

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

**INVESTIGAÇÃO DE ENTEROBACTERIALES
RESISTENTES À COLISTINA EM ÁGUAS RESIDUAIS
DE ABATEDOURO AVÍCOLA: ASPECTOS
MICROBIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS**

HOSANA DAU FERREIRA DE SOUZA

2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**INVESTIGAÇÃO DE ENTEROBACTERIAES RESISTENTES À
COLISTINA EM ÁGUAS RESIDUAIS DE ABATEDOURO AVÍCOLA:
ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS**

HOSANA DAU FERREIRA DE SOUZA

Sob Orientação da Professora
Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho

e Coorientação Interna
Dra. Irene da Silva Coelho

e Coorientação Externa
Dr. Kayo Bianco

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em**
Ciências, no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Setembro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SS729i Souza, Hosana Dau Ferreira de , 03/02/1987-
Investigação de Enterobacterales resistentes à colistina em águas residuais de abatedouro avícola:
Aspectos microbiológicos e epidemiológicos / Hosana Dau Ferreira de Souza. - Seropédica, 2025.
71 f.: il.

Orientadora: Shana de Mattos de Oliveira Coelho.
Coorientadora: Kayo Bianco.
Coorientadora: Irene da Silva Coelho.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, 2025.

1. mcr. 2. plasmídeos IncX4. 3. polimixina. 4. saúde única. I. Coelho, Shana de Mattos de Oliveira, 1980-, orient. II. Bianco, Kayo, -, coorient. III. Coelho, Irene da Silva, -, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. V. Titulo.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 4917 / 2025 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.055898/2025-42

Seropédica-RJ, 25 de Setembro de 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

HOSANA DAU FERREIRA DE SOUZA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 25/09/2025

(Assinado digitalmente em 09/10/2025 10:51) (Assinado digitalmente em 26/09/2025 12:25)

RAMON LOUREIRO PIMENTA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.45)
Matrícula: ####378#6

SHANA DE MATTOS DE OLIVEIRA COELHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CORIN (12.28.01.49)
Matrícula: ###224#6

(Assinado digitalmente em 15/10/2025 15:30) (Assinado digitalmente em 06/10/2025 15:37)

MAYSA BEATRIZ MANDETTA CLEMENTINO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.307-#

DAYANNE ARAÚJO DE MELO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.547-#

(Assinado digitalmente em 27/09/2025 16:19)

KAYLANNE MONTENEGRO DA SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.687-#

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 4917, ano: 2025, tipo: ATA, data de emissão: 25/09/2025 e o código de verificação: 82ebdfdd8d

Dedico este trabalho aos meus filhos e família por sempre me apoiarem

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela oportunidade de viver, sentir, evoluir e amar. Aos meus filhos, Pedro e Vicente, por me tornarem uma pessoa melhor e por serem minha maior motivação para não desistir. À minha mãe e ao meu irmão, pelo apoio incondicional e confiança em cada etapa. Ao meu pai Ronaldo e à minha avó Lili, pelo amor, carinho e proteção (*in memoriam*).

À amiga Dayanne, por ter tornado possível o ingresso no doutorado. À minha orientadora, professora Shana, pela paciência, orientação e pela oportunidade de realizar este sonho. À professora Miliane Souza, pelo suporte, e à professora Irene Coelho, pelo apoio, carinho e incentivo ao longo desta jornada.

Ao amigo e coorientador Kayo, pela generosidade em compartilhar conhecimentos, pela orientação firme e pelos conselhos sempre construtivos. Ao professor Alexander, pela paciência e dedicação, e à professora Maysa, pelo acolhimento e ensinamentos.

Aos colegas do Labac e LabacVet, pelo apoio durante os trabalhos, e aos amigos Érico e Juliana, pelas conversas e cafés que tornaram os dias mais leves. À amiga Thereza, presente desde o mestrado, pelo companheirismo, escuta e apoio constantes.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Arqueas: Aninha, Flores, Kay, Vinicinho, Maiara, Samara, Hugo, Bruna, Mari, Motinha, Andressa, Paty, Aline e Renan, pela parceria e pela nossa “loucura coletiva”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante o doutorado.

Finalmente, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha trajetória acadêmica e pessoal.

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

RESUMO

SOUZA, Hosana Dau Ferreira. **Investigação de Enterobacterales resistentes à colistina em águas residuais de abatedouro avícola: Aspectos microbiológicos e epidemiológicos.** 56p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

A resistência à colistina representa uma grande ameaça à saúde global, comprometendo a eficácia de um dos antibióticos de último recurso para infecções causadas por Gram-negativos multirresistentes. Nos últimos anos, a detecção de variantes móveis dos genes *mcr* em ambientes associados à produção animal tem intensificado as preocupações quanto ao papel desses sistemas na manutenção e disseminação de determinantes de resistência. Este estudo teve como objetivo caracterizar Enterobacterales resistentes às polimixinas em águas residuais de um abatedouro avícola no município de São José do Vale do Rio Preto, RJ, Brasil. Entre setembro de 2021 e junho de 2022, foram realizadas quatro coletas em três pontos do sistema de tratamento (efluente bruto, tanque de floculação e efluente tratado). Um total de 140 cepas Gram-negativas foi recuperado, das quais 39 (27,8%) apresentaram resistência à colistina (CIM $\geq 2 \mu\text{g/mL}$). A análise molecular revelou a presença de genes *mcr-1* e *mcr-10* em 41% (16/39) dessas cepas. O gene *mcr-1* foi detectado em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp., enquanto o *mcr-10* foi identificado exclusivamente em membros do complexo *Enterobacter cloacae*. As análises de MLST evidenciaram a ocorrência de clones de importância clínica como *K. pneumoniae* ST15 e novos clones de interesse *Ent. bugandensis* ST3343, ambos recuperados em todos os pontos do sistema, inclusive no efluente tratado. Entre as cepas de *E. coli*, foram identificados sete diferentes STs, revelando a diversidade clonal e a persistência de cepas ao longo do tratamento. A análise filogenética pelo método de Clermont indicou que todas as cepas pertencem ao grupo E. O sequenciamento genômico completo mostrou a presença do plasmídeo IncX4 carregando *mcr-1* em *K. pneumoniae* ST15, além de múltiplos genes de resistência. Já a cepa de *Enterobacter* pertencente ao complexo *Enterobacter cloacae* foi identificada como sendo da espécie *vonholyi*, de acordo com a análise no TYGS, e apresentou *mcr-10* em associação com outros determinantes como *bla_{ACT}*, *oqxAB* e *fosa*. Este achado representa, à luz das evidências publicadas, o primeiro relato da presença de *mcr-10* em *Enterobacter* spp. no Brasil. Essas descobertas evidenciam que águas residuais de abatedouro avícola podem atuar como importantes reservatórios ambientais de genes de resistência, destacando a necessidade de vigilância integrada e regulamentação mais rigorosa do uso de colistina na produção animal, para mitigar a disseminação ambiental da resistência a antibióticos de último recurso.

Palavras-chave: *mcr*, plasmídeos IncX4, polimixina, saúde única.

ABSTRACT

SOUZA, Hosana Dau Ferreira. **Investigation of Colistin-Resistant Enterobacterales in Poultry Slaughterhouse Wastewater: Microbiological and Epidemiological Aspects.** 56p. Thesis (Doctor's in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Colistin resistance represents a major threat to global health, compromising the efficacy of one of the last-resort antibiotics for infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. In recent years, the detection of mobile *mcr* gene variants in environments associated with animal production has raised concerns about their role in the maintenance and dissemination of resistance determinants. This study aimed to characterize *Enterobacterales* resistant to polymyxins in wastewater from a poultry slaughterhouse located in São José do Vale do Rio Preto, Rio de Janeiro, Brazil. Between September 2021 and June 2022, four sampling campaigns were conducted at three points of the treatment system (raw effluent, flocculation tank, and treated effluent). A total of 140 Gram-negative isolates were recovered, of which 39 (27.8%) showed resistance to colistin ($\text{MIC} \geq 2 \mu\text{g/mL}$). Molecular analysis revealed the presence of *mcr-1* and *mcr-10* genes in 41% (16/39) of these isolates. The *mcr-1* gene was detected in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter spp.*, whereas *mcr-10* was identified exclusively in members of the *Enterobacter cloacae* complex. MLST analysis revealed the occurrence of clinically relevant clones such as *K. pneumoniae* ST15 and new clones of interest, including *Enterobacter bugandensis* ST3343, both recovered from all sampling points, including the treated effluent. Among *E. coli* isolates, seven distinct sequence types (STs) were identified, demonstrating clonal diversity and persistence throughout the treatment process. Phylogenetic analysis using the Clermont method showed that all *E. coli* strains belonged to phylogroup E. Whole-genome sequencing revealed the presence of an IncX4 plasmid carrying *mcr-1* in *K. pneumoniae* ST15, along with multiple antimicrobial resistance genes. The *Enterobacter* isolate belonging to the *E. cloacae* complex was identified as *E. vonhololyi* by TYGS analysis and harbored *mcr-10* in association with other resistance determinants, including *blaACT*, *oqxAB*, and *fosA*. To the best of our knowledge, this represents the first report of *mcr-10* in *Enterobacter spp.* in Brazil. These findings highlight that poultry slaughterhouse wastewater can serve as an important environmental reservoir of resistance genes, underscoring the need for integrated surveillance and stricter regulation of colistin use in animal production to mitigate the environmental dissemination of resistance to last-resort antibiotics.

Keywords: *mcr*, IncX4 plasmid, polymyxin, One Health.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pontos de coleta: P1- efluente bruto, P2 - pós tanque de floculação e P3 – efluente tratado.....	9
Figura 2. Triagem da suscetibilidade à colistina.....	11
Figura 3. Determinação da concentração inibitória mínima da colistina.....	12
Figura 4. Esquema para determinação de tipificação filogenética de <i>E. coli</i>	15
Figura 5. Distribuição das cepas de Enterobacteriales, com seus respectivos pontos de coleta	16
Figura 6. Distribuição das cepas de Enterobacteriales, resistentes à colistina, e seus respectivos pontos de coleta.....	18
Figura 7. Cepas resistentes à colistina, com suas respectivas CIMs do efluente bruto (P1)....	18
Figura 8. Cepas resistentes à colistina, com suas respectivas CIMs do tanque de floculação (P2).....	19
Figura 9. Cepas resistentes à colistina, com suas respectivas CIMs do tanque efluente tratado (P3).....	19
Figura 10. Cepas resistentes à colistina portadoras de gene <i>mcr</i> do efluente bruto (P1).....	21
Figura 11. Cepas resistentes à colistina portadoras de gene <i>mcr</i> do tanque de floculação (P2).	21
Figura 12. Cepas resistentes à colistina portadoras de gene <i>mcr</i> do efluente tratado (P3) ...	22
Figura 13. Distribuição global de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST15. Fonte.....	27
Figura 14. Distribuição temporal de registros de <i>K. pneumoniae</i> ST15 no mundo entre 1988 e 2025.	29
Figura 15. <i>Sequence types</i> (STs) de <i>E. coli</i> identificados no presente estudo, segundo dados do PubMLST.....	32
Figura 16. Representação circular do plasmídeo pCCVSU9999.....	36
Figura 17. Distribuição global do plasmídeo IncX4 em diferentes espécies bacterianas.....	38
Figura 18. Representação circular do cromossomo CCVSU9821.....	40

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Clados de <i>E. coli</i> : tipificação, local de isolamento e características associadas.	8
Quadro 2. Iniciadores específicos para detecção dos genes <i>mcr</i>	113
Quadro 3. Antimicrobianos testados e seus respectivos pontos de corte, segundo o BrCAST (2025).....	113

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas portadoras de gene <i>mcr</i>25
Tabela 2. Distribuição de cepas de <i>E. coli</i> portadoras do gene <i>mcr-1</i> por ST e ponto de coleta.....31

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

° C – graus Celsius

> – maior

≥ - maior ou igual

≤ - menor ou igual

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal

AMC - Amoxicilina com ácido clavulânico

AMH – Ágar Muller Hinton

AMI - Amicacina

BHI - *Brain Heart Infusion*

BRA - Bactérias Resistentes à Antimicrobianos

BrCAST – *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

CAMHB - Caldo Mueller-Hinton com ajuste de cátion

CC – Complexo Clonal

CCVSU - Coleção de Culturas de Vigilância em Saúde Única

CFE - Cefalexina

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIP - Ciprofloxacino

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CONAMA – Conselho Nacional Do Meio Ambiente

CPM – Cefepime

CRO - Ceftriaxona

CRX – Cefuroxima

EHEC - *Escherichia coli* Enterohemorrágica

EPEC - *Escherichia coli* Enteropatogênica Atípica

ERT - Ertapenem

ESBL – *Extended-Spectrum β-Lactamase*

ETE – Estação de Tratamento de Efluente

ExPEC – *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FOS - Fosfomicina

GEN - Gentamicina

GRA - Genes de Resistência a Antimicrobianos

h – Hora

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INEA – Instituto Nacional Do Ambiente

L – Litro

LMR/SBA Laboratório de Microrganismos de Referência/Setor de Bactérias e Arqueas

LPBP - Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários

LPS - Lipopolissacarídeo

m - Metro

MALDI-TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight MS*

MCR - *Mobile Colistin Resistance*

MDR - Multidroga resistentes

MER - Meropenem

mg - Miligrama

MLST - *Multilocus Sequence Typing*

mm – Milímetros

MRSA -*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

NaCl – Cloreto de Sódio

nm - Namômetro

NOR - Norfloxacino

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pH - Potencial Hidrogeniônico

POP – Procedimento Operacional Padrão

PPT - Piperacilina/tazobactam

RAM – Resistência Antimicrobiana

SNC – Sistema Nervoso Central

ST - *Sequence Type*

SUT - Sulfametoxazol/trimetoprima

THG - Transferência Horizontal de Genes

TSA - Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

V - Volts

VF – *Virulence Factor*

µg – Micrograma

µL - Microlitro

SUMÁRIO

1

INTRODUÇÃO.....

Erro! Indicador não definido.

2 REVISÃO DE LITERATURA.....3

2.1 Produção Avicola e o Uso de Antimicrobianos.....**Erro! Indicador não definido.**

2.2 Gestão de Resíduos na Produção Animal e Disseminação de Bactérias Resistentes a Antimicrobianos.....3

2.3 Resistência aos Antimicrobianos.....5

2.4 Resistência à Polimixina em Enterobacteriales: Panorama Atual.....**Erro! Indicador não definido.**

2.5 Tipificação Molecular.....**Erro! Indicador não definido.**

3 MATERIAL E MÉTODOS.....

.....**Erro! Indicador não definido.**

3.1 Coleta e Amostragem.....9

3.2 Isolamento e Identificação.....**Erro! Indicador não definido.**

3.3 Teste de Triagem.....**Erro! Indicador não definido.**

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Polimixina.....
Erro! Indicador não definido.

3.5 Pesquisa de Genes *mcr* pela PCR.....12

3.6 Determinação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos.....
Erro! Indicador não definido.

3.7 Análise da Relação Clonal.....
Erro! Indicador não definido.

3.7.1	Tipificação filogenética por MLST.....	
Erro! Indicador não definido.		
3.7.2	Tipificação filogenética de	E.
<i>coli</i> Erro! Indicador não definido.		
3.8	Sequenciamento Genômico e Análise Bioinformática.....	
Erro! Indicador não definido.		
4	RESULTADOS E DISCUSSAO.....	
Erro! Indicador não definido.		
4.1	Isolamento e Identificação.....	
Erro! Indicador não definido.		
4.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Polimixina.....	
Erro! Indicador não definido.		
4.3	Detecção de Genes <i>mcr</i>	20
4.4	Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Linhagens Carreando genes <i>mcr</i>	
.....23		
4.5	Análise da Relação Clonal.....	
Erro! Indicador não definido.		
4.5.1	<i>K. pneumoniae</i> carreando <i>mcr-1</i>	
Erro! Indicador não definido.		
4.5.2	<i>Enterobacter</i> spp. carreando <i>mcr-10</i> e <i>mcr-1</i>	30
4.5.3	<i>E. coli</i> carreando <i>mcr-1</i>	31
4.5.4	Tipificação filogenética de	E.
<i>coli</i> Erro! Indicador não definido.		
4.6	Sequenciamento	
Genômico..... Erro! Indicador não definido.		
4.6.1	<i>K. pneumoniae</i> carreando <i>mcr-1</i>	
Erro! Indicador não definido.		
4.6.2	<i>Enterobacter</i> spp. carreando <i>mcr-10</i>	39
5	CONCLUSÕES.....	
Erro! Indicador não definido.		
6	REFERÊNCIAS.....	
Erro! Indicador não definido.		

7	ANEXOS.....	55
---	--------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

A avicultura desempenha um papel crucial na economia global, servindo como uma das principais fontes de proteína animal acessível e de alta qualidade. No Brasil, essa atividade assume uma relevância ainda maior, posicionando o país como um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango do mundo. Além disso, a carne de frango é a proteína animal mais consumida pelos brasileiros, devido ao seu custo-benefício (ABPA, 2025).

No entanto, a produção avícola apresenta um grande potencial poluidor, pois o abate, processamento e higienização consomem grandes volumes de água, variando de 5.000 a 21.000 L por tonelada de carne. Esse processo gera águas residuais ricas em patógenos entéricos e matéria orgânica, como fibras, proteínas e gorduras. Além disso, esses efluentes podem conter resíduos de antimicrobianos, detergentes e desinfetantes usados na medicina veterinária. O descarte inadequado das águas residuais pode causar poluição ambiental e riscos à saúde humana. Para melhorar as taxas de crescimento e maximizar a eficiência da produção, o uso de antimicrobianos na ração ou na água, como medida profilática pode ser amplamente adotado para prevenir infecções bacterianas, especialmente por espécies da ordem Enterobacteriales, naturalmente presentes no trato gastrointestinal de frangos (Savin *et al.*, 2022).

Sabe-se, contudo, que esse uso extensivo e, por vezes, indiscriminado de antimicrobianos na agricultura, pecuária e em outras atividades de produção de proteína animal, bem como na Medicina Humana e Veterinária, tem acelerado o processo natural de desenvolvimento da resistência antimicrobiana. Em 2016, Jim O'Neill publicou o relatório “Review on Antimicrobial Resistance” alertando para a probabilidade de um aumento dos índices globais de resistência antimicrobiana para alarmantes 10 milhões de casos em 2050, com significativos gastos públicos na ordem de US\$100 trilhões. Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou a primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos, destacando 12 famílias de bactérias que representam uma ameaça significativa à saúde humana. A iniciativa visou combater a crescente resistência global aos antimicrobianos. No ano de 2024, foram incluídas 15 famílias de patógenos resistentes a antibióticos, classificados em três níveis de prioridade: crítico, alto e médio. Dentre esses patógenos com ênfase especial nas bactérias Gram-negativas multirresistentes, como as Enterobacteriales resistentes a cefalosporinas de 3^a geração e carbapenemases, principalmente, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, foram categorizadas como de importância crítica.

Entre os antimicrobianos mais administrados na avicultura, a colistina é frequentemente utilizada no tratamento de infecções bacterianas, especialmente causadas por microrganismos Gram-negativos (Kempf *et al.*, 2013). Classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos antimicrobianos de maior prioridade e importância crítica para a saúde humana (Gehring; Mochel; Schmerold, 2023). A colistina, pertencente ao grupo das polimixinas, é um peptídeo poliacatônico que interage com as cargas negativas do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa de bactérias Gram-negativas, deslocando íons divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) responsáveis pela estabilidade da membrana. Essa interação leva à ruptura da membrana e consequente morte celular (Quiroga, 2019; Mendes, 2009).

Estudos indicam, entretanto, que além desse mecanismo principal, as polimixinas podem atuar por vias adicionais ainda não totalmente elucidadas (Brodgen, 2005; Mogi, 2009). Entre essas, destaca-se a possível inibição da respiração bacteriana por meio da enzima NDH-2 oxidoreductase (Deris *et al.*, 2013). Além de sua potente atividade bactericida, a colistina também apresenta efeito anti-endotoxina, ao se ligar ao lipídio A do LPS, reduzindo os níveis séricos de endotoxina e TNF- α (Gough, 1996; Falagas, 2005).

Em contrapartida, diversas bactérias desenvolveram mecanismos de resistência, como a modificação do LPS para reduzir a carga negativa, o aumento da expressão de bombas de efluxo e a formação de cápsulas protetoras. Mais recentemente, a disseminação da resistência mediada por genes móveis *mcr*, transmitidos por plasmídeos, tem se tornado um desafio crescente no tratamento de infecções humanas complexas (Li *et al.*, 2022a; Mondal *et al.*, 2024a).

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos capazes de se replicar independentemente do DNA cromossômico e de se transferir entre bactérias por meio de conjugação. Essa mobilidade permite a disseminação rápida de genes de resistência entre diferentes espécies e gêneros bacterianos, favorecendo a adaptação a ambientes com pressão seletiva de antimicrobianos. Diversos plasmídeos, como os dos grupos incompatíveis IncI2, IncX4 e IncHI2, têm sido frequentemente associados à disseminação dos genes *mcr* em Enterobacteriales isoladas de humanos, animais e efluentes (Matamoros *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2020).

Os genes *mcr* facilitam a transferência horizontal de resistência entre linhagens de Enterobacteriales, podendo reduzir a suscetibilidade à colistina (Xu *et al.*, 2022a). O *mcr-1* foi o primeiro gene plasmidial de resistência à colistina identificado, sendo relatado pela primeira vez na China, em 2015, em *E. coli* (Liu *et al.*, 2016). Sua rápida disseminação global foi detectada em bactérias oriundas de humanos, animais e do meio ambiente (Wang *et al.*, 2020a).

Este estudo teve como objetivo pesquisar Enterobacteriales resistentes à colistina em efluentes de um abatedouro avícola em São José do Vale do Rio Preto, Rio de Janeiro. Além disso, visou identificar a presença dos genes *mcr* e realizar a caracterização clonal das linhagens, contribuindo para a compreensão da disseminação da resistência bacteriana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção Avícola e o Uso de Antimicrobianos

A avicultura ocupa um papel de destaque nas diretrizes sociais e econômicas do Brasil, caracterizando-se pela diversidade de raças, sistemas de produção otimizados, altos índices de produtividade e rigoroso controle sanitário (Schmidt & da Silva, 2018). Esses fatores são influenciados tanto pelas particularidades de cada região geográfica quanto pelas demandas do mercado consumidor. A carne de frango é a fonte de proteína mais consumida no Brasil e a segunda mais consumida no mundo. Esse alto consumo está associado à sua qualidade nutricional, preço acessível e versatilidade no preparo (Gregório *et al.*, 2020).

Desde a Revolução Agrícola, há cerca de 1.200 anos, as galinhas têm sido criadas em todo o mundo para a produção de carne e ovos. Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a produção global de carne de aves aumentou de 83,3 para 103,4 milhões de toneladas na última década, e a expectativa é de um crescimento adicional de 131% entre 2019 e 2050. Em 2023, os principais produtores de carne de frango foram os Estados Unidos (20%), a China (14%) e o Brasil (14%) (Kober *et al.*, 2024).

No Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2025), a produção atingiu 14,972 milhões de toneladas em 2024, exportou 5,294 milhões de toneladas, gerando um valor bruto de R\$ 91,6 bilhões em valor do produto de produção, reforçando a posição do país como um dos principais produtores e exportadores mundiais. A crescente demanda por aves exige esforços contínuos para garantir a segurança alimentar. Atualmente, não se trata apenas de disponibilizar carne de frango em larga escala, mas também de assegurar a sustentabilidade da produção e a preservação da saúde humana (Kober *et al.*, 2024).

Para garantir a produtividade e a saúde das aves, o uso de antimicrobianos tem sido uma prática comum na avicultura. Esses compostos podem ser utilizados tanto para tratamento e prevenção de infecções bacterianas, especialmente por Enterobacteriales, naturalmente presentes na microbiota de galinhas, quanto como promotores de crescimento (Kipper *et al.*, 2022; Pilati *et al.*, 2024). Entretanto, o uso indiscriminado desses medicamentos tem levantado preocupações sobre a resistência antimicrobiana, um fenômeno que pode comprometer a eficácia dos antibióticos tanto na medicina veterinária quanto na humana (Chen *et al.*, 2025). Os antibióticos mais frequentemente usados no setor avícola, incluem tetraciclina, colistina, ciprofloxacino, tilosina, neomicina, amoxicilina, trimetoprima, sulfonamidas, doxiciclina, eritromicina e tiamulina (Islam *et al.*, 2024).

Estima-se que a pecuária seja responsável por 70% do consumo global de antibióticos, com projeções indicando um aumento para 107.472 toneladas até 2030. Aproximadamente 73% desses antimicrobianos são utilizados na produção animal, sendo a China, o Brasil, a Índia, os Estados Unidos e a Austrália os principais consumidores, representando juntos 58% do uso global (Chen *et al.*, 2025). Diante desse cenário, medidas regulatórias têm sido adotadas em diversos países para restringir ou proibir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, visando mitigar os riscos à saúde pública (Islam *et al.*, 2024).

2.2 Gestão de Resíduos na Produção Animal e a Disseminação de Bactérias Resistentes a Antimicrobianos

A crescente produção mundial de carne de frango, que deve dobrar até 2050, aumenta significativamente a geração de águas residuais nos abatedouros (Savin *et al.*, 2021). Os abatedouros estão entre as maiores fontes de corpos d'água poluídos, especialmente nos países em desenvolvimento (Zanol *et al.*, 2024). O tratamento de águas residuais influencia

diretamente a qualidade microbiológica das águas superficiais. A maioria das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) é projetada principalmente para remover matéria orgânica, o que, consequentemente, contribui também para a redução da carga de patógenos presentes (Diallo *et al.*, 2013a).

O tratamento de águas residuais em ETEs é classificado em três níveis: primário (remoção de sólidos), secundário (degradação biológica de compostos orgânicos) e terciário (tratamento químico). A maioria das ETEs atinge apenas o tratamento secundário, que reduz significativamente a carga orgânica e permite o descarte do efluente em corpos hídricos (Branco *et al.*, 2021).

No contexto normativo brasileiro, a Resolução CONAMA nº 430/2011 estabelece os critérios técnicos e operacionais para o lançamento de efluentes líquidos em corpos hídricos. Segundo o Artigo 16 dessa resolução, o lançamento direto de efluentes provenientes de fontes potencialmente poluidoras somente é permitido quando atendidos, de forma simultânea, os padrões e condições estabelecidos na legislação vigente. No âmbito estadual, as unidades federativas dispõem de normativas complementares, instituídas por seus respectivos órgãos ambientais. No Estado do Rio de Janeiro, essa atribuição é responsabilidade do Instituto Estadual do Ambiente (INEA), que regula e fiscaliza os parâmetros para o lançamento de efluentes industriais, incluindo aqueles oriundos do abate e processamento de aves.

Destaca-se, nesse contexto, a Norma Operacional NOP-INEA-45, que define os procedimentos e limites específicos aplicáveis ao lançamento de efluentes industriais. Essa norma contempla parâmetros como carga orgânica, sólidos suspensos totais, pH, óleos e graxas, além de indicadores associados ao potencial de eutrofização e à toxicidade ambiental. O atendimento a essas exigências é imprescindível para a concessão da outorga de lançamento e da licença ambiental de operação, assegurando a proteção dos corpos receptores e a manutenção da qualidade ambiental.

Esses efluentes, ricos em carga orgânica e microbiológica, contêm patógenos, resíduos de antimicrobianos, detergentes e desinfetantes. Na avicultura, os resíduos impactam solo, ar e água, comprometendo o meio ambiente e a saúde humana. Além disso, as águas residuais dos abatedouros são importantes reservatórios de bactérias resistentes a antibióticos, que não são completamente removidas pelos tratamentos convencionais (Savin *et al.*, 2021).

Águas residuais podem contribuir significativamente para a disseminação BRA por meio da transferência horizontal de genes (THG). Esse processo ocorre entre bactérias por conjugação, transformação ou transdução, sendo a conjugação a forma mais provável nesse contexto, facilitada pela transferência de plasmídeos. A aquisição de um único plasmídeo pode conferir resistência múltipla a medicamentos, agravando o problema (Nguyen *et al.*, 2021).

Além de microrganismos resistentes e genes associados à RAM, as águas residuais frequentemente contêm contaminantes emergentes, incluindo antioxidantes, metais pesados e resíduos de antibióticos. Estes últimos, comumente utilizados na prevenção e no tratamento de infecções bacterianas, são frequentemente administrados em excesso, tanto para estimular o crescimento quanto para prevenir doenças nos sistemas de produção avícola (Xiao *et al.*, 2024).

O tratamento inadequado de efluentes em abatedouros favorecem a liberação de bactérias do grupo ESKAPE (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) e *Escherichia coli*., incluindo cepas resistentes à carbapenêmicos e colistina (Savin *et al.*, 2020a). Nesse contexto, intensificam-se a relevância e a necessidade de estudos aprofundados sobre os mecanismos de disseminação da resistência aos antimicrobianos.

2.3 Resistência aos Antimicrobianos

A resistência antimicrobiana configura-se como uma série ameaça à saúde pública global, cujo avanço tem se intensificado de forma alarmante nas últimas décadas. Em 2016, Jim O'Neill, por meio do relatório *Review on Antimicrobial Resistance*, destacou projeções críticas, alertando para o risco de uma pandemia impulsionada por infecções causadas por microrganismos resistentes. Além de ocasionar graves impactos econômicos globais, considerando os custos diretos com tratamentos, as perdas decorrentes da redução da produtividade e o aumento da pressão sobre os sistemas de saúde. O surgimento de resistência é uma resposta natural evolutiva à exposição antimicrobiana uma vez que ao longo de milhares de anos, fungos e bactérias ambientais desenvolveram mecanismos complexos para evitar a sua destruição (Salam *et al.*, 2023a).

Porém sabe-se que este processo natural pode ser acelerado por fatores como o uso excessivo de antimicrobianos como o emprego de forma indiscriminada na agricultura, pecuária e em outras atividades de produção de proteína animal, além do uso terapêutico e profilático na medicina humana e veterinária. Todas estas práticas aceleram a seleção de bactérias resistentes que são disseminadas no ambiente e podem voltar a contaminar homens e animais, perpetuando um círculo vicioso (Holmes *et al.*, 2016).

Em fevereiro de 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos apresentando 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana, classificando-as em três níveis: crítico, alto e médio (WHO, 2017). Em 2024, a Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários (LPBP) foi atualizada, a nova versão incorpora dados mais recentes e adota uma perspectiva sistêmica, considerando a complexidade dos determinantes clínicos, epidemiológicos e moleculares da resistência. Em comparação à edição de 2017, a nova LPBP reflete progressos no entendimento dos aspectos epidemiológicos e moleculares da RAM, e introduz uma reorganização criteriosa dos patógenos prioritários com base em sua carga de morbimortalidade e impacto global (Sati *et al.*, 2025).

Entre as principais atualizações da LPBP, destacam-se a inclusão de *Mycobacterium tuberculosis* resistente à rifampicina e de *Streptococcus pneumoniae* resistente a macrolídeos; o reconhecimento da relevância de *Salmonella enterica* sorotipo Typhi, *Shigella spp.* e *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a fluoroquinolonas, especialmente em países de baixa e média renda, onde esses patógenos apresentam elevada carga de doença; além da manutenção de bacilos Gram-negativos multirresistentes, como *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos, e *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas de terceira geração, no nível mais alto de prioridade (Moore, 2025). Esses microrganismos possuem múltiplos mecanismos de resistência, como a produção de ESBLS e carbapenemases, além de elevada capacidade de disseminação por transferência horizontal de genes, especialmente em regiões com infraestrutura sanitária precária (Caliskan-Aydogan; Alocilja, 2023).

As polimixinas, especialmente a colistina (polimixina E), são consideradas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos (Mendes; Burdmann, 2009). As polimixinas formam um grupo de antibióticos com potente atividade contra bactérias gram-negativas, sendo produzidas por cepas de *Bacillus polymyxa* e descritas pela primeira vez em 1947 (Mondal *et al.*, 2024b). O grupo é composto por cinco variantes estruturalmente relacionadas, polimixinas A, B, C, D e E (Gallardo-Godoy *et al.*, 2016). Dentre essas, apenas as polimixinas B e E são utilizadas na prática clínica, devido à elevada toxicidade apresentada pelas demais (El-Sayed Ahmed *et al.*, 2020). As polimixinas foram amplamente utilizadas até meados da década de 1980, quando seu uso foi descontinuado em humanos, devido a nefotoxicidade, e, passou a ser administrado

na produção animal como promotor de crescimento (Mmatli; Mbelle; Sekyere, 2022a). Apesar de sua reintrodução relativamente recente na prática clínica, motivada pelo aumento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, a resistência às polimixinas já representa um desafio significativo para a saúde pública (Falagas *et al.*, 2010).

2.4 Resistência à Polimixina em Enterobacteriales: Panorama Atual

Com o aumento expressivo de bactérias produtores de carbapenemases, a colistina foi reintegrada à prática clínica como uma das últimas opções terapêuticas (Andrade *et al.*, 2020; Azzopardi *et al.*, 2013; Biswas *et al.*, 2012; Falagas; Kasiakou, 2006). No entanto, o surgimento contínuo de cepas resistentes à colistina impõe sérios desafios à terapêutica, reduzindo drasticamente as opções antimicrobianas disponíveis para tratar infecções potencialmente fatais, e destacando a necessidade urgente de novas estratégias terapêuticas e desenvolvimento de antimicrobianos (Velkov *et al.*, 2010).

A resistência pode ocorrer de duas formas: resistência intrínseca, geralmente associada a características genéticas naturais da espécie bacteriana, frequentemente relacionadas a mutações genéticas, sendo fenotipicamente expressa por concentrações inibitórias mínimas (CIMs) próximas aos pontos de corte clínicos; e resistência adquirida, que ocorre quando microrganismos originalmente suscetíveis desenvolvem mecanismos de resistência em resposta à exposição contínua ou subinibitória ao agente antimicrobiano, resultando em elevação significativa das CIMs (Girardello *et al.*, 2012; Nation; Li, 2009).

Do ponto de vista molecular, embora os mecanismos de resistência à colistina ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que, na maioria dos casos, envolvem modificações na membrana externa da bactéria. Dentre as estratégias mais relatadas estão: a modificação do LPS, com inserção de grupos catiônicos como a fosfoetanolamina no lipídeo A, reduzindo a carga negativa da membrana e, consequentemente, diminuindo a afinidade da colistina; perda completa do LPS, eliminando o alvo da droga; aumento da produção da cápsula polissacarídica, dificultando o acesso do antibiótico à membrana; liberação de vesículas de membrana que atuam como armadilhas para a colistina; além de alterações em porinas e ativação de bombas de efluxo (Aghapour *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2014; Landman *et al.*, 2008; Nation; Li, 2009; Poirel; Jayol; Nordmanna, 2017).

Até 2015, considerava-se que a resistência à colistina estava restrita ao âmbito cromossômico, sendo transmitida verticalmente entre células bacterianas da mesma linhagem. Contudo, esse entendimento mudou com a descrição, na China, do gene *mcr-1* (*mobile colistin resistance*), que codifica uma enzima plasmidial do tipo fosfoetanolamina transferase capaz de modificar o lipídeo A, conferindo resistência ao antibiótico (Liu *et al.*, 2016). A identificação dessa forma de resistência móvel gerou grande preocupação, por permitir a transmissão horizontal entre diferentes espécies bacterianas, inclusive em ambientes não hospitalares (Anyanwu *et al.*, 2021; Rebelo *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020a)

Até o momento, dez variantes do gene *mcr* foram descritas em várias espécies de *Enterobacteriaceae*, principalmente em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp. A disseminação global desses genes é extensa, com presença confirmada em mais de 70 países. A China lidera em diversidade, com até oito variantes diferentes detectadas, seguida por Tailândia, Colômbia, Camboja, Brasil, Bélgica e Bangladesh, que abrigam múltiplas variantes (entre três e seis). Outros países como Estados Unidos, Turquia, Espanha, Nigéria, Coreia do Sul, Japão, Itália, França, Inglaterra e República Tcheca também relataram a presença de diversos tipos de *mcr*. A disseminação dos genes *mcr* está fortemente relacionada ao uso indiscriminado de colistina na agropecuária, sendo amplificada por plasmídeos conjugativos, como os do tipo IncHI2 (Mmatli; Mbelle; Sekyere, 2022b; Zhang *et al.*, 2021).

No Brasil, o primeiro relato da presença de bactérias da ordem Enterobacteriales portadoras do gene *mcr-1* ocorreu em 2016, em cepas de *E. coli* isoladas de amostra clínica humana na região Nordeste. Desde então, múltiplos estudos têm documentado a ocorrência de outros genes da família *mcr*: *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-7*, em diferentes estados brasileiros. Esses genes têm sido detectados em uma ampla variedade amostras, como animais domésticos, carcaças e carne de frango, suínos, perus, golfinhos, aves silvestres e amostras humanas (Costa-Júnior *et al.*, 2023).

A detecção de clones endêmicos de Enterobacteriales representa um risco significativo à saúde pública, tornando essencial a vigilância epidemiológica baseada em ferramentas moleculares, como a tipificação por MLST (Multilocus Sequence Typing) e a classificação filogenética pelo método de Clermont. Essas abordagens permitem o mapeamento de clones de alto risco, reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como prioridade crítica, devido ao seu potencial de disseminação intersetorial. Reforçando, a necessidade de estratégias integradas sob a perspectiva de Uma só Saúde (One Health), como o uso racional de antimicrobianos, o fortalecimento das medidas de biossegurança e a substituição da colistina na produção animal (Anyanwu *et al.*, 2023; De Koster *et al.*, 2024)

2.5 Tipificação Molecular

A tipificação molecular constitui uma ferramenta essencial para a caracterização genética de microrganismos patogênicos, permitindo a análise detalhada de suas relações epidemiológicas e contribuindo para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de infecções. Essa abordagem é amplamente empregada na investigação de surtos e epidemias, tanto em ambientes comunitários quanto hospitalares, bem como no monitoramento de infecções endêmicas (Regua-Mangia, 2015).

A caracterização de isolados com altaqadro resolução é fundamental em estudos epidemiológicos, sendo a MLST amplamente reconhecida como método de referência para tipificação bacteriana. Essa técnica analisa múltiplos loci de genes conservados, integrando informações derivadas de transferência genética vertical e horizontal, com elevada reprodutibilidade e portabilidade. O uso de bancos de dados online, como o PubMLST, padroniza a nomenclatura e possibilita a comparação global de isolados, auxiliando na investigação de surtos, no monitoramento de linhagens e na compreensão da evolução bacteriana (Maiden *et al.*, 2013).

Embora o MLST seja amplamente empregado para a tipificação de *E. coli*, o conhecimento do *sequence type* (ST) de uma cepa não fornece, de forma direta, informações sobre sua afiliação a um filogrupo. Os filogrupos refletem a trajetória evolutiva das cepas, indicando o surgimento de novas características a partir de um ancestral comum. Sua determinação permite classificar *E. coli* com base em atributos genéticos e fenotípicos, como nicho ecológico, provável origem fecal, adaptações específicas e potencial de virulência, conforme demonstrado no quadro 1 (Clermont; Gordon; Denamur, 2015).

Com esse objetivo, Clermont e colaboradores desenvolveram, no ano 2000, um método de PCR baseado na presença ou ausência dos genes *chuA* e *yjaA*, e do fragmento *TspE4.C2*, capaz de classificar *E. coli* em quatro filogrupos principais (A, B1, B2 e D), apresentando alta concordância com as classificações obtidas por MLST. Posteriormente, com o avanço das análises genômicas, foi identificado um número maior de filogrupos. Assim, em 2013, o método foi refinado para um PCR quadruplex, com a inclusão do gene *arpA* e de dois PCRs alelo-específicos, permitindo a delimitação de sete filogrupos: A, B1, B2, C, D, E e F (Clermont; Bonacorsi; Bingen, 2000; Clermont *et al.*, 2013).

Quadro 1. Clados de *E. coli*: tipificação, local de isolamento e características associadas

Clermont Type / Clade	Local de Isolamento Típico	Associação Principal	Informações Adicionais
A	Intestino humano e animal, ambiente	Humano e animal	Baixa virulência; geralmente comensal; resistência variável.
B1	Intestino animal, ambiente	Animal e ambiente	Algumas cepas patogênicas (ETEC, STEC); resistência comum.
B2	Urina, sangue, SNC (humanos)	Humano	Alta virulência (UPEC, ExPEC); resistência crescente.
C	Intestino humano e ambiente	Humano e ambiente	Geralmente comensal; baixa virulência; resistência variável.
D	Intestino, urina, sangue	Humano	Virulência intermediária; comum em ITU; resistência variável.
E	Humanos e animais	Misto	Pode conter STEC e outras cepas; resistência variável.
F	Humanos e animais	Misto (com foco em humano)	Associado a ExPEC; virulência alta; resistência frequente.
G	Humanos e animais	Misto	Novo grupo com genes de virulência; resistência moderada.
Clade I	Solo, água, intestino animal selvagem	Ambiente/Animal	Pouco virulento; resistência ambiental observada.
Clade II	Ambiente e intestino de animais	Ambiente/Animal	Semelhante ao Clade I; baixa virulência.
Clade III	Ambiente (águas superficiais)	Ambiente	Críptico; não patogênico; possível reservatório de resistência.
Clade IV	Ambiente	Ambiente	Resistência ambiental.
Clade V	Ambiente, esgoto	Ambiente	Perfil distinto; potencial resistência a múltiplos fármacos.
Clade VI	Raramente isolado	Ambiente	Pouco caracterizado; papel ecológico desconhecido.

Fonte: Clermont *et al.*, 2015.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e Amostragem

Foram realizadas quatro coletas entre setembro de 2021 e junho de 2022, nos pontos identificados como: P1- efluente bruto, P2 - pós tanque de floculação e P3 – efluente tratado (Figura 1), em um abatedouro no município de São José do Vale do Rio Preto, situado na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, área onde ocorre o deságue do rio Preto. O município configura-se como o principal polo de produção avícola em nível regional, concentrando aproximadamente 100 unidades de criação intensiva. A região também é caracterizada por expressiva atividade agrícola, com destaque para o cultivo de hortaliças como, chuchu, abobrinha, berinjela e pepino, destinadas majoritariamente ao abastecimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Adicionalmente, a área de estudo abriga remanescentes de Mata Atlântica, bioma tropical megadiverso e prioritário para a conservação, protegido por unidades de conservação de diferentes esferas administrativas, as quais desempenham papel essencial na preservação da biodiversidade e dos recursos hídricos regionais (Parente *et al.*, 2019).

As amostras foram coletadas em recipiente estéril de vidro no volume de 2 litros por amostra, transportadas ao Laboratório de Microrganismos de Referência/INCQS/Fiocruz para o processo de filtração e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para processamento fenotípico das colônias.

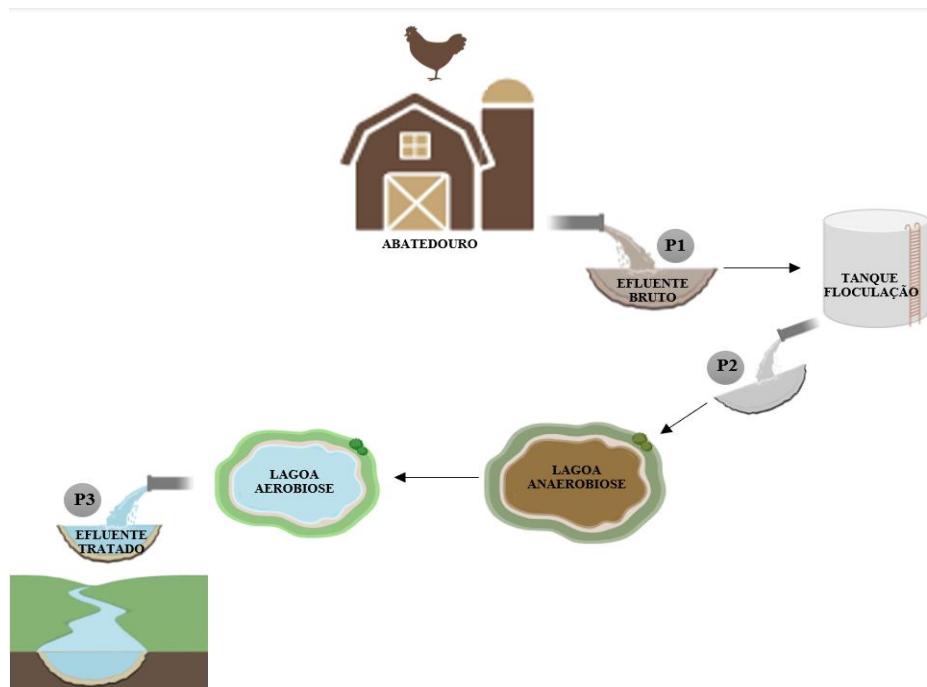


Figura 1. Pontos de coleta: P1- efluente bruto, P2 - pós tanque de floculação e P3 – efluente tratado.

3.2 Isolamento e Identificação

As amostras foram concentradas em membranas de 0,22 µm, através do processo de filtração à vácuo, inoculadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a 35 °C ± 1 °C por 18 a 24 h. Após esse período, com auxílio de alça de platina, alíquotas do caldo BHI foram semeadas em meios seletivos para bactérias Gram-negativas (ágar MacConkey - HiMedia® e ágar Eosina Azul de Metileno - HiMedia®). As placas foram incubadas em estufa a 35 °C ± 1 °C por 18 a 24 h. Após o crescimento, foram isoladas colônias com diferentes características morfológicas.

As colônias bacterianas selecionadas foram submetidas a espectrometria de massa como fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz - MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e o analisador de massas do tipo tempo-de-voo- TOF (Time-of-Flight), que permite a comparação do espectro de massas de um microrganismo com os espectros de referência de cepas conhecidas, possibilitando a classificação e identificação com mais rapidez e acurácia do que os métodos convencionais (Angeletti, 2017; Cherkaoui *et al.*, 2010).

Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker – Billerica, EUA) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionado 1 µL ácido fórmico 70% (Sigma-Aldrich®). Em seguida, 1 µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetona 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser de 337nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker®). Os espectros foram coletados na faixa de massa entre 2.000 e 20.000 m/s e, posteriormente, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, sendo que quanto maior o valor na escala, mais confiável é a identificação. Considerou-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentaram valores ≥ 2.000, indicando, de acordo com o FlexControl software 3.3, como uma identificação segura de gênero e provável de espécie (Rodrigues *et al.*, 2017). Este método foi realizado em parceria com o Instituto Nacional de Doenças Infecciosas/Fiocruz.

3.3 Teste de Triagem

Os isolados foram submetidos ao teste de triagem, que teve como objetivo a detecção da suscetibilidade à colistina (polimixina E). Para isso, foi utilizada a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo, considerando a tabela de pontos de corte para resistência segundo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BRCAST, 2025).

Inicialmente, os isolados foram previamente cultivados em ágar Mueller-Hinton (MH). Para o preparo da placa de 96 poços (figura 2), em um microcubo foi produzida uma solução estoque de 2560 µg/mL de colistina e, então, transferido 12,5 µL da solução estoque para 4 mL de caldo Mueller-Hinton com ajuste de cátion (CAMHB). A distribuição nos poços se deu com a aplicação de 100 µL de CAMHB sem antimicrobiano em todos os poços das colunas: 1, 3, 5, 7, 9 e 11 e, 100 µL do tubo contendo meio CAMHB com polimixina em todo os poços das colunas: 2, 4, 6, 8, 10 e 12. A preparação do inóculo foi feita partir da cultura pura, onde uma alçada foi inserida em solução salina (NaCl 0,5%), com turbidez a 2 McFarland ($6,0 \times 10^8$ células/mL) para a obtenção de uma suspensão padronizada com o auxílio do densitômetro para a leitura da turvação Densitômetro Densichek Plus ou similar. O inóculo então foi aplicado em todos os poços e as placas foram incubadas em estufa a 35 °C ± 1,0 °C por 18 hrs ± 2 hrs.

Após o período de incubação, o crescimento microbiano é registrado como “C” (crescimento) ou “Ø” (ausência de crescimento). Os poços com crescimento ficaram na coloração rosada devido a solução reveladora adicionada. Como controles positivo e negativo do teste, foram utilizadas cepas provenientes da CCVSU (Setor de Arqueas do Laboratório de Microrganismos de Referência – INCQS/Fiocruz).

A padronização do ensaio resultou na elaboração do Procedimento Operacional Padrão (POP) 65.3230.079 do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz).

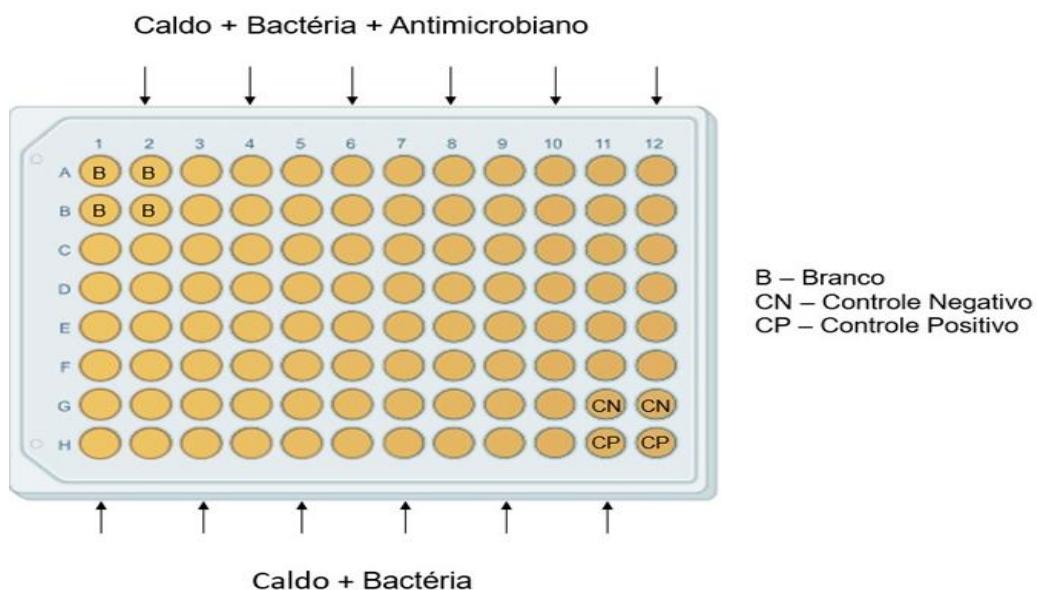


Figura 2. Triagem da suscetibilidade à colistina.

3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Polimixina

A concentração inibitória mínima (CIM) à colistina dos isolados foi determinada seguindo as orientações do BrCAST (BrCAST, 2025). A microdiluição em caldo foi realizada em placa de 96 poços, com CAMHB, contendo diluições seriadas de sulfato de colistina nas seguintes concentrações: 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 e 512 µg/mL.

Para cada isolado, foi preparada uma suspensão bacteriana em tubo contendo 3 mL de solução salina 0,5% (NaCl), na escala 2 de McFarland ($6,0 \pm 10^8$ células/mL) com o auxílio do densitômetro para a leitura da turvação (Densitômetro Densichek Plus ou similar. Após o ajuste da suspensão bacteriana, foi diluído 2 µL do inóculo, em microtubo contendo 1998 µL de CAMHB para obter uma solução com concentração $9,0 \pm 10^5$ células/mL. Foram distribuídos 100 µL da suspensão ajustada nos poços contendo as diluições seriadas, descritas anteriormente, sendo a placa selada e incubada a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 h. Após 24 horas de incubação, foi adicionada uma solução reveladora para leitura do crescimento microbiano, onde os poços com crescimento, apresentaram coloração rosa, conforme ilustrado na figura 3. Como controle foram utilizadas a cepa sensível *Escherichia coli* WDCM 00013 e a cepa resistente *Escherichia coli* CCVSU 7107.

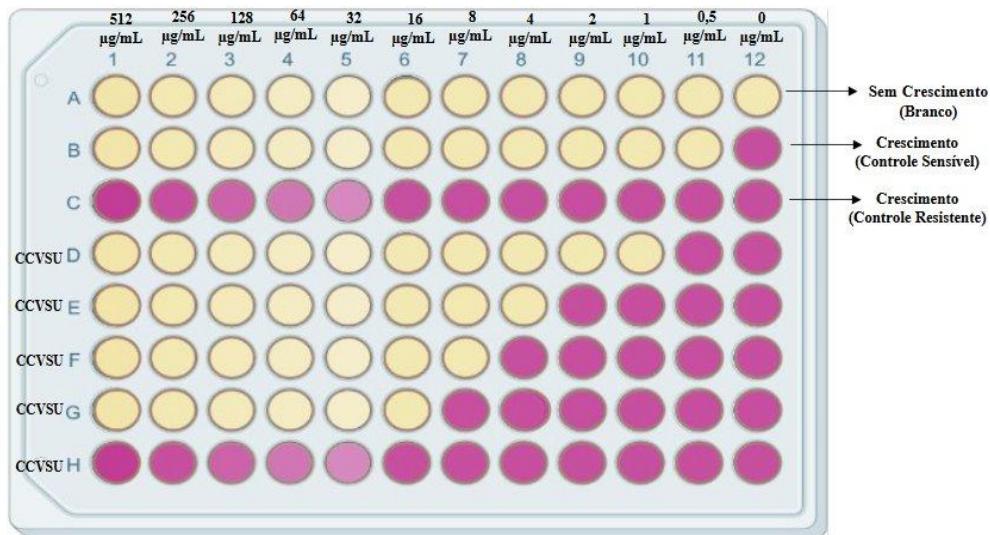


Figura 3. Determinação da concentração inibitória mínima da colistina.

3.5 Pesquisa de Genes *mcr* pela PCR

As cepas com CIM maior ou igual a 2 ug/mL foram submetidos a extração do DNA genômico utilizando o kit Bio Gene Extração de DNA (Bioclin), de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e a quantidade de DNA foram mensuradas no espectrofotômetro NanoDrop 2000C (NanoDrop Technologies, Willmington, DE), e todas as amostras foram diluídas a 10 ng/µL para a normalização da concentração e armazenadas a -20 °C.

A detecção dos genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* (Rebelo *et al.*, 2018), *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*, *mcr-9* (Borowiak *et al.*, 2020) e *mcr-10* (Mentasti *et al.*, 2021) foi realizada por PCR convencional. Cada reação de volume final de 25 µL, contendo 0,2 µM de cada iniciador (Quadro 2), 1X GotTaq G2 Mastermix (Promega), 20 ng de DNA alvo e água ultrapura (Nuclease-Free Water – Ambion) para completar o volume. Como controle negativo, foi utilizada a cepa de referência *E. coli* WDCM 00013, enquanto os controles positivos incluíram as cepas *E. coli* CCVSU 7107 (*mcr-1*), *Acinetobacter baumannii* CCVSU 7523 (*mcr-4.3*), *E. coli* CCBH 25606 (*mcr-5*), além de água livre de nucleases como branco da reação. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 1 hora a 60 V, utilizando tampão Tris-Aacetato-EDTA (TAE) 1X, e corados com GelRed (BIOTIUM). O *DNA ladder* (Invitrogen) 100 bp, foi utilizado como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, as bandas foram visualizadas no fotodocumentador L-Pix Touch Transilluminator (Loccus).

Quadro 2. Iniciadores específicos para detecção dos genes *mcr*

Gene alvo	Sequência do iniciador (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>mcr-1</i>	F: AGTCCTGTTCTTGTGGC R: AGATCCTGGTCTCGGCTTG	320	
<i>mcr-2</i>	F: CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT R: TCTAGCCCCACAAGCATACC	715	
<i>mcr-3</i>	F: AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG R: AATGGAGATCCCCGTTTT	929	Rebelo <i>et al.</i> , 2018
<i>mcr-4</i>	F: TCACTTTCATCACTGCGTTG R: TTGGTCCATGACTACCAATG	1116	
<i>mcr-5</i>	F: ATGCCGTTGCTGCATTATC R: TCATTGTGGTTGTCCTTTCTG	1644	
<i>mcr-6</i>	F: AGCTATGTCAATCCCGTGAT R: ATTGGCTAGGTTGTCAATC	252	
<i>mcr-7</i>	F: GCCCTTCTTTCGTTGTT R: GGTTGGTCTCTTCTCTCGT	551	Borowiak <i>et al.</i> , 2020
<i>mcr-8</i>	F: TCAACAATTCTACAAAGCGTG R: AATGCTGCGCGAATGAAG	856	
<i>mcr-9</i>	F: TTCCCTTTGTTCTGGTTG R: GCAGGTAATAAGTCGGTC	1011	
<i>mcr-10</i>	F: GCAATAACCCGACGCTGAAC R: GTAACGCGCCTGCATCATC	366	Mentasti <i>et al.</i> , 2021

3.6 Determinação do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

O teste de suscetibilidade antimicrobiana (AST) foi realizado nas cepas com CIM maior ou igual à 2 mg/L, pelo sistema VITEK2® (BioMérieux) com cartão AST-408, de acordo com as instruções do fabricante (Quadro 3) e interpretação dos resultados conforme Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade (BrCAST, 2025). A cepa *Escherichia coli* WDCM 00013 foi utilizada como controle de qualidade.

Quadro 3. Antimicrobianos testados e seus respectivos pontos de corte, segundo o BrCAST (2025)

Classes	Antimicrobianos	Ponto de corte p/ CIM (mg/L)		
		S	I	R
β -lactâmicos	Amoxicilina/Ác. clavulânico	8	-	> 8
	Piperacilina/Tazobactam	8	-	> 8
	Ertapenem	0,5	-	> 0,5
	Meropenem	2	4 - 8	> 8
	Cefepima	1	2 - 4	> 4
	Ceftriaxona	1	2	> 2
	Cefuroxima	8	-	> 8
Aminoglicosídeos	Cefalexina	16	-	> 16
	Amicacina	8	-	> 8
Fluoroquinolonas	Gentamicina	2	-	> 2
	Ciprofloxacino	0,25	0,5	> 0,5
Sulfonamidas	Norfloxacino	0,5	-	> 0,5
	Trimetoprima/Sulfametoxazol	2	4	> 4
Agentes diversos	Fosfomicina	8	-	> 8

Legenda: R: Resistente, I: Intermediário, S: Sensível

3.7 Análise da relação clonal

3.7.1 Tipificação filogenética por MLST

Os isolados com a presença de gene *mcr*, foram selecionados para análise de relação clonal através da técnica de Multilocus Sequence Typing (MLST). Foram realizadas amplificações por PCR de fragmentos internos de genes housekeeping de acordo com gênero bacteriano: *Escherichia coli* (Jolley; Bray; Maiden, 2018); *Enterobacter* spp. (Miyoshi-Akiyama *et al.*, 2013); *Klebsiella pneumoniae* (Diancourt *et al.*, 2005), e sequenciados em duplicata com terminadores fluorescentes (BigDye; Applied Biosystems, Foster City, CA) no sequenciador SeqStudio Genetic Analyzer (Thermofisher) conforme instruções do fabricante. O SeqScape Software v4.0 (Thermofisher) foi utilizado para avaliar a qualidade das leituras geradas, e remoção de nucleotídeos ambíguos e de sequências com score inferior a 30. O mesmo software foi responsável pela montagem das sequências. As sequências foram depositadas nos bancos de dados *Klebsiella* Sequence Typing do Pasteur Institute MLST Database (<http://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/>) e PubMLST de Oxford (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinação dos alelos e os tipos sequenciais (Sequence Typing (ST)). A partir da definição dos STs foi realizada a construção de árvores Minimal Spanning Tree (MST) para avaliar a relação entre os STs encontrados neste estudo, com base nos dados das fontes de isolamento de todos os isolados depositados no Brasil, incluindo os isolados que foram depositados deste estudo.

3.7.2 Tipificação filogenética de *E. coli*

As cepas de *E. coli* portadoras do gene *mcr* foram submetidas à técnica de tipificação filogenética proposta por Clermont *et al.*, 2013. Utilizando uma reação de PCR multiplex baseada na detecção de quatro marcadores genéticos: *arpA*, *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TspE4.C2. Cada reação de volume final de 10 µL, contendo 0,2 µL de cada iniciador, 2X GotTaq G2 Mastermix (Promega), 20 µL de DNA alvo e água ultrapura (Nuclease-Free Water – Ambion) para completar o volume. Como controle interno, foi utilizada a cepa de referência *E. coli* ATCC 25922. A PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação por 4 min a 94 °C, 30 ciclos de 5 s a 94 °C e 10 s a 59 °C e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C. Todos os primers foram utilizados na mesma reação. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% a 60 V, utilizando tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, e corados com GelRed (BIOTIUM). O *DNA ladder* (Invitrogen) 50 bp foi utilizado como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, as bandas foram visualizadas no fotodocumentador L-Pix Touch Transilluminator (Loccus). Para a determinação do filogrupo, foi utilizado o esquema de Clermont *et al.*, 2019, conforme figura 4.

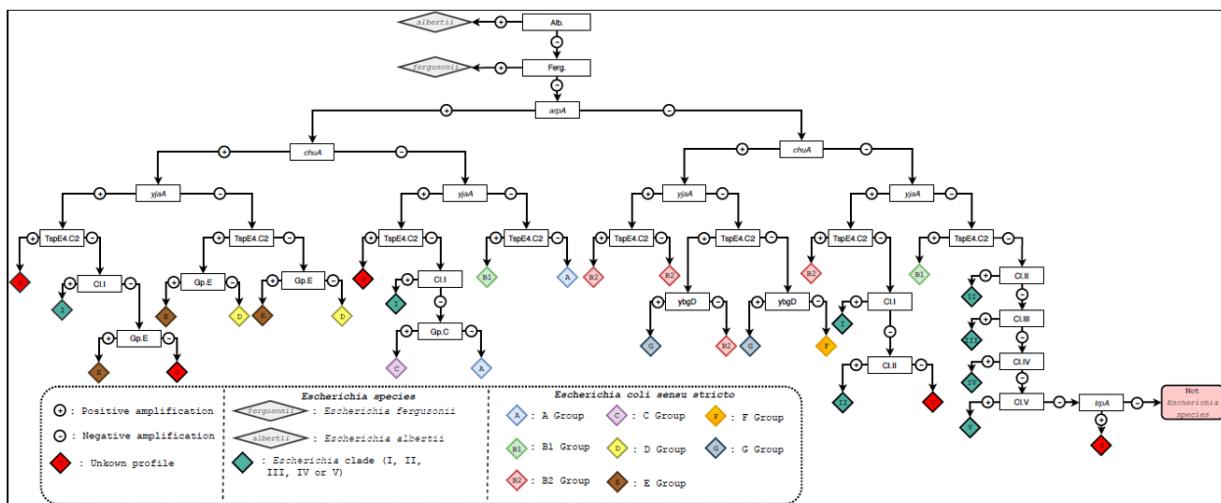


Figura 4. Esquema para determinação de tipificação filogenética de *E. coli*. Fonte: Clermont *et al.*, 2019.

3.8 Sequenciamento Genômico e Análise Bioinformática

As linhagens de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp., isoladas do efluente tratado e portadoras, dos genes de resistência *mcr-1* e *mcr-10*, respectivamente, pertencentes ao mesmo tipo sequencial (ST) de todos os pontos de amostragem, foram selecionadas para o sequenciamento completo do genoma. A biblioteca foi preparada utilizando Illumina DNA prep kit (Illumina Inc, EUA) e o sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina) disponível no INCQS (Rede Genômica da Fiocruz). Os nucleotídeos ambíguos com base no índice de qualidade e nas sequências do adaptador foram então aparados usando a ferramenta Fastp (Chen *et al.*, 2018), as sequências com um Phredscore inferior a 30 foram removidas. A montagem de novo de leituras aparadas e sequências de alta qualidade foi realizada em Unicycler (Wick *et al.*, 2017). A qualidade dos genomas montados foi avaliada usando BUSCO v5.8 (Manni *et al.*, 2021). A avaliação genômica da resistência antimicrobiana foi realizada utilizando o RGI do CARD para investigar a presença de GRA adquiridos e o ResFinder para avaliar as mutações que induzem a resistência (Alcock *et al.*, 2023). Os plasmídeos foram avaliados usando PlasmidFinder v2.1 (Carattoli; Hasman, 2020) e ViralVerify (Antipov *et al.*, 2020). Elementos genéticos móveis também foram avaliados usando MobileElementFinder v1.0.3 (Johansson *et al.*, 2021). Para verificar os fatores de patogenicidade e virulência (VFs), foram utilizados PathogenFinder v2.0 (Florensa *et al.*, 2025) e VirulenceFinder 2.0 (Tetzschner *et al.*, 2020), respectivamente. A construção das representações circulares do plasmídeo e do cromossomo foi realizada com o auxílio do software Proksee.

4 RESULTADOS E DISCUSSAO

4.1 Isolamento e Identificação

Foram recuperadas um total de 140 cepas Gram-negativas, a partir de diferentes etapas do sistema de tratamento de efluentes (ETEs) do abatedouro. Destes, 44% (62/140) foram identificados como *Escherichia coli*, sendo 52% (32/62) provenientes do efluente bruto (P1), 21% (13/62) do tanque de floculação (P2) e 27% (17/62) do efluente tratado (P3). Linhagens do gênero *Enterobacter* corresponderam a 19% (27/140), sendo 59% (16/27) no P1, 22% (6/27) no P2 e 19% (5/27) no P3. Bactérias do gênero *Klebsiella* representaram 26% (37/140), sendo 51% (19/37) provenientes do P1, 22% (8/37) do P2 e 27% (10/37) do P3. *Citrobacter freundii* foi identificada em dois dos isolados (2/140), sendo um do P1 e um do P2. *Morganella morganii* correspondeu a três (3/140) cepas, todas oriundas do P1. Em relação ao gênero *Serratia* foram identificadas 7 cepas correspondentes a 5% (7/140), sendo 71% (5/7) provenientes do P1 e dois (2/7) do P3. Apenas um isolado um (1/140) foi identificado como *Proteus vulgaris*, oriundo do P1. Da mesma forma, *Kalamella piersonii* foi identificada em apenas um isolado um (1/140), proveniente do P2 (Figura 5).

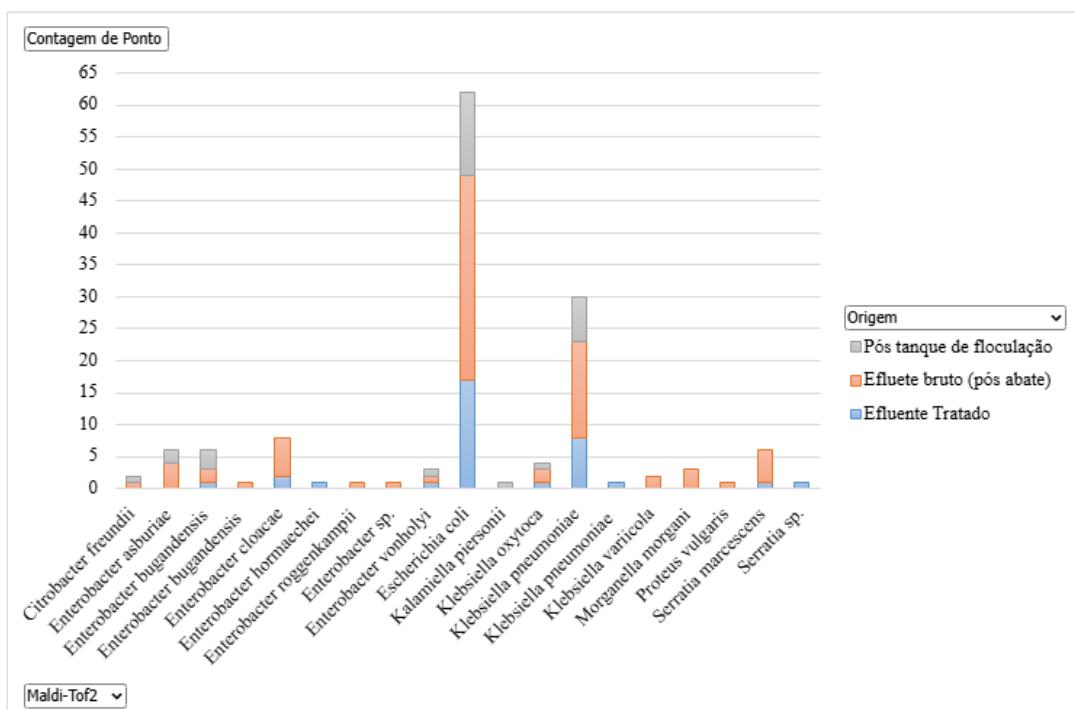


Figura 5. Distribuição das cepas de Enterobacteriales, com seus respectivos pontos de coleta.

Zhou e colaboradores (2024) acompanharam 140 aves durante 42 dias, e demonstraram que 91,4 % das amostras de cloaca continham *E. coli* (128 de 140). Além disso, 50 % das amostras de gaiolas (35/70) e 35,7 % (27/70) das rações também apresentaram *E. coli*. Zhou et al.,(2024).

No presente estudo, a prevalência de *E. coli* nos três pontos na ETE avícola pode estar relacionada, principalmente, à microbiota intestinal das aves. Sua prevalência em abatedouros avícolas, bem como na água, equipamentos, ração, gaiolas e esgoto dos aviários, também está relacionada a diversos fatores ambientais e biológicos. Além disso, durante a criação e o processo de abate, a contaminação fecal ocorre naturalmente, pois a *E.coli* é excretada pelas

aves nas fezes (Fairbrother; Nadeau; Gyles, 2005). Vale ressaltar, que *E. coli* possui elevada capacidade de sobrevivência em diferentes condições ambientais, principalmente na presença de matéria orgânica, que favorece sua persistência e propagação (Brennan *et al.*, 2010). Outro fator importante é o manejo intensivo, característico da avicultura, que, aliado à alta densidade populacional e ao acúmulo de resíduos fecais, potencializa a disseminação dessa espécie bacteriana no ambiente. Estes dados reforçam a necessidade de práticas rigorosas de higiene e biosseguridade para o controle dessa bactéria. Segundo Kuana *et al.*, 2009, as medidas de profilaxia ambiental de abatedouros avícolas representam um aspecto essencial na economia e contribuem para a controle de contaminação por *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter*, entre outros, ao mesmo tempo reduzem a disseminação de patógenos e genes de resistência.

Um estudo realizado na França avaliou a prevalência de *Escherichia coli* patogênica e produtora de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) em efluentes de uma estação de tratamento de esgoto municipal que recebe contribuições tanto de esgoto urbano quanto de resíduos de abatedouros. Foram analisados 1.248 isolados quanto à presença de genes de virulência associados a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), enteropatogênica atípica (aEPEC) e extraintestinal patogênica (ExPEC). Os resultados demonstraram que cepas potencialmente patogênicas são capazes de resistir aos processos convencionais de tratamento secundário, sendo ainda detectadas no efluente tratado (Diallo *et al.*, 2013b). Além disso, um outro estudo envolvendo dois abatedouros avícolas na Alemanha, investigou a presença de bactérias produtoras de ESBL em meio de cultura seletivo e diferencial. Em um dos abatedouros, foi observada a prevalência de 75% (6/8) de espécies do Complexo *Acinetobacter* e 25% (2/8) de *Escherichia coli* (Savin *et al.*, 2020). No segundo abatedouro, espécies do Complexo *Acinetobacter* também foram prevalentes com 75% (6/8) das cepas, seguido por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Em outro estudo Nunes *et al.*, (2024) também obteve 229 linhagens, sendo 221 *Enterobacteriaceae* e 8 *Pseudomoneaceae*, de efluentes de abatedouro avícola, sendo que 19 foram obtidas de efluentes tratados. As espécies mais frequentes neste estágio final do tratamento foram *Klebsiella pneumoniae*, seguida *Citrobacter freundii*. Assim como no presente estudo, estes estudos também verificaram a presença de diferentes espécies bacterianas a partir de efluentes tratados. Estes achados reforçam o papel dos sistemas de tratamento como possíveis reservatórios de patógenos de importância clínica, muitas vezes associados à resistência antimicrobiana.

4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Polimixina

As 140 cepas pertencentes à ordem Enterobacterales foram submetidas ao teste de triagem para avaliação da suscetibilidade à colistina. As linhagens que apresentaram crescimento em meio contendo concentração $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ foram selecionadas para a realização do teste CIM, totalizando 39 cepas (Figura 6; anexo A).

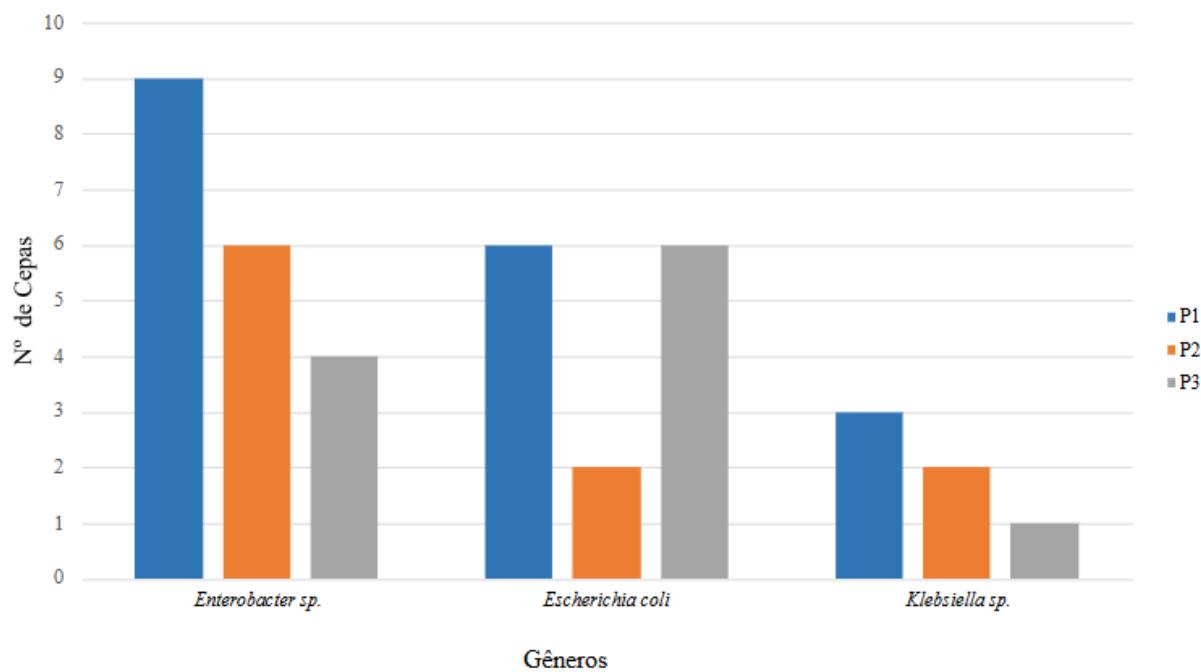


Figura 6. Distribuição das cepas de Enterobacterales, resistentes à colistina, e seus respectivos pontos de coleta.

Dessas 39, 46% (18/39) foram provenientes de efluente bruto (P1), sendo seis *E. coli*, três *Klebsiella* spp. e nove *Enterobacter* spp. (Figura 7).

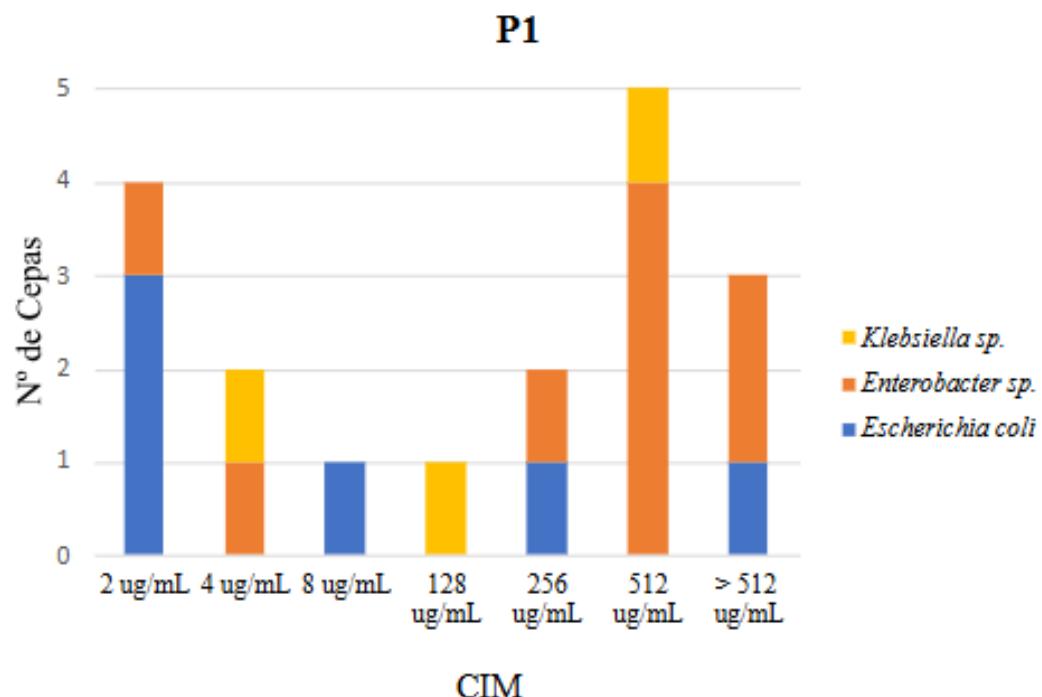


Figura 7. Cepas resistentes à colistina, com suas respectivas CIMs do efluente bruto (P1).

Vinte e seis por cento das cepas (10/39) foram do ponto (P2) após o tanque de floculação, sendo duas *E. coli*, duas *Klebsiella* spp. e seis *Enterobacter* spp. (Figura 8).

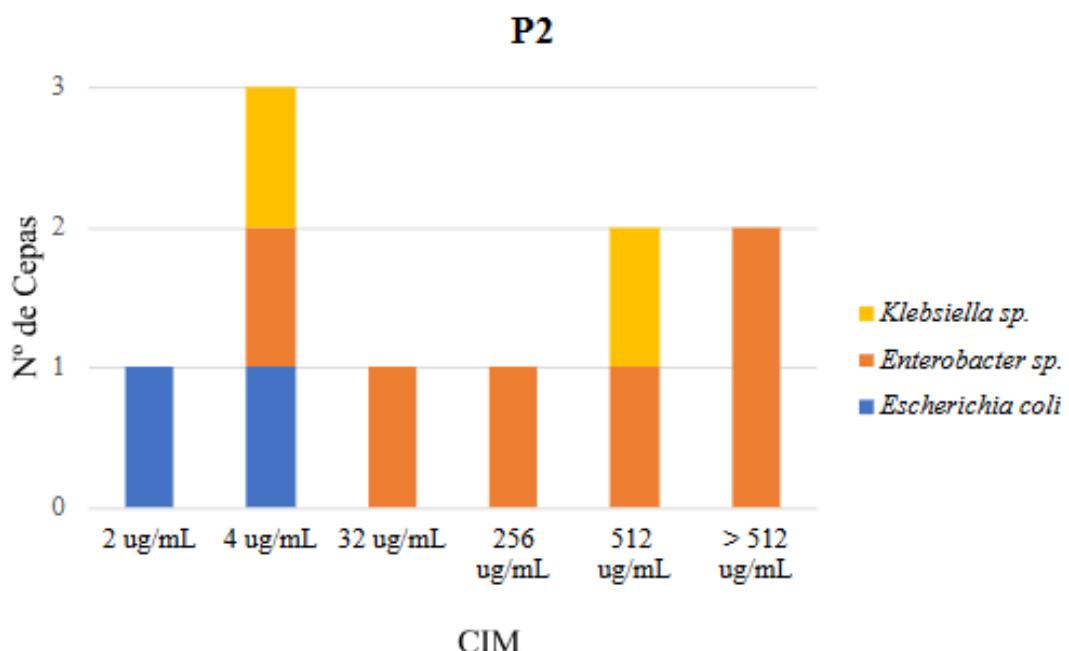


Figura 8. Cepas resistentes à colistina, com suas respectivas CIMs do tanque de floculação (P2).

No ponto P3, foram detectadas 28% (11/39) das espécies, incluindo seis *E. coli*, uma *K. pneumoniae* e quatro *Enterobacter* spp. (Figura 9).

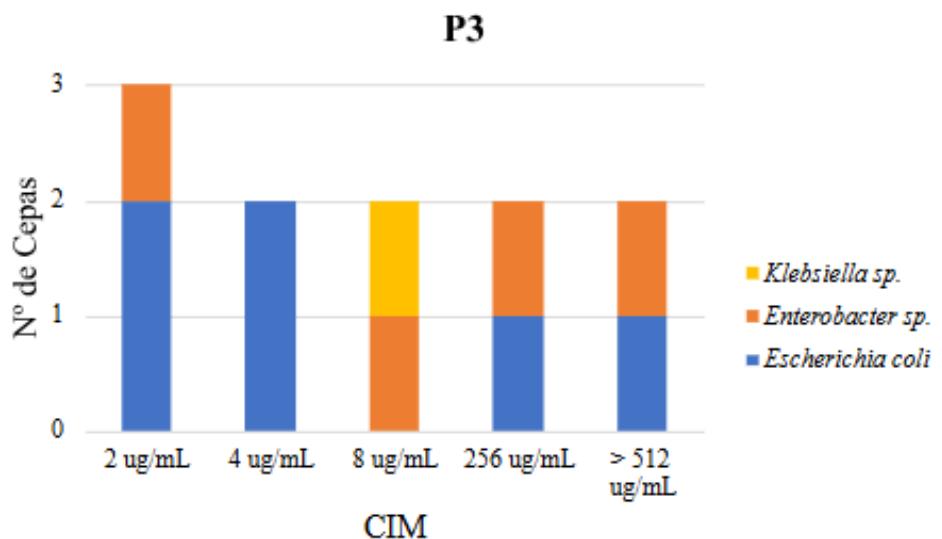


Figura 9. Cepas resistentes à colistina, com suas respectivas CIMs do tanque efluente tratado (P3).

Savin *et al.* (2022) identificaram 185 cepas de *Klebsiella spp.* em águas residuais tratadas de abatedouros de aves e suínos, sendo que os isolados provenientes do abatedouro avícola apresentaram as maiores taxas de resistência à colistina, possivelmente relacionadas ao uso frequente desse antimicrobiano na avicultura. A identificação dessas linhagens em ambientes de abate reforça a necessidade de tecnologias avançadas de tratamento de águas residuais, bem como de monitoramento molecular ampliado, uma vez que alimentos e efluentes podem atuar como reservatórios de determinantes móveis ainda não descritos, favorecendo a transferência horizontal de resistência e limitando as opções terapêuticas disponíveis (Savin *et al.*, 2022).

Estudos recentes demonstram a ocorrência significativa de Enterobacterales resistentes à colistina em efluentes de origem animal. Na Croácia, *Klebsiella spp.* e outras espécies da ordem Enterobacterales foram isoladas de efluente tratado, apresentando taxas de resistência à colistina de 40% entre os isolados de *Klebsiella spp.* e 57% entre as cepas de *Enterobacter spp.* (Puljko *et al.*, 2024). De forma semelhante, Homeier-Bachmann *et al.*, 2021 investigaram águas residuais provenientes de sete abatedouros e revelaram a presença de Enterobacterales resistentes à colistina em 54% das cepas oriundas de abatedouros avícolas e em 21% das provenientes de abatedouros de suínos, evidenciando que os efluentes de origem animal podem atuar como reservatórios relevantes de bactérias multirresistentes, mesmo após o tratamento convencional.

As ETEs, apesar de sua função essencial na proteção ambiental, apresentam limitações substanciais em relação a remoção eficiente de bactérias resistentes e genes de resistência associados (Michael *et al.*, 2013; Rizzo *et al.*, 2013a). No entanto, essas ETEs convencionais são majoritariamente projetadas para remover matéria orgânica, nutrientes e sólidos em suspensão, e não são especificamente desenvolvidas para eliminar microcontaminantes emergentes, como antibióticos, genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) e as próprias bactérias resistentes (Manaia *et al.*, 2016)

Em consequência disso, diversos estudos têm demonstrado que tanto BRAs quanto GRAs podem sobreviver aos processos de tratamento e ser liberados no ambiente por meio do efluente tratado (Bouki; Venieri; Diamadopoulos, 2013; Rizzo *et al.*, 2013b). Além disso, ressaltam a importância do monitoramento contínuo da resistência antimicrobiana em ambientes ambientais como parte de uma abordagem integrada de uma só saúde única, considerando os impactos potenciais para a saúde humana, animal e ambiental.

4.3 Detecção de Genes *mcr*

As 39 cepas que apresentaram resistência à colistina foram submetidas à análise molecular para a detecção dos genes de resistência *mcr-1-10*. Dentre essas, 41% (16/39) apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados (Anexo B). No P1, foi detectado o gene *mcr-1* em três cepas de *E. coli*, além de um isolado de *Enterobacter sp.* e *K. pneumoniae*. No mesmo ponto, o gene *mcr-10* foi identificado na cepa de *Ent. bugandensis* (Figura 10).

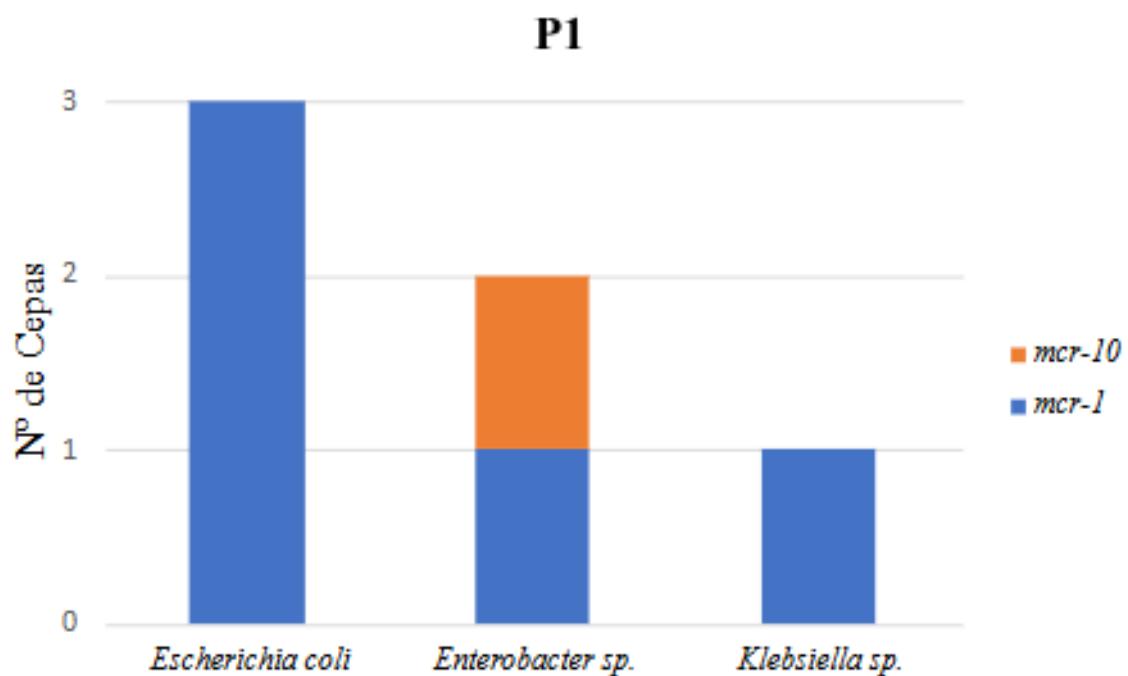


Figura 10. Cepas resistentes à colistina portadoras de gene *mcr* do efluente bruto (P1).

No ponto de coleta P2, o gene *mcr-1* foi detectado em cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Ent. hormaechei*. A presença do gene *mcr-10* também foi encontrada em *Ent. bugandensis* neste ponto (Figura 11).

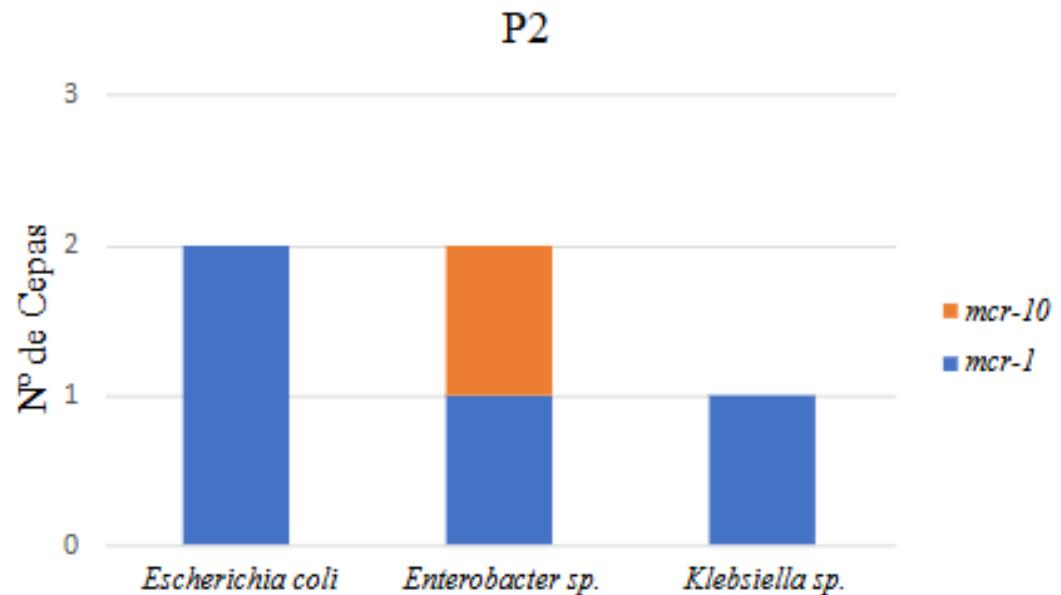


Figura 11. Cepas resistentes à colistina portadoras de gene *mcr* do tanque de floculação (P2).

No ponto de coleta P3, o gene *mcr-1* foi identificado em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*, enquanto o gene *mcr-10* foi novamente detectado na cepa de *Ent. Bugandensis* (Figura 12).

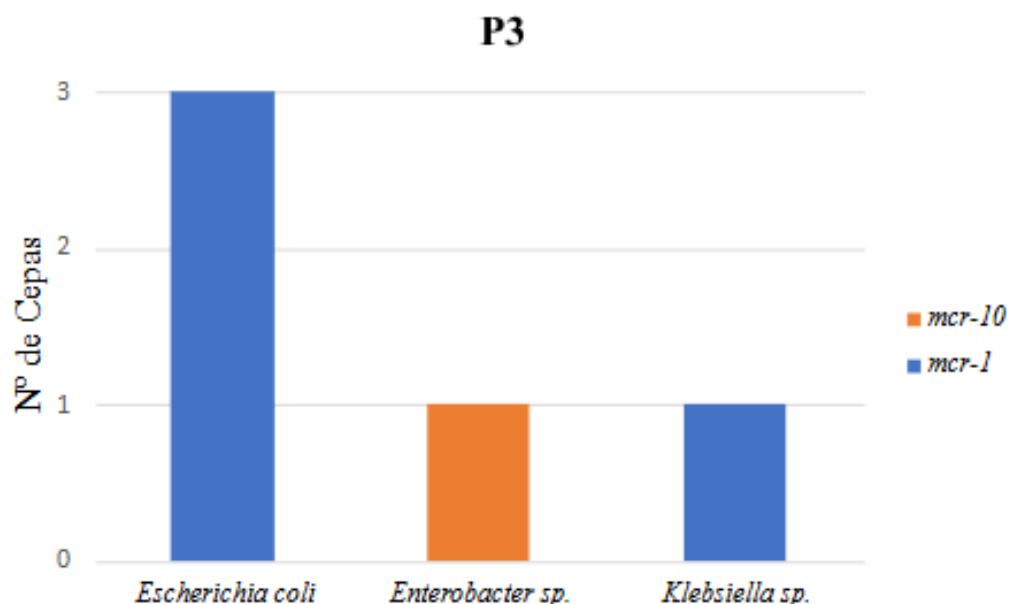


Figura 12. Cepas resistentes à colistina portadoras de gene *mcr* do efluente tratado (P3).

A presença do gene *mcr-1* foi revelada em efluente de abatedouro localizado nas proximidades do rio Dawen, na China, que recebe águas residuais previamente tratadas. A presença de *mcr-1* foi demonstrada em 20% das cepas analisadas (4/20) (Wang *et al.*, 2021). A CIM de colistina das cepas positivas variou entre 4 e 8 µg/mL. Embora a frequência do gene *mcr-1* em *E. coli* oriundas de águas residuais tratadas permaneça relativamente baixa em escala global, esses achados destacam a importância do monitoramento contínuo e do gerenciamento adequado de efluentes, considerando os potenciais riscos ambientais e epidemiológicos relacionados à disseminação de genes de resistência (Wang *et al.*, 2021).

De forma semelhante, Savin *et al.* (2020) realizaram um estudo em abatedouros de aves e suíños na Alemanha, onde foram rastreados os genes *mcr-1* a *mcr-9* em cepas recuperadas de efluentes avícola e suinícola. Apenas o gene *mcr-1.1* foi detectado em 70,8% das cepas de *E. coli* e 20,6% dos de *K. pneumoniae*. As CIMs de colistina de *E. coli* - *mcr-1.1* variaram entre 4 e 8 mg/L, enquanto as cepas de *K. pneumoniae* apresentaram níveis mais elevados de resistência, com valores entre 4 e >64 mg/L. Esses genes foram detectados em todos os pontos amostrados, incluindo a água de escaldagem e os efluentes das estações de tratamento internas, evidenciando o papel dos abatedouros como potenciais disseminadores de bactérias resistentes à colistina no ambiente (Savin *et al.*, 2020b).

Nos Estados Unidos, Tysko *et al.* (2020) avaliaram 105 cepas provenientes de carne de varejo (frango, peru, suíno e bovino), das quais 99 pertenciam ao gênero *Salmonella enterica* e seis eram *E. coli*. Todas as cepas analisadas eram portadoras do gene *mcr-9*. No entanto, foram classificadas como suscetíveis à colistina segundo os pontos de corte do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para Enterobacterales (CIM ≤ 2 µg/mL) (Tysko *et al.*, 2020). Isso também foi observado por Xedzro *et al.* (2025), que relataram a detecção de *mcr-10* em *Enterobacter xiangfangensis* produtora de ESBL isolada de frutos do mar. Apesar de

apresentar perfil multidroga resistente, apresentou suscetibilidade à colistina. Esses estudos reforçam que a presença de *mcr* não implica necessariamente em resistência fenotípica a colistina. Tal discrepância pode ser atribuída à baixa expressão gênica, variantes com atividade enzimática reduzida, menor número de cópias plasmidiais ou ao custo adaptativo elevado associado à manutenção e expressão desses genes (Xedzro *et al.*, 2025). Assim, ressalta-se a importância de se avaliar de forma integrada os dados genotípicos e fenotípicos no contexto da resistência à colistina, especialmente em ambientes críticos como abatedouros, onde há risco de disseminação para a cadeia alimentar e para o meio ambiente.

4.4 Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Linhagens carreando Genes *mcr*

As 16 cepas que apresentaram gene *mcr*, foram submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana. As cepas de *E. coli* portadoras do gene *mcr* ($n = 8$) submetidas a testes de suscetibilidade a 14 agentes antimicrobianos com o objetivo de caracterizar seu perfil fenotípico de resistência. Cem por cento das *E. coli* (8/8) cepas apresentaram resistência a piperacilina/tazobactam (PPT), cefalexina (CFE) e cefuroxima (CRX), 87% (7/8) foram resistentes a ceftriaxona (CRO), enquanto 75% (6/8) foram sensíveis a amoxicilina/ácido clavulânico (AMC), 50% (4/8) foram resistentes cefepime (CPM). Entre os aminoglicosídeos, 14% (1/8) foi resistente a amicacina (AMI) e 62% (5/8) para gentamicina (GEN). Na classe das quinolonas, ciprofloxacino (CIP) e norfloxacino (NOR) apresentaram resistência em 71% (5/8) e 75% (6/8), respectivamente. O sulfametoazol/trimetoprima (SUT) revelou 57% (4/8) de resistência, enquanto a fosfomicina (FOS) apresentou 75% (6/8) de sensibilidade entre as cepas. Entre os carbapenêmicos, observou-se 87% (7/8) de resistência à ertapenem (ERT), com apenas um isolado sensível. Por outro lado, meropenem (MER) apresentou 75% (6/8) de sensibilidade e dois casos com perfil intermediário.

As cepas de *Enterobacter* sp. foram testadas frente a 13 antimicrobianos. Os antimicrobianos CRX, CFE e AMC apresentaram 100% (5/5) de resistência entre os isolados. Nos aminoglicosídeos AMI e GEN, observou-se 100% (5/5) de sensibilidade. Nos carbapenêmicos, observou-se 80% (4/5) de resistência à ERT. Enquanto, MER apresentou 80% (4/5) de sensibilidade e um isolado com perfil intermediário. A cefalosporina de terceira geração CRO, apresentou 80% (4/5) de resistência, enquanto a cefalosporina de quarta geração CPM, mostrou 60% (3/5) de sensibilidade e um isolado intermediário. As quinolonas, CIP e NOR apresentaram sensibilidade em 80% (4/5) e 60% (3/5) dos isolados, respectivamente. No beta-lactâmico PPT, observou-se resistência em 80% (4/5). E SUT apresentou 80% (4/5) de sensibilidade.

As cepas de *K. pneumoniae* apresentaram 100% (3/3) de resistência frente a dez antimicrobianos, dos 13 testados. Observando-se 100% (3/3) sensíveis ao carbapenêmico MER e aos aminoglicosídeos AMI e GEN (Tabela 1).

De acordo com os resultados, as 16 cepas incluindo oito *E. coli*, seis *Enterobacter* sp. e três *K. pneumoniae* do presente foram classificadas como multidroga resistentes (MDR) de acordo com os critérios estabelecidos por Magiorakos *et al.* (2012). Esses dados indicam o potencial risco de liberação de microrganismos multirresistentes no ambiente, mesmo após o tratamento dos efluentes (Magiorakos *et al.*, 2012). Homeier-Bachmann *et al.* (2021) investigaram a presença de Enterobacterales produtoras de ESBL e resistentes à colistina em águas residuais de sete abatedouros (suínos e avícolas). Foram isoladas 55 cepas, todas resistentes à piperacilina, 95% à cefuroxima e ceftazidima, e 89% à cefotaxima. A resistência à ciprofloxacina foi observada em 53% dos isolados, à tetraciclina em 47% e à gentamicina em 9%. Todos os isolados foram suscetíveis ao meropenem e imipenem. Vinte isolados (36%) apresentaram resistência à colistina. Do total, 25 cepas foram provenientes do abatedouro

avícola, incluindo 19 *E. coli* e seis *K. pneumoniae*, todas com perfil MDR. Enterobacterales resistentes à colistina foram detectadas em 54% das amostras de origem avícola. Não foi detectada resistência a carbapenêmicos. Os autores destacam a contribuição dos abatedouros para a disseminação de bactérias resistentes em ambientes aquáticos devido ao descarte direto de efluentes em corpos hídricos (Homeier-Bachmann *et al.*, 2021a).

Em um estudo recente, foram analisadas amostras de águas residuais de várias etapas de uma estação de tratamento de efluentes, resultando no isolamento de 42 *K. pneumoniae*. Todas as cepas apresentaram resistência à tetraciclina e à trimetoprima, enquanto foram observadas taxas variáveis de resistência a β -lactâmicos: oito cepas à ceftriaxona, sete à cefotaxima e seis à ceftazidima. Entre os aminoglicosídeos, sete isolados foram resistentes à gentamicina e um à amicacina. A resistência à colistina foi detectada em oito cepas, embora nenhum gene *mcr* tenha sido identificado. Quanto às fluoroquinolonas, dez isolados foram resistentes ao ácido nalidíxico e oito à ciprofloxacina. Não foi detectada resistência a carbapenêmicos. Sessenta por cento (9/15) das amostras da entrada da estação foram MDR, em comparação com o tanque de sedimentação (47%) e o efluente tratado (37,5%) (Di Cesare *et al.*, 2024).

Tabela 1. Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos de cepas portadoras de gene *mcr*.

Gênero	CCVS U	AMC	PPT	CFE	CRX	CRO	CPM	ERT	MER	AMI	GEN	CIP	NOR	SUT	FOS
<i>Escherichia coli</i>	9781	≥ 32	64	≥ 64	≥ 64	32	0,5	4	4	4	≥ 16	1	2	≥ 320	≥ 256
	9786	≥ 32	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 64	16	0,5	4	2	2	-	4	-	≤ 16
	9803	8	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 32	0,25	1	4	≥ 16	≥ 4	≥ 16	≤ 20	≥ 256
	9820	8	64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 32	0,25	1	2	4	≥ 4	≥ 16	≥ 320	≤ 16
	9834	8	64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 32	0,25	1	2	2	≥ 4	≥ 16	≥ 320	≤ 16
	9998	≤ 2	64	≥ 64	≥ 64	0,5	0,5	≤ 0,12	1	4	2	1	2	≥ 320	≤ 16
	11011	8	64	≥ 64	≥ 64	32	≤ 0,12	1	2	4	4	≤ 0,06	≤ 0,5	≤ 20	32
	11168	8	64	≥ 64	≥ 64	32	0,25	0,25	2	-	4	≤ 0,06	≤ 0,5	≤ 20	32
<i>Enterobacter sp.</i>	9829	≥ 32	≥ 128	≥ 64	-	32	2	4	8	4	≤ 1	≤ 0,06	≤ 0,5	≥ 320	-
	9839	16	≥ 4	≥ 64	-	≥ 64	4	≤ 0,12	0,5	4	≤ 1	2	≥ 16	40	-
	9821	≥ 32	≥ 128	≥ 64	-	32	2	≥ 8	2	2	≤ 1	≤ 0,06	1	≤ 20	-
	9844	≥ 32	≥ 128	≥ 64	≥ 64	1	0,5	1	1	2	≤ 1	≤ 0,06	≤ 0,5	≤ 20	-
	9992	≥ 32	≥ 128	≥ 64	≥ 64	32	2	4	2	2	≤ 1	≤ 0,06	≤ 0,5	≤ 20	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9999	≥ 32	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 32	1	2	8	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 320	-
	11002	≥ 32	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 32	≥ 8	1	8	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 320	-
	11596	≥ 32	≥ 128	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 32	1	0,5	4	≤ 1	≥ 4	≥ 16	≥ 320	-

Legenda: A tabela apresenta os antimicrobianos testados e suas respectivas CIMs. A representação por cores indica o perfil de sensibilidade: branco para isolados suscetíveis, cinza para resistentes e azul para aqueles com perfil intermediário. ppt -Piperacilina/Tazobactam; cfe – ceftalexina; crx – cefuroxima; cro - ceftriaxona; amc - amoxicilina/ácido clavulânico; cpm -cefepime; ami – amicacina; gen – gentamicina; cip -ciprofloxacino; nor – norfloxacino; sut - sulfametoxzazol/trimetoprima; fos – fosfomicina; ert – ertapenem; mer – meropenem.

4.5 Análise da relação clonal

4.5.1 *K. pneumoniae* carreando *mcr-1*

As relações clonais das 3 cepas de *K. pneumoniae mcr-1* apresentaram seus tipos sequenciais (STs) de acordo com as análises de MLST (<https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/>). Três cepas de *K. pneumoniae* (CCVSU 9999, 11002 e 11596) provenientes de três pontos de coleta: efluente bruto (P1), etapa intermediária (P2) e efluente tratado (P3) foram alocadas no ST15. Além disso, as três cepas apresentaram o gene *mcr-1*. Das 1792 cepas ST15 no banco de dados, de diferentes origens, foram selecionados 1162 de 61 países, para elaborar o mapa de distribuição desse ST ao redor do mundo, uma vez que o restante não continha informações (ano, país e/ou local de isolamento). Cada ponto representa a presença de pelo menos um isolado de *K. pneumoniae* ST15 em um país, com base em dados de vigilância genômica. A distribuição mostra a ampla disseminação global desse clone de alto risco (Figura 13).



Figura 13. Distribuição global de *Klebsiella pneumoniae* ST15.

Legenda: O mapa apresenta a distribuição geográfica de isolados de *Klebsiella pneumoniae* pertencentes ao Sequence Type 15 (ST15) reportados em diferentes países ao redor do mundo. As cores representam a origem da amostra: ■ Animal; ■ Ambiental; ■ Animal de Fazenda; ■ Humano; e ■ Animal Selvagem.

A figura 14 apresenta a distribuição temporal de registros de *K. pneumoniae* ST15 no mundo entre 1988 e 2025. Observa-se que os primeiros relatos da linhagem ocorreram de forma esporádica nos anos 1990, com uma intensificação significativa a partir de 2012. O período entre 2013 e 2018 registra o maior número de linhagens, refletindo a emergência e disseminação global dessa espécie, frequentemente associada à resistência a múltiplos fármacos, incluindo carbapenêmicos. Após 2018, os registros apresentam uma leve redução, embora a ocorrência da linhagem permaneça constante até os anos mais recentes, indicando que o ST15 continua circulando globalmente e representa um clone de alto risco em ambientes hospitalares. Esse padrão temporal reforça a relevância do monitoramento contínuo de ST15 devido ao seu potencial epidêmico e à disseminação de genes de resistência críticos.

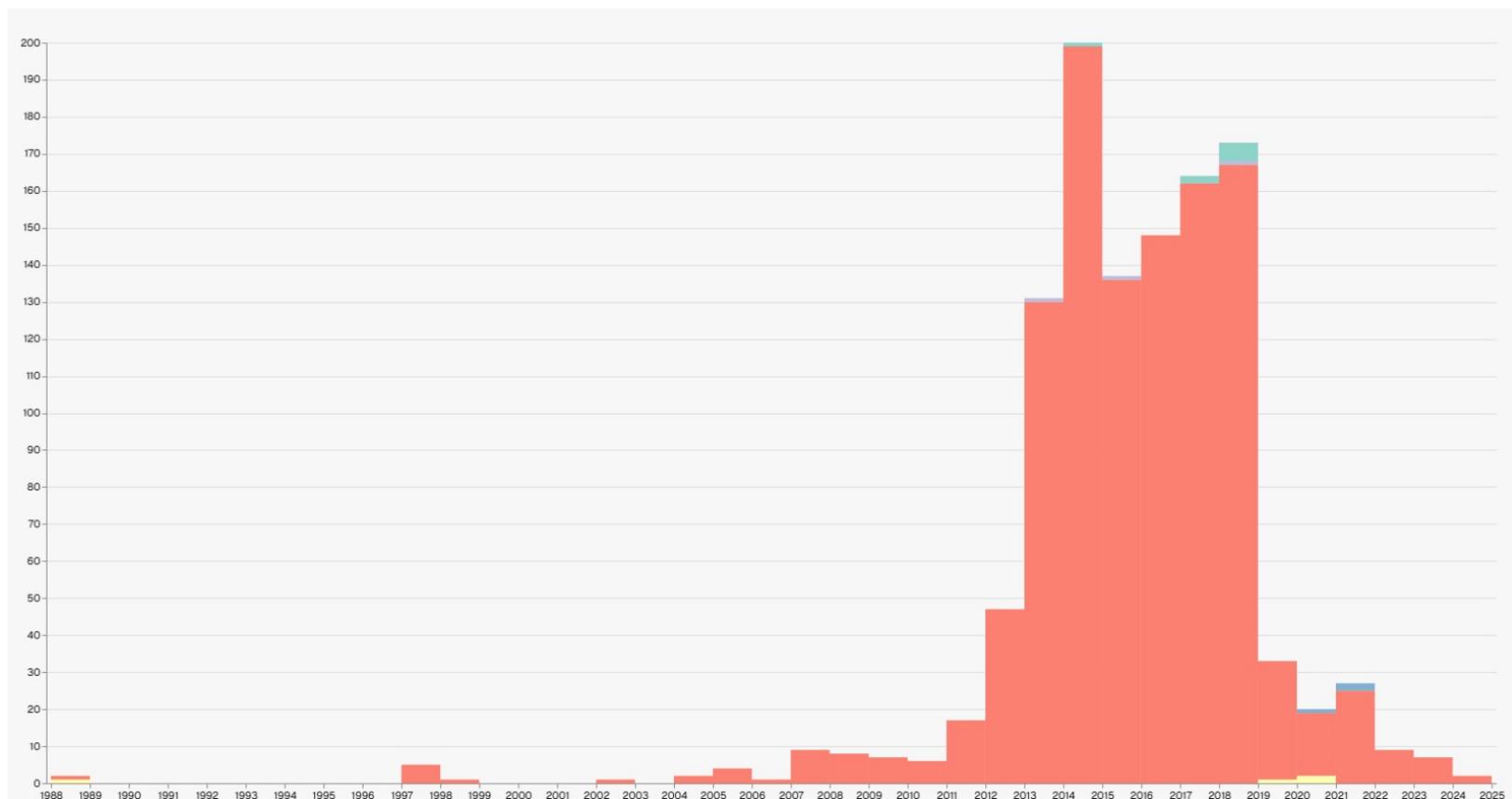


Figura 14. Distribuição temporal de registros de *K. pneumoniae* ST15 no mundo entre 1988 e 2025.

Legenda: As cores representam a origem da amostra: Animal; Ambiental; Animal de Fazenda; Humano; e Animal Selvagem.

K. pneumoniae possui ampla distribuição ecológica, ocorrendo em humanos, animais, plantas, solo, água e efluentes, o que indica seu potencial de circulação entre ambientes clínicos e ambientais. Sua presença em águas residuais tratadas decorre principalmente de descargas humanas e da resistência aos processos de tratamento. Cepas virulentas e multirresistentes podem sobreviver e proliferar no ambiente, e a detecção de clones idênticos (ST11, ST15, ST17, ST258, ST147) em hospitais e efluentes sugere fluxo bidirecional mediado por elementos genéticos móveis (Rocha *et al.*, 2022).

Em julho de 2024, uma cepa de *K. pneumoniae* foi isolada de hemocultura de um paciente internado na UTI de um hospital na Grécia. Essa apresentou resistência a todos os β-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e à colistina, sendo identificado como pertencente ao ST15. O sequenciamento genômico revelou a presença de múltiplos genes de resistência, incluindo *blavIM-1* e *blaNDM-1*, além de *blaCTX-M-15*, *blaTEM-1*, *blaOXA-1* e *blasHV-28* (Tsolakidou *et al.*, 2025).

Um estudo recente avaliou 150 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a pelo menos um carbapenêmico, isoladas de pacientes de UTI em três hospitais de diferentes regiões da China entre 2019 e 2021. Foram identificados 28 STs distintos, sendo ST11 o mais frequente (50,7%; 76/150), seguido pelo ST15 (22%; 33/150). O ST15 difere do ST11 por apenas dois alelos. Apesar da distância geográfica entre as cidades e das diferentes características clínicas dos pacientes, os perfis e mecanismos de resistência foram semelhantes, sugerindo ampla disseminação nacional de clones dominantes de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, possivelmente facilitada pela mobilidade populacional (Xu *et al.*, 2022c).

Chi e colaboradores, caracterizaram cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL a partir de 231 amostras ambientais (incluindo esterco de porco, águas residuais, solo, vegetais, sedimentos, água potável, água e sedimento de rio, e fezes de aves selvagens). Foram identificadas 14 cepas positivas para ESBL, distribuídas em 13 STs distintos, entre eles ST11, ST15, ST101 e ST258, considerados clinicamente relevantes por sua associação com resistência a carbapenêmicos em amostras clínicas globais. O ST15 produtor de ESBL foi previamente relatado em surtos hospitalares na Holanda e Hungria, enquanto variantes resistentes a carbapenêmicos foram descritas na Bulgária, Portugal, Vietnã e Nepal. Os achados reforçam a importância de investigar o papel do ambiente na transmissão e disseminação de *K. pneumoniae* produtora de ESBL, bem como seu potencial impacto na saúde humana e ambiental (Chi *et al.*, 2019).

4.5.2 *Enterobacter* spp. carreando *mcr-10* e *mcr-1*

Das cinco cepas de *Enterobacter* spp. carreando o gene *mcr*, foi possível avaliar apenas quatro. Dessas, as relações clonais foram determinadas por meio da análise de MLST, utilizando a ferramenta disponível no site PubMLST (https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_ecloacae_seqdef). Foram identificados dois tipos de sequência (STs): ST3343 e ST339. Três cepas (CCVSU 9821, CCVSU 9844 e CCVSU 9992) foram classificadas como ST3343, sendo isoladas nos três pontos de coleta. A cepa CCVSU 9839 foi caracterizada como ST339 e isolada no efluente bruto. Em relação aos determinantes de resistência, as cepas pertencentes ao ST3343 apresentaram o gene *mcr-10*, enquanto a cepa do ST339 apresentou o gene *mcr-1*.

O ST339 já havia sido reportado anteriormente em uma amostra de origem humana, isolada em 2019 na cidade de Uberaba, Minas Gerais, Brasil, o que reforça sua relevância em contexto clínico e sugere que esse clone circula entre isolados de importância médica (Isolate Information: Id-811 (PDT000720785.1) – *Enterobacter* spp.. Isolates, n.d.). A detecção desse ST em efluente bruto no presente estudo pode indicar a disseminação de clones previamente

descritos em ambiente hospitalar para matrizes ambientais, possivelmente via descargas urbanas ou industriais, ampliando o risco de transferência de resistência.

Por outro lado, o ST3343 foi identificado pela primeira vez neste estudo e, após depósito no banco de dados PubMLST, passou a ser considerado um novo tipo de sequência. O fato de esse novo ST ter sido recuperado em diferentes pontos de coleta sugere sua adaptação e potencial disseminação no ambiente aquático, o que é particularmente relevante diante da presença concomitante de genes de resistência, como o *mcr-10*. Esse achado destaca a importância do monitoramento de ambientes impactados por atividades agropecuárias e de saúde pública, uma vez que a emergência de novos clones em efluentes pode representar uma via de introdução de linhagens resistentes na comunidade e no meio ambiente.

4.5.3 *E. coli* carreando *mcr-1*

As relações clonais das oito cepas de *E. coli* foram determinadas por MLST, utilizando a ferramenta disponível no site PubMLST (https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_escherichia_seqdef). Foram identificados sete STs: ST350, ST1204, ST2172, ST744, 744CC, ST10, ST10183, além de um ST não determinado. Quanto à distribuição nos diferentes pontos de coleta, três isolados (CCVSU 9786, 11011 e 11168) foram obtidos do efluente bruto, duas cepas (CCVSU 9803 e 9998) foram detectadas no tanque pós-flocação e três isolados (CCVSU 9781, 9820 e 9834) foram recuperados do efluente tratado, conforme demonstrado na tabela 4. A presença de múltiplos STs nos diferentes pontos do sistema de tratamento evidencia a diversidade clonal, sugerindo a persistência e potencial disseminação de clones de *E. coli* resistentes no meio ambiente (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de cepas de *E. coli* portadoras do gene *mcr-1* por ST e ponto de coleta.

Código da Cepa	ST	CC	Ponto Estação
CCVSU 9786	1204		P1
CCVSU 11011	10		P1
CCVSU 11168	10183		P1
CCVSU 9803	2172		P2
CCVSU 9998	*		P2
CCVSU 9781	*	350	P3
CCVSU 9820	744		P3
CCVSU 9834	*	744	P3

Legenda: *ST não determinado

Para a construção da árvore filogenética dos diferentes STs das oito cepas de *E. coli*, foram inicialmente recuperadas 1090 linhagens a partir da busca realizada no PubMLST, provenientes de distintas origens. Dentre esses, foram selecionados 479, distribuídas em 37 países, para compor a análise filogenética global, uma vez que os demais não apresentavam informações completas sobre ano, país e/ou local de isolamento (Figura 15).

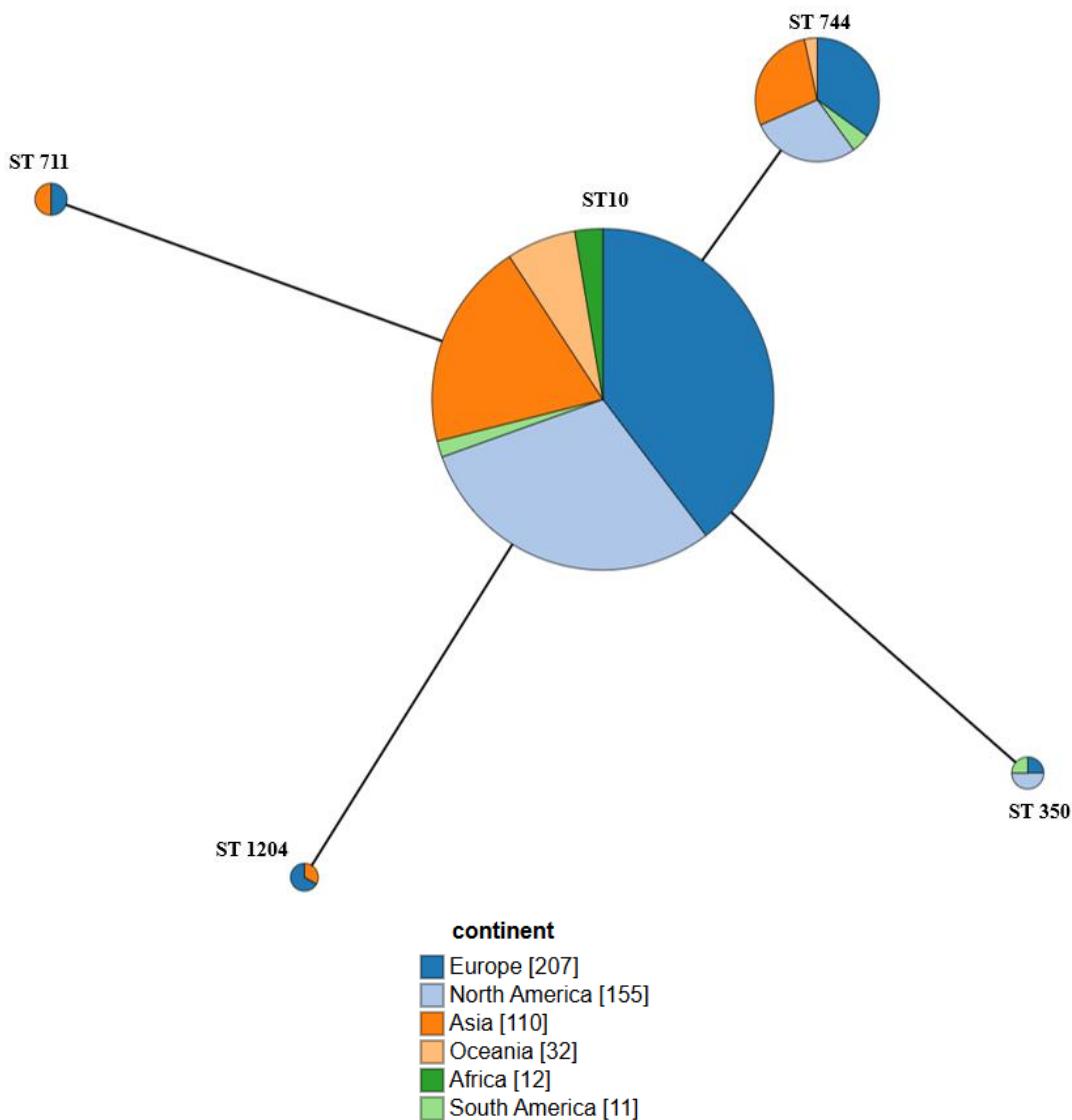


Figura 15. Sequence types (STs) de *E. coli* identificados no presente estudo, segundo dados do PubMLST.

Legenda: Distribuição geográfica de diferentes STs de *E. coli* entre os anos de 1971 e 2024. Os círculos representam os continentes onde foram reportados isolados, e os setores dos gráficos de pizza indicam a proporção relativa das principais fontes (humana, animal, ambiental e alimentos).

A análise da distribuição geográfica mostrou que os STs identificados em nosso estudo apresentam ampla disseminação global, com predominância na Ásia, seguida por registros na Europa, América do Norte e América do Sul. Esse achado sugere que determinados STs circulam em diferentes nichos ecológicos e países, reforçando sua importância epidemiológica.

A maior frequência de relatos na Ásia pode estar relacionada ao uso intensivo de antimicrobianos na produção animal, especialmente de polimixinas, prática ainda comum em alguns países do continente, favorecendo a seleção e disseminação de clones resistentes. Além disso, a elevada densidade populacional e a intensa produção agropecuária podem contribuir

para a manutenção desses STs no ambiente e sua transferência entre humanos, animais e efluentes (Mulchandani *et al.*, 2023).

Embora diversos relatos de ocorrência estejam disponíveis em nível mundial, no Brasil os registros são escassos, com apenas quatro cepas reportadas no PubMLST desde 1998, sendo três de origem ambiental e uma de origem animal.

Após a pandemia, Fuga *et al.* (2022) conduziram um levantamento do cenário brasileiro da resistência antimicrobiana ao longo de 45 anos (1974–2019), no qual foram avaliadas 167 cepas de *E. coli* provenientes da interface humano–animal–ambiente, isoladas em 40 cidades distribuídas por 16 estados com maior densidade populacional. Nesse conjunto, foram identificados 69 tipos distintos de STs, incluindo quatro novos, além da detecção de clones internacionais de relevância epidemiológica, tais como ST10, ST38, ST117, ST131, ST224, ST354, ST410, ST457, ST648 e ST744. Os STs mais frequentemente associados a hospedeiros humanos foram ST131, ST410 e ST354, enquanto em animais predominaram ST131 e ST648. Entre cepas ambientais e alimentares, destacaram-se ST38 e ST10, sendo este último previamente relatado como predominante em diferentes países europeus e asiáticos. Notavelmente, o ST744 foi identificado em uma amostra humana carreando simultaneamente os genes *bla*_{KPC-2} e *mcr*1.1, ressaltando sua importância clínica e epidemiológica. Esse panorama genético demonstra a ampla circulação de clones internacionais no Brasil, evidenciando sua adaptação a múltiplos nichos e hospedeiros, sob a perspectiva Uma Só Saúde, reforçando a necessidade de vigilância e uso racional de antimicrobianos, diante do agravamento da resistência no país, especialmente após a pandemia de COVID-19 (Fuga *et al.*, 2022).

Além disso, Fuga e colaboradores (2025) analisaram 32 amostras de carne de varejo — 12 de frango, 10 bovinas e 10 suínas — provenientes de sistemas de produção convencionais e livres de antibióticos, coletadas entre agosto de 2019 e fevereiro de 2020 em supermercados da cidade de São Paulo. Das 32 amostras, foram recuperadas 14 cepas de *E. coli*, sendo 12 provenientes de frango e duas de suínos, das quais nove foram selecionadas para análise detalhada. A tipificação molecular revelou diversos STs, incluindo ST38, ST57, ST117, ST350, ST443, ST15579, ST2179, ST2040 e ST3258. Destaca-se o ST350, previamente relatado em frangos na China e nos EUA, identificado neste estudo também em carne de frango de sistema convencional, evidenciando o papel da carne de varejo como reservatório e potencial via de transmissão de clones resistentes na interface humano-animal-ambiente (Fuga *et al.*, 2025).

Em Xangai, foi identificada uma cepa clínica de *E. coli* ST744 carreando simultaneamente os genes *bla*_{CTX-M-65}, *bla*_{OXA-1} e *mcr*-1.1. Essa cepa foi detectada entre 145 amostras fecais coletadas no período de setembro de 2021 a janeiro de 2022. Além de sua ocorrência em amostras clínicas, *E. coli* tem sido amplamente reportada em carne crua e em amostras fecais de animais e humanos na China, evidenciando o risco de transmissão interespécies e a necessidade de vigilância contínua (Feng *et al.*, 2023).

No sul da China, foi avaliada a ocorrência de *E. coli* *sul3*-positiva em animais entre 2015 e 2017. Das 150 amostras analisadas, 142 cepas de *E. coli* foram recuperadas, dos quais 46 apresentaram o gene *sul3*, distribuídos em 12 STs distintos. O ST746 foi o tipo predominante em galinhas, seguido pelo ST156 nesse mesmo hospedeiro. Outros STs detectados incluíram ST10, ST641 e ST101 em galinhas e suínos, e ST2178 em cães e suínos. Embora os STs ST23, ST156 e ST10, previamente associados a humanos, sendo o ST10 o mais comum em cepas de *E. coli* de urina humana, tenham apresentado baixa frequência, sua detecção evidencia a necessidade de atenção à transmissão potencial entre humanos e animais, reforçando a importância da vigilância contínua na interface humano-animal (Li *et al.*, 2022b).

Um estudo realizado na África do Sul, entre 2016 e 2017, analisou 520 amostras, sendo 270 de água ambiental (escoamento superficial; efluentes de abatedouros bovinos; efluentes de fazendas de gado, porcos e galinhas; águas residuais clínicas de um hospital universitário e amostras de três rios) e 250 de fezes clínicas. Nesse estudo, quatro cepas de *E. coli* EHEC O157:H7 foram selecionadas para análise clonal por MLST, que identificou três tipos de sequência (STs): ST10, ST11 e ST1204. As cepas oriundas de dois rios distintos pertenciam ao mesmo ST (ST1204), enquanto a cepa de um terceiro rio foi classificada como ST11 e a cepa do efluente de abatedouro bovino como ST10. Observou-se a predominância de EHEC O157:H7 em amostras ambientais quando comparadas às clínicas. A detecção de STs previamente associados a surtos em diferentes matrizes ambientais indica um potencial risco à saúde pública, especialmente para trabalhadores de abatedouros, consumidores de água não tratada e indivíduos que ingerem alimentos de origem animal mal-cozidos. Além disso, a presença desses clones no ambiente sugere a possibilidade de sua disseminação clonal em diferentes nichos, ampliando as oportunidades de exposição humana (Bolukaoto *et al.*, 2019).

Haenni e colaboradores (2017), analisaram 1398 cepas de *E. coli* quanto à presença dos genes *mcr-3* e *bla_{CTX-M-55}*, identificando 36 isolados positivos, detectadas em bezerros doentes na França, entre 2006 e 2016. A análise por MLST demonstrou a predominância do ST744 (29/36), indicando uma disseminação epidêmica desse clone. A ocorrência de *E. coli* ST744 já foi relatada em humanos, animais de produção e aves silvestres, reforçando sua relevância sob a perspectiva Uma Só Saúde (Haenni *et al.*, 2017).

A detecção de diversos STs de *E. coli* em diferentes contextos geográficos e hospedeiros, incluindo humanos, animais de produção e ambientes, evidencia a necessidade de estratégias de vigilância e controle da resistência antimicrobiana fundamentadas no conceito Uma Só Saúde. Assim, torna-se imprescindível fortalecer a vigilância epidemiológica, promover o uso racional de antimicrobianos e implementar medidas de controle efetivas para limitar a disseminação de clones multirresistentes, tanto em âmbito nacional quanto global (Almeida Da Silva *et al.*, [S.d.]; Salam *et al.*, 2023b).

4.5.4 Tipificação ilogenética de *E. coli*

Das 62 cepas de *Escherichia coli* identificadas, 13% (8/62) apresentaram resistência à colistina associada à presença do gene *mcr*. A análise por MLST revelou diversidade clonal entre os isolados. Adicionalmente, com base na classificação filogenética proposta por Clermont *et al.*, 2013, todas as cepas foram atribuídas ao grupo filogenético E.

Clermont *et al.* (2021) investigaram a diversidade genômica e a estrutura populacional do filogrupo E de *E. coli*, a partir da análise de 144 cepas de diferentes continentes, hospedeiros e estilos de vida, representando a diversidade do grupo filogenético. Os resultados revelaram que o filogrupo E apresenta alta diversidade genética, abrigando cepas representativas de diversos patótipos clínicos (como ExPEC, EPEC, STEC) e portadoras de múltiplos genes de resistência e virulência (Clermont *et al.*, 2021).

Zhuge *et al.* (2021) analisaram 1.332 cepas de *E. coli* obtidos de frangos doentes na China, no período de 2012 a 2017. A partir da tipificação filogenética proposta por Clermont, as cepas foram distribuídas em oito filogrupos, sendo identificadas as seguintes frequências: 19,1% no grupo A, 16,3% em B1, 18,7% em B2, 8,4% em C, 12,2% em D, 21,7% em F, 1,4% em E e 2,2% atribuídas ao Clade I (Zhuge *et al.*, 2021).

Um estudo realizado no México, em um abatedouro bovino, analisou 336 amostras (água, superfícies, carcaças e fezes), sendo 83,3% (280/336) positivas para *E. coli*. Estas, foram analisadas e classificadas em grupos filogenéticos, conforme proposto por Clermont *et al.* E, classificaram como 49,6% (139/280) das cepas pertencentes ao Filogrupo A, 17,5% (49/280) ao Filogrupo B1, 15,7% (44/280) ao Filogrupo B2 e 17,1% (48/280) no Filogrupo D. Os

isolados fecais (15,7% (44/280)) e de carcaça (12,5% (35/280)) constituíram a maior porcentagem de filogrupos patogênicos (B2 + D), seguidos pelas amostras de água (4,2% (12/280)) e superfícies (0,3% (1/280)) (Vázquez-Villanueva *et al.*, 2023).

Savin e colaboradores, investigaram dois abatedouros, um avícola e outro suinícola, localizados na Alemanha, com o objetivo de avaliar a diversidade de bactérias do grupo ESKAPE (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) e *E. coli*. No abatedouro avícola, seis cepas de *E. coli* foram identificadas potencialmente patogênicas (ExPEC) em amostras de água escaldante, evisceradores e esgoto da área de produção. Dentre essas, três pertenciam ao filogrupo F, duas ao grupo E e uma ao grupo B2. Em contrapartida, no abatedouro suinícola, observou-se menor ocorrência de ExPEC, com apenas duas cepas identificadas, ambas classificadas no filogrupo B2 (Savin *et al.*, 2020^a).

Kelly *et al.* (2024) analisaram 737 cepas de *Escherichia coli* isoladas de 260 poços artesianos privados no Canadá, entre 2019 e 2021. As cepas foram distribuídas entre os oito principais filogrupos: A (29,9%), B1 (33,0%), B2 (22,8%), C (1,1%), D (11,8%), E (0,4%), F (0,3%) e G (0,8%). Nenhum isolado foi atribuído aos clades crípticos de *E. coli* (Kelly *et al.*, 2024).

A predominância do filogrupo E em nosso estudo, especialmente associada à resistência à colistina, sugere que este grupo pode atuar como reservatório ambiental de genes de resistência, reforçando a importância do monitoramento contínuo de efluentes para avaliação do risco de disseminação de clones resistentes dentro do contexto *Uma Só Saúde*.

4.6 Sequenciamento Genômico

Foram detectadas cepas de *K. pneumoniae* ST15 e *Ent. Bugandensis* ST3343, portadoras do gene *mcr-1* e *mcr-10*, respectivamente nos três pontos de coleta analisados (P1, P2 e P3). No entanto, foram selecionadas para o sequenciamento completo do genoma somente as cepas do esgoto tratado (P3), *K. pneumoniae* ST15 (CCVSU 9999) *Ent. Bugandensis* ST3343 (CCVSU 9821).

4.6.1 *K. pneumoniae* Carreando *mcr-1*

A cepa CCVSU 9999 *mcr-1* positivo foi confirmada como *K. pneumoniae* por meio do Type Genome Server (TYGS) (Meier-Kolthoff; Göker, 2019). A predição pelo PathogenFinder indicou 89% de probabilidade de ser um patógeno humano. O sequenciamento genômico revelou a presença de quatro plasmídeos e múltiplos genes de resistência, incluindo *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-15}*, *sul-1*, *bla_{Shv-28}*, *oxa-1*, *tem-1* e *qnrE1*, que corresponderam ao perfil fenotípico de suscetibilidade, previamente observado. Além disso, o software PlasmidFinder identificou o plasmídeo tipo IncX4 portador do gene *mcr-1.18* (Figura 16).

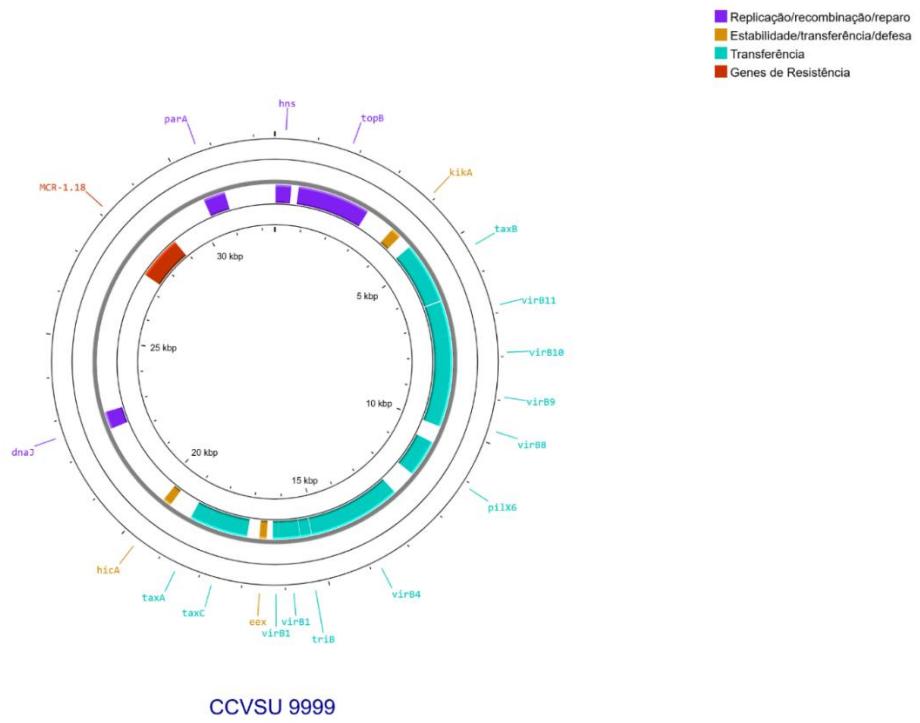


Figura 16. Representação circular do plasmídeo Pccvsu9999.

Plasmídeos do tipo IncX4 são portadores predominantes do gene *mcr-1* em *Enterobacteriales*. Pequenos (~32–34 kb), altamente conjugativos e com estrutura genômica compacta e conservada, esses plasmídeos facilitam a disseminação global da resistência à colistina em humanos, animais, alimentos e ambientes agrícolas. Os plasmídeos IncX4 foram identificados em diversas espécies bacterianas, especialmente *E. coli*, mas também *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, em amostras clínicas, animais, alimentos e ambientes por todo o mundo (Figura 17) (Touati *et al.*, 2025).



Highcharts.com © Natural Earth

Figura 17. Distribuição global do plasmídeo IncX4 em diferentes espécies bacterianas.

Foi descrito, na China, o primeiro relato de uma cepa de *K. pneumoniae* ST15 isolada de pintinhos mortos em uma granja, carreando simultaneamente os genes *mcr-1.1*, *mcr-8.1* e ESBLs (*bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-65}). A análise genômica revelou a presença de seis plasmídeