Bias due to confounding	Risco moderado, pois das três amostras de águas residuais hospitalares em estudo onde foram realizadas as colheitas para o estudo, apenas uma tinha ETAR.
2. Bias in selection of participants into the study	Risco baixo, pois a escolha dos hospitais foi aleatória na zona norte de Portugal.
3. Bias in classification of interventions	Risco baixo, pois a presença de genes de resistência e de virulência foi determinada por PCR e através do teste de suscetibilidade antimicrobiana.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco baixo, pois todas as amostras colhidas das AR dos três hospitais no norte de Portugal foram realizadas com o mesmo procedimento.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, uma vez que nem todas as amostras pretendidas conseguiram ser colhidas.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco baixo, pois os métodos utilizados para deteção de genes de resistência foi através do PCR e teste de suscetibilidade antimicrobiana, que já são técnicas amplamente estudadas.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois os genes isolados e detetados nas AR foram relatados de forma clara nos resultados da pesquisa.
Overall bias	Risco de viés baixo.

Tabela 9: ROBINS-I, Hutinel et al. (2022)

1. Bias due to confounding	Risco moderado, pois este estudo permite quantificar ARGs de preocupação emergente, que raramente ou nunca foram detetados nas AR desta cidade sueca, ao longo de cinco anos de estudo. Algumas amostras foram colhidas na ETAR do hospital universitário e pode haver risco de viés pois esta ETAR não recebe diretamente matéria fecal de animais de produção, mas por vezes pode conter resíduos fecais de pássaros, gatos e cães, que pode enviesar os resultados obtidos.
2. Bias in selection of participants into the study	Risco baixo, pois as amostras foram colhidas de diferentes locais, para que o estudo fosse mais representativo.
3. Bias in classification of interventions	Risco moderado, pois o estudo distinguiu, de forma clara, as AR municipais e as hospitalares e utilizou qPCR para deteção de genes de resistência, porém através da metodologia utilizada não é possível concluir com certeza se os ARGs encontrados eram provenientes de espécies patogénicas ou não patogénicas.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco baixo, pois as amostras, apesar de colhidas em locais distintos, foram tratadas de igual forma.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, uma vez que nem todas as amostras pretendidas conseguiram ser colhidas.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco baixo, pois para deteção e análise do gene 16S rRNA presente nas amostras de AR, foi realizado qPCR, que é uma técnica bastante estudada.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois todos os resultados obtidos foram demonstrados nos resultados do estudo.
Overall bias	Risco de viés baixo.

Tabela 10: ROBINS-I, Kang et al. (2021)

1. Bias due to confounding	Risco moderado, pois os tratamentos das cinco ETARs em estudo pode variar, assim como as condições climáticas (variação de temperatura) ao longo do estudo (entre setembro de 2020 - 22,8°C - e janeiro de 2021 - 0,1°C).
2. Bias in selection of participants into the study	Risco baixo, pois foram colhidas amostras de vários locais, tais como do afluente, como amostras de lamas, quer amostras de AR a ETAR.
3. Bias in classification of interventions	Risco baixo, pois as amostras colhidas foram analisadas através de qPCR, para deteção do resistoma, ou seja, genes de resistência.
4. Bias due to deviations from intended interventions	Risco baixo, pois as amostras foram todas colhidas nas mesmas alturas ao longo do estudo completo.
5. Bias due to missing data	Risco moderado, uma vez que nem todas as amostras pretendidas conseguiram ser colhidas.
6. Bias in measurement of outcomes	Risco baixo pois o método utilizado para a deteção de ARGs nas amostras foi qPCR, que é um método amplamente estudado e utilizado.
7. Bias in selection of the reported result	Risco baixo, pois os resultados apresentam de forma organizada os tipos de genes e a quantidade encontrada destes ao longo das várias amostras colhidas, com os diferentes tratamentos.
Overall bias	Risco de viés baixo.

O perfil global da resistência aos antibióticos em águas residuais: uma revisão sistemática

Study	Risk of bias domains							Overall
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	
Wang et al. (2015)	+	+	+	+	-	+	+	+
Zhang et al. (2015)	+	+	-	+	-	+	+	+
Amador et al. (2015)	-	+	+	+	-	+	+	+
Varela et al. (2016)	-	-	-	+	-	-	+	-
Buelow et al. (2018)	-	+	+	-	-	+	+	+
Fernandes et al. (2019)	-	+	+	-	-	+	+	+
Pärnänen et al. (2019)	⊗	+	+	-	-	+	+	-
Silva et al. (2022)	-	+	-	+	-	+	+	+
Hutinel et al. (2022)	-	+	+	+	-	+	+	+
Kang et al. (2021)	-	+	+	+	-	+	+	+

Domains:  
D1: Bias due to confounding.  
D2: Bias due to selection of participants.  
D3: Bias in classification of interventions.  
D4: Bias due to deviations from intended interventions.  
D5: Bias due to missing data.  
D6: Bias in measurement of outcomes.  
D7: Bias in selection of the reported result.

Judgement  
⊗ Serious  
- Moderate  
+ Low

Figura 3: Risk Of Bias In Non-Randomized Studies of Interventions

### III. Resultados

Foram escolhidos dez artigos para comparar nesta revisão sistemática, com base nos critérios de inclusão indicados acima. Todos estes artigos apresentam estudos em águas residuais, em diferentes países, quer da Europa, quer da Ásia. Os objetivos, tipo de amostras colhidas, tipo de identificação das amostras, as unidades em que foram avaliados os ARGs e ARBs e as conclusões de cada artigo encontram-se descritas, de forma sucinta, nas tabelas abaixo (11 e 12). A deteção de ARGs nas amostras, em todos os artigos estudados, foi determinada por PCR (reação em cadeia de polimerase) e, em alguns deles foram realizados testes de suscetibilidade antimicrobiana.

#### 3.1. Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de polimerase)

A técnica de PCR foi desenvolvida em 1984 pelo bioquímico americano Kary Mullis, e consiste numa técnica de biologia molecular que através da utilização de sondas de DNA específicas, amplifica um fragmento de DNA, produzindo milhões de cópias desse fragmento específico de DNA. Tornou-se uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular devido ao seu baixo custo, à sua rapidez e simplicidade de isolar um fragmento específico de DNA. O princípio da técnica consiste numa reação em cadeia, ou seja, uma molécula de DNA é utilizada para produzir cópias sequenciais de um fragmento em particular. Essas cópias contínuas são realizadas por DNA polimerases, que são enzimas capazes de replicar cadeias de DNA, levando à formação dos novos fragmentos de DNA (Rocha *et al.*, 2019).

A técnica de PCR é muito utilizada para a determinação de genes de resistência, sendo considerada uma técnica bastante fiável e com ótimos resultados. Porém, certos autores, consideram também importante a realização de um teste de suscetibilidade antimicrobiana, utilizando meios de cultura.

A técnica de PCR tem como princípio a detecção de um ou mais genes específicos presentes numa amostra, sendo uma técnica considerada limitada pois faz uma pergunta mais direcionada. No entanto, é possível, através da realização de uma sequenciação, avaliar o genoma completo de uma determinada bactéria em estudo, porém é um processo mais dispendioso que não é regularmente utilizado em testes de rotina no laboratório. Assim, a técnica de PCR é considerada mais fácil de realização em testes de rotina em laboratório, pois permite fazer estudos com um maior número de amostras mais rapidamente, comparativamente com os testes de suscetibilidade antimicrobiana que apenas detetam se a bactéria em estudo é suscetível ou resistente ao antibiótico em estudo, sendo considerado uma avaliação mais vasta (Lorenz, 2012). Esta técnica apresenta como desvantagem a necessidade de utilizar uma quantidade reduzida de sondas para a realização da sua análise. Para isso é importante identificar os genes mais prevalentes presentes nas amostras em estudo, para que se possa seleccionar que primers utilizar para essa identificação. Por isso é que a realização simultânea de testes de suscetibilidade antimicrobiana são uma vantagem pois permite verificar se a bactéria em estudo é ou não resistente ao antibiótico. Só assim é possível identificar e pesquisar quais os possíveis genes de resistência presentes na amostra.

### 3.2. Teste de suscetibilidade antimicrobiana

É possível realizar, para além da técnica de PCR, um teste de suscetibilidade antimicrobiana para avaliar as várias resistências de uma determinada bactéria aos antibióticos. Esse teste de suscetibilidade inclui vários métodos, entre eles: método de Kirby-Bauer (difusão em disco em meio sólido) e método de microdiluição em placa (determinação da concentração mínima inibitória), como foi verificado em alguns artigos desta revisão sistemática. É importante a realização da técnica de PCR, no entanto a realização simultânea destes testes de suscetibilidade tornam o estudo mais robusto relativamente aos resultados obtidos.

#### 3.2.1. Método de Kirby-Bauer

Esta técnica é utilizada para avaliar a suscetibilidade bacteriana a diferentes antibióticos e consiste na deposição de um ou mais discos de antibióticos numa placa em meio de Mueller-Hinton agar, previamente impregnado com uma determinada bactéria em técnica assética.

Após incubação em estufa, e no caso de existir um efeito antibacteriano, este observa-se através da formação de um halo de inibição de crescimento bacteriano, podendo posteriormente medir-se o seu diâmetro e avaliar se existe ou não resistência (através da análise dos intervalos de referência padronizados).

### 3.2.2. Método da microdiluição em placa

No método de microdiluição em placa, é determinada a concentração inibitória mínima, associada ao tamanho do halo de resistência (Elshikh *et al.*, 2016), ou seja, a concentração mínima de antibiótico a partir do qual é possível inibir o crescimento de uma bactéria (ação bacteriostática). Esta técnica consiste na diluição do antibiótico num meio de agar ou num meio líquido que posteriormente é inoculado com a bactéria em estudo.

É possível interpretar que quanto menor for o valor da concentração mínima inibitória, mais potente é o antibiótico em causa e mais dificilmente a bactéria adquire resistência (Clinical\_and\_Laboratory\_Standards\_Institute, 2018).

### 3.3. Antibióticos estudados

Os antibióticos estudados foram semelhantes nos dez artigos estudados, sendo os  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclínas e quinolonas os mais comuns, pois são as classes de antibióticos mais usualmente utilizadas, tanto a nível clínico como pela comunidade. As quinolonas pertencem à classe de antibióticos mais prescrita a nível clínico para o tratamento de infeções dos tecidos moles, o que se transmite num maior aparecimento de genes de resistência a esta classe de antibióticos nas AR hospitalares (Silva *et al.*, 2022).

Nas últimas décadas os antibióticos têm sido utilizados, para além da terapêutica humana, na terapêutica animal e na pecuária, o que se converte em problemas graves a nível ambiental e problemas de saúde pública, devido ao facto de a quantidade de resíduos de antibióticos nas AR aumentar e ao aparecimento de bactérias resistentes a esses antibióticos (Amador *et al.*, 2015).

Segundo Zhang et al. (2015), a quantidade de bactérias resistentes a antibióticos, assim como a quantidade de bactérias multirresistentes, tende a ser maior no afluente das ETARs, comparativamente com o efluente. Para além disto, Wang et al. (2015) concluiu que quanto maior a carga de antibióticos no afluente da ETAR, maior a diversidade de ARGs nos efluentes. No entanto, as ETARs apresentam um importante papel na diminuição e remoção de bactérias resistentes a antibióticos e de ARGs.

As AR hospitalares tendem a servir de reservatório de ARB e de ARGs pois contêm fezes e urina de doentes hospitalizados, que apresentam maior quantidade de bactérias patogénicas, seleccionadas pelos seus genes de resistência e até mesmo bactérias multirresistentes, comparativamente com a população em geral (Buelow *et al.*, 2018). Para além disto, outro problema que promove o aumento de resistência aos antibióticos consiste na quantidade de resíduos de antibióticos que atinge as AR hospitalares, que é preocupante pois apresenta elevada persistência, sendo quase impossível a sua eliminação, promovendo a disseminação de ARGs nas águas (Chamkal *et al.*, 2022).

Segundo Pärnänen et al. (2019), os países do sul, tais como Portugal, Espanha e Chipre, são aqueles com maior consumo de antibióticos (HAC) a nível animal, o que se transmite em valores significativamente superiores de genes de resistência nos efluentes finais destes países comparativamente com os efluentes finais de países com baixo consumo de antibióticos (LAC), como é o caso da Alemanha, Finlândia e Noruega (países do norte). A esta questão, podemos juntar também o facto de, nos países com HAC, as temperaturas mínimas serem mais altas e a precipitação menor, ambiente favorável para a sobrevivência de bactérias.

#### 3.4. Genes de resistência

Os genes de resistência analisados nos diversos artigos foram semelhantes, apesar de a quantidade de genes encontrados nas AR ter variado entre os artigos.

A quantidade de ARGs detetadas nas águas residuais varia de acordo com o tipo de tratamento utilizado na ETAR. Por exemplo, segundo Zhang et al. (2015), quando a etapa de tratamento com lamas ativadas foi realizada no compartimento anóxico/anaeróbico a quantidade de genes de resistência encontrados foi inferior comparativamente com o compartimento aeróbico. Isto sugere que as bactérias, assim como os seus genes de resistência, na presença de oxigénio sobrevivem com mais facilidade, do que quando na ausência de oxigénio, quer na forma molecular (compartimento anaeróbico) quer em associação (compartimento anóxico). Também Wang et al. (2015) afirmou que o crescimento microbiano foi mais lento nas fases de tratamento em que as bactérias se encontravam na ausência de oxigénio, o que consequentemente conduzia a uma menor quantidade de ARGs formados.

No estudo realizado por Amador et al. (2015), onde foi comparada a quantidade de ARGs nas águas superficiais a montante e jusante da ETAR, concluiu-se que a presença desses ARGs foi superior nas águas superficiais a jusante da ETAR, comparativamente com a montante. Isto pode ser justificado pelo facto de o ecossistema da ETAR ser um importante reservatório de bactérias que aportam ARGs e pelo facto de estes genes poderem ser transferidos horizontalmente para outras bactérias.

Por outro lado, segundo Amador et al. (2015) e Buelow et al. (2018), ao comparar águas superficiais a jusante da ETAR e águas residuais do efluente, a quantidade de ARGs é superior no efluente. Assim, pode afirmar-se que as ETARs destacam um papel essencial no tratamento das águas residuais, através da redução da descarga de ARGs provenientes de fontes humanas do ambiente.

O gene integrase de classe 1 (*int1*) é considerado um elemento genético móvel (EGM) propício à formação de resistência a diversos antibióticos que aceleram a disseminação de genes de resistência a antibióticos nas águas residuais (Wang *et al.*, 2015). Segundo Wang et al. (2015), Fernandes et al. (2019) e Pärnänen et al. (2019), estes EGM foram detetados em grande abundância nas águas residuais analisadas.

Este gene integrase de classe 1 está mais frequentemente associado, a longo prazo, ao aparecimento de genes de resistência nas lamas ativadas, o que favorece a transferência horizontal de genes (Zheng *et al.*, 2020).

De um modo geral, os genes de resistência mais comumente encontrados nas águas residuais nos artigos selecionados pertencem às classes de antibióticos de sulfonamidas, entre eles o gene *sul1*, às tetraciclinas, por exemplo *tetM* e *tetW* e aos  $\beta$ -lactâmicos, como são o caso dos genes *bla OXA*, *bla TEM*, *bla SHV* e *bla CTX-M*. Segundo Buelow et al. (2018) e Pärnänen et al. (2019), os genes encontrados nas águas residuais que apresentavam resistência à Vancomicina eram exclusivamente encontrados nas águas residuais hospitalares, pois esta classe de fármacos é de uso exclusivo hospitalar para tratar doenças graves (INFARMED, 2017), como por exemplo para o tratamento, via intravenosa, de infecções graves por MRSA ou para tratar infecções estafilocócicas em doentes que são intolerantes ao tratamento com penicilina. Como a vancomicina é eliminada por filtração glomerular, facilmente atinge as águas residuais hospitalares (João Carlos Sousa, 2016).

Relativamente à quantidade de genes de resistência encontrados nas águas residuais após tratamento nas ETARs, segundo Buelow et al. (2018) e Silva et al. (2022), estas estações de tratamento têm um importante papel na redução dessa proliferação de genes, porém as estirpes de bactérias que sobrevivem a esses tratamentos podem ter uma maior probabilidade de serem multirresistentes e de apresentar genes de resistência mais complexos. Por outro lado, de acordo com Amador et al. (2015), o tratamento das águas residuais pode contribuir para o aumento da frequência de bactérias nos ecossistemas aquáticos, pois as ETARs podem servir de reservatório para bactérias que aportam genes de resistência que podem ser transferidos para outras bactérias. Do mesmo modo, Wang et al. (2015) afirmou que, apesar de os resíduos de antibióticos terem sido eliminados eficazmente após tratamento nas ETARs, determinantes da resistência aos antibióticos, como são os ARGs, proliferaram através das fases de tratamento biológico, principalmente quando o tratamento foi o processo convencional de lamas ativadas. Assim, os elevados resíduos de antibióticos nas ETARs podem influenciar a proliferação e o destino de ARGs associados.

### 3.5. Tratamentos utilizados nas ETARs

O tipo de tratamento pode variar nas várias ETARs e influencia a capacidade de remoção de agentes patogénicos. Isto verificou-se durante a análise dos vários estudos selecionados para análise nesta revisão.

De acordo com vários autores, tais como Wang et al. (2015), Zhang et al. (2015), quando o tratamento utilizado na ETAR foi realizado na ausência de oxigénio, a eficácia na redução de bactérias com genes de resistência foi superior comparativamente com tratamentos realizados na presença de oxigénio, possivelmente devido ao facto de estas bactérias necessitarem de oxigénio para as suas funções vitais, tais como para a produção de energia.

Estudos realizados anteriormente mostram que nem as ETARs convencionais nem as mais recentes/avançadas são capazes de remover completamente todas as ARB e todos os ARGs dos ambientes aquáticos, como são o caso das águas residuais, mas que, no entanto, aquelas que têm tipos de tratamentos mais avançados desempenham um papel mais eficaz na diminuição dessas resistências. Os métodos avançados de pós-tratamento, como a desinfecção UV, a ozonização e oxidação dos efluentes de água, têm a capacidade de remover mais eficientemente ARGs e ARB do que o tratamento convencional de lamas ativadas, apesar de estes métodos mais avançados terem desvantagens como uma monitorização e operação mais difícil e mais dispendiosa (Uluseker *et al.*, 2021).

Tabela 11 – Artigos selecionados para a RS: país, objetivo e conclusão do estudo.

<b>Número</b>	<b>Referência</b>	<b>País</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Conclusão</b>
1.	Wang et al. (2015)	China	Investigar o destino e a proliferação de ARGs em cada uma das etapas do tratamento de águas residuais farmacêuticas e desenvolvimento de estratégias e tecnologias de tratamento para controlar a disseminação desses genes.	Os antibióticos foram eliminados nas estações de tratamento de águas residuais farmacêuticas, porém os determinantes da resistência aos antibióticos proliferaram pelas várias fases de tratamento biológico, especialmente na tecnologia convencional de lamas ativadas.
2.	Zhang et al. (2015)	China	Avaliar as alterações na resistência a antibióticos em bactérias heterotróficas cultiváveis; Estudar se os ARGs presentes no afluente eram diferentes daqueles do efluente; Investigar se os ARGs aumentaram em locais com fluxo de água.	Todas as ETARs apresentaram desempenho positivo na remoção de bactérias heterotróficas totais cultiváveis, incluindo coliformes fecais.
3.	Amador et al. (2015)	Portugal	Deteção de bactérias multirresistentes, produtoras de $\beta$ -lactamases, AmpC e ESBLs.	A existência de bactérias multirresistentes é principalmente devido às atividades antrópicas; O tratamento das águas residuais promove o desenvolvimento de bactérias na água.

O perfil global da resistência aos antibióticos em águas residuais: uma revisão sistemática

4.	Varela et al. (2016)	Portugal	Avaliar se o efluente hospitalar pode ser considerado o principal reservatório de <i>Aeromonas spp.</i> ou se esta bactéria pode ser indicadora de resistência a antibióticos em fontes não hospitalares.	O estudo realça que <i>Aeromonas spp.</i> é um importante indicador de resistência a antibióticos em ambientes aquáticos. Bactérias deste género podem ser responsáveis pela aquisição de resistências a antibióticos. Tanto os efluentes hospitalares, como os municipais apresentaram vários tipos de PMQR (resistência às quinolonas mediada por beta-lactâmicos e plasmídeos).
5.	Buelow et al. (2018)	Holanda	Quantificar o papel do efluente hospitalar na disseminação de ARGs no sistema de esgoto.	O esgoto hospitalar apresentou níveis elevados de ARGs; Ambas as ETARs estudadas apresentaram níveis semelhantes de ARGs; A quantidade de genes de resistência encontrados no esgoto hospitalar é superior ao detetado nas ETARs, devido a um maior uso de AB em ambiente hospitalar.
6.	Fernandes et al. (2019)	Portugal	Avaliar se o tipo de bactérias presentes nas ETARs urbanas está relacionado com os mecanismos de resistência a antibióticos (AB).	A prevalência de ARG é superior à quantidade de famílias de bactérias numa ETAR; A presença de ARG pode não diferir em ETARs distintas, localizadas na mesma região.

O perfil global da resistência aos antibióticos em águas residuais: uma revisão sistemática

7.	Pärnänen et al. (2019)	Portugal, Espanha, Irlanda, Chipre, Alemanha, Finlândia e Noruega	Comparação entre o afluente e o efluente de doze ETARs urbanas em sete países diferentes (Portugal, Espanha, Chipre, Irlanda, Finlândia, Alemanha e Noruega).	A quantidade de ARG, após o tratamento das águas residuais, foi superior nos países do sul, comparativamente com os países do norte, devido a um maior consumo de antibióticos nos países do sul; O aparecimento de ARG está também relacionado com fatores sociais e climáticos (temperatura e precipitação).
8.	Silva et al. (2022)	Portugal	Caracterização de MRSA presentes em águas residuais, quanto à sua resistência e linhagens genéticas.	As amostras de água colhidas após o tratamento na ETAR, demonstraram melhores resultados relativamente à sobrevivência e disseminação de estirpes de MRSA.
9.	Hutinel et al. (2022)	Suécia	Quantificar ARGs em águas residuais hospitalares e municipais brutas, bem como em águas residuais municipais tratadas.	Os ARGs investigados são prevalentes na Suécia. A sua deteção nas águas residuais pode indicar a sua presença na flora intestinal da população sueca, afetando a eficácia dos tratamentos com antibióticos.
10.	Kang et al. (2021)	Coreia do Sul	Monitorizar ARGs e MRB (multidrug resistente bactéria) na presença de oito antibióticos diferentes.	As espécies <i>Enterococcus</i> e <i>Chryseobacterium</i> foram as MRB predominantes em todos os processos da ETAR e apresentam elevada resistência a vários antibióticos.

O perfil global da resistência aos antibióticos em águas residuais: uma revisão sistemática

Tabela 12 – Artigos selecionados para a RS: amostra, identificação e unidades em que foram avaliadas as ARB e os ARG.

<b>Número</b>	<b>Referência</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Tipo de identificação</b>	<b>Unidades (ARB/ARG)</b>
1.	Wang et al. (2015)	Foram investigadas amostras de águas residuais de cinco ETARFs (estações de tratamento de águas residuais farmacêuticas) com diferentes recursos biológicos e processos tecnológicos físicos/químicos.	A quantificação de ARGs foi realizada por PCR e qPCR.	Concentração de ARGs – nº de cópias do gene/ml de água ou nº de cópias do gene/g de lama ativada.
2.	Zhang et al. (2015)	Foram colhidas amostras do afluente, do efluente e das lamas ativadas em três ETARs.	Enumeração de bactérias heterotróficas cultiváveis e coliformes totais; Teste de suscetibilidade a antibióticos; Deteção de ARGs e identificação de BRA; Extração de DNA das lamas ativadas e qPCR em tempo real de ARGs.	Identificação de ARGs e ARB – percentagem (%).
3.	Amador et al. (2015)	Afluente e efluente da ETAR de Choupal; Zona urbana e hospital; Águas superficiais do rio Mondego, a montante e jusante da ETAR.	Teste de suscetibilidade antimicrobiana; Determinação do índice MAR (Multiple Antibiotic Resistance); PCR multiplex.	Determinação dos genes que codificam ESBL e AmpC – percentagem (%).
4.	Varela et al. (2016)	Foram comparadas 112 espécies de <i>Aeromonas</i> resistentes ao ácido nalidíxico (quinolona) isoladas de efluentes hospitalares, efluentes brutos e de efluentes tratados em estações de tratamento de águas residuais urbanas (ETAR).	Os isolados de <i>Aeromonas spp.</i> foram identificados com base na análise da sequência do gene 16S rRNA.	Pesquisa de genes de resistência às quinolonas mediadas por plasmídeos (PMQR).

O perfil global da resistência aos antibióticos em águas residuais: uma revisão sistemática

5.	Buelow et al. (2018)	Amostras colhidas diretamente da tubagem das águas residuais do hospital (na Holanda) e em duas ETARs, uma urbana que trata águas residuais provenientes de hospitais e outra apenas trata águas residuais suburbanas.	qPCR(reação em cadeia de polimerase quantitativa).	Composição da microbiota do esgoto hospitalar, afluente e efluente da ETAR e águas fluviais – percentagem (%).
6.	Fernandes et al. (2019)	Colheita em três ETARs localizadas numa região de 7 km no norte de Portugal.	qPCR	Comunidade bacteriana – Percentagem (%); Quantificação de ARGs – abundância genética (número de cópias do gene/mL de amostra) e prevalência (número de cópias do gene alvo/número de cópias do gene 16S rRNA).
7.	Pärnänen et al. (2019)	Isolados invasivos de sangue e líquido cefalorraquidiano de várias bactérias.	Métodos metagenómicos, baseados em sequências shotgun de alto rendimento; qPCR.	Indicadores de ARGs nas águas residuais – percentagem (%).
8.	Silva et al. (2022)	24 amostras de águas residuais de três hospitais distintos; 24 amostras, após tratamento na ETAR, do único hospital que dispunha de uma ETAR.	Método de difusão em discos (Kirby-Bauer) para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana; PCR para pesquisar genes de resistência.	Resistência antimicrobiana e virulência – percentagem (%).

O perfil global da resistência aos antibióticos em águas residuais: uma revisão sistemática

9.	Hutinel et al. (2022)	44 amostras de águas residuais (águas residuais não tratadas colhidas no esgoto do maior Hospital Universitário e do ponto de entrada da ETAR; e águas residuais tratadas colhidas após processamento completo na ETAR).	qPCR – utilizada para quantificar RNA ribossomal 16S e ARGs.	
10.	Kang et al. (2021)	Foram colhidas 10 amostras de águas residuais (do afluente e das lamas ativadas).	Análise da comunidade bacteriana e identificação de ARGs; Testes de resistência a antibióticos e seleção de MRB; Análise filogenética de MRB (PCR para amplificar o DNA); Teste de suscetibilidade antimicrobiana (método de diluição em placa).	Contagem de bactérias resistentes – UFC/g

#### **IV. Conclusão**

Após a análise de todos os artigos selecionados para esta revisão sistemática, é possível concluir que os genes de resistência mais prevalentes nas águas residuais são aqueles que apresentam resistência a classes de antibióticos como o caso dos  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclina, apesar de outras classes de antibióticos também necessitarem de especial atenção como os macrólidos e os aminoglicosídeos. A detecção desses genes de resistência é realizada, maioritariamente, pela técnica de PCR, pois é aquela que apresenta resultados mais rápidos em testes de rotina no laboratório, apesar de ter desvantagens tais como a necessidade de realizar novos estudos para a identificação de novos genes de resistência, de acordo com a prevalência de genes detetados na amostra. É também possível, através da realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana, detetar se uma determinada bactéria é resistente ou suscetível a um antibiótico e posteriormente pesquisar quais os genes de resistência. É aconselhado a utilização dos dois métodos para que os resultados obtidos sejam mais robustos e comprovados.

O processo convencional de lamas ativadas foi sempre muito utilizado nas estações de tratamento de águas residuais pois pensava-se ser aquele mais eficaz na remoção de matéria orgânica presente nessas águas. No entanto, na atualidade, e após vários estudos, este processo revela diversas desvantagens, tais como a necessidade de monitorização constante, a emissão de odores desagradáveis para a população que habita próximo da ETAR, o facto de durante a eliminação das lamas excedentes estas podem conter toxinas que são lançadas para o meio ambiente, o elevado custo da manutenção dos aparelhos, o fraco desempenho na eliminação de bactérias e genes de resistência a antibióticos, entre outras.

Para diminuir ou mesmo mitigar estes genes de resistência nas águas residuais, o tratamento mais eficaz utilizado atualmente nas ETARs é o tratamento realizado na ausência de oxigênio, ou seja, em condições anaeróbias ou anóxicas, pois é o que apresenta melhores resultados na eliminação de bactérias e genes de resistência. Quando o tratamento utilizado na ETAR é o convencional de lamas ativadas (processo aeróbio), a quantidade de ARGs detetados é bastante elevada comparativamente com os outros processos de tratamento. Verificou-se também que as ETARs que apresentam tratamento físico-químico avançado, para além do tratamento biológico, têm uma maior capacidade de remoção de bactérias resistentes que aportam genes de resistência. Assim sendo, é aconselhado, para além dos tratamentos biológicos, a implementação de tratamentos físico químicos nestas estações de tratamento.

As águas residuais hospitalares aportam uma maior quantidade de bactérias e genes de resistência a antibióticos comparativamente com as águas residuais comunitárias. Isto deve-se ao facto de, em ambiente clínico, ser prescrito uma maior quantidade e mais regularmente fármacos pertencentes a esta classe. Esses genes encontrados nas águas residuais hospitalares tendem a ser mais resistentes e estão presentes em maior quantidade e em maior diversidade. Para além disso, como a população presente em ambiente clínico tem o seu sistema imunitário mais comprometido e fragilizado, esses genes de resistência aos antibióticos atuam mais facilmente, dificultando a eficácia do tratamento.

Por todos os motivos anteriormente mencionados, é possível concluir que as ETARs apresentam um importante papel na redução de genes de resistência a antibióticos nas águas que são posteriormente libertadas para o meio ambiente, impedindo assim a transferência destes genes entre diferentes microrganismos, quer patogénicos quer não patogénicos. Ainda assim, são necessários estudos mais pormenorizados pois, a quantidade de resíduos de antibióticos que atinge as águas residuais continua a favorecer a pressão seletiva, aumentando a quantidade e a transferência de genes de resistência entre bactérias, que, posteriormente são lançados para o ambiente, provocando problemas graves como a disseminação de bactérias não patogénicas que recebem esses genes de resistência, tornando-se patogénicas, a perda de eficácia de antibióticos essenciais para o tratamento de várias doenças, entre outros.

## V. Bibliografia

- Amador, P. P. *et al.* (2015). Antibiotic resistance in wastewater: occurrence and fate of Enterobacteriaceae producers of class A and class C beta-lactamases. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 50(1), pp. 26-39.
- Barancheshme, F. e Munir, M. (2017). Strategies to Combat Antibiotic Resistance in the Wastewater Treatment Plants. *Front Microbiol*, 8, pp. 2603.
- Buelow, E. *et al.* (2018). Limited influence of hospital wastewater on the microbiome and resistome of wastewater in a community sewerage system. *FEMS Microbiol Ecol*, 94(7), pp.
- Chamkal, N. *et al.* (2022). Hospital Antibiotics Usage: Environmental Hazard and Promotion of Antibiotic Resistant Bacteria. *Ann Ig*, 34(3), pp. 266-278.
- Clinical\_and\_Laboratory\_Standards\_Institute. (2018). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically [Em linha]. Disponível em <[https://clsi.org/media/1928/m07ed11\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf)>. [Consultado em 24 fevereiro].
- Daubin, V. e Szollosi, G. J. (2016). Horizontal Gene Transfer and the History of Life. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(4), pp. a018036.
- Elshikh, M. *et al.* (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*, 38(6), pp. 1015-1019.
- Fernandes, T., Vaz-Moreira, I. e Manaia, C. M. (2019). Neighbor urban wastewater treatment plants display distinct profiles of bacterial community and antibiotic resistance genes. *Environ Sci Pollut Res Int*, 26(11), pp. 11269-11278.
- Fillol-Salom, A. *et al.* (2019). Bacteriophages benefit from generalized transduction. *PLoS Pathog*, 15(7), pp. e1007888.
- Gaşpar, C.-M. *et al.* (2021). Antibiotic Resistance among Escherichia coli Isolates from Hospital Wastewater Compared to Community Wastewater. *Water*, 13(23), pp.
- Hutinel, M., Larsson, D. G. J. e Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance genes of emerging concern in municipal and hospital wastewater from a major Swedish city. *Sci Total Environ*, 812, pp. 151433.
- INFARMED. (2017). Circular Informativa N.º 073/CD/550.20.001, de 09-06-2017 [Em linha]. Disponível em <[https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&\\_101\\_struts\\_action=/asset\\_publisher/view\\_content&\\_101\\_assetEntryId=2187884&\\_101\\_type=content&\\_101\\_urlTitle=vancomicina-recomendacoes-de-utilizacao&inheritRedirect=false](https://www.infarmed.pt/web/infarmed/infarmed?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&_101_struts_action=/asset_publisher/view_content&_101_assetEntryId=2187884&_101_type=content&_101_urlTitle=vancomicina-recomendacoes-de-utilizacao&inheritRedirect=false)>. [Consultado em 12/05].
- Jiang, S. *et al.* (2018). Drug Resistance and Gene Transfer Mechanisms in Respiratory/Oral Bacteria. *J Dent Res*, 97(10), pp. 1092-1099.
- João Carlos Sousa, E. M., Carla Novais, Luísa Peixe, José Amorim, Nuno Monteiro (2016). *Antibióticos, volume I*.
- Karkman, A. *et al.* (2018). Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends Microbiol*, 26(3), pp. 220-228.
- Lepper, H. C. *et al.* (2023). Distinctive hospital and community resistomes in Scottish urban wastewater: Metagenomics of a paired wastewater sampling design. *Sci Total Environ*, 902, pp. 165978.
- Lerminiaux, N. A. e Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol*, 65(1), pp. 34-44.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*, (63), pp. e3998.
- Machowska, A. e Stalsby Lundborg, C. (2018). Drivers of Irrational Use of Antibiotics in Europe. *Int J Environ Res Public Health*, 16(1), pp.

- Marutescu, L. G. *et al.* (2023). Wastewater treatment plants, an "escape gate" for ESCAPE pathogens. *Front Microbiol*, 14, pp. 1193907.
- Pärnänen, K. M. M. *et al.* (2019). Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. *Sci Adv*, 5(3), pp. eaau9124.
- Patel, A. *et al.* (2021). Physico-chemical and biological treatment strategies for converting municipal wastewater and its residue to resources. *Chemosphere*, 282, pp. 130881.
- Pazda, M. *et al.* (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems - A review. *Sci Total Environ*, 697, pp. 134023.
- Pires, J., Santos, R. e Monteiro, S. (2023). Antibiotic resistance genes in bacteriophages from wastewater treatment plant and hospital wastewaters. *Sci Total Environ*, 892, pp. 164708.
- PRISMA. (2020). PRISMA Checklist [Em linha]. [Consultado em 14/12/2023].
- Rocha, J. *et al.* (2019). Comparison of Culture- and Quantitative PCR-Based Indicators of Antibiotic Resistance in Wastewater, Recycled Water, and Tap Water. *Int J Environ Res Public Health*, 16(21), pp.
- Rout, P. R. *et al.* (2021). Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. *Sci Total Environ*, 753, pp. 141990.
- Silva, V. *et al.* (2022). High Frequency of the EMRSA-15 Clone (ST22-MRSA-IV) in Hospital Wastewater. *Microorganisms*, 10(1), pp.
- SIMDOURO. (2017). Tratamento de Águas Residuais [Em linha]. Disponível em <<https://www.simdouro.pt/dados.php?ref=tratamento-aguas-residuais>>. [Consultado em 16 janeiro].
- Sun, D. (2018). Pull in and Push Out: Mechanisms of Horizontal Gene Transfer in Bacteria. *Front Microbiol*, 9, pp. 2154.
- Uluseker, C. *et al.* (2021). A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Front Microbiol*, 12, pp. 717809.
- Wang, J. *et al.* (2015). Fate and proliferation of typical antibiotic resistance genes in five full-scale pharmaceutical wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*, 526, pp. 366-373.
- Wang, M. (2023). Editorial: Antimicrobial resistance dissemination and horizontal gene transfer. *Front Cell Infect Microbiol*, 13, pp. 1240680.
- Winter, M. *et al.* (2021). Antimicrobial resistance acquisition via natural transformation: context is everything. *Curr Opin Microbiol*, 64, pp. 133-138.
- Zheng, W. *et al.* (2020). Clinical class 1 integron-integrase gene - A promising indicator to monitor the abundance and elimination of antibiotic resistance genes in an urban wastewater treatment plant. *Environ Int*, 135, pp. 105372.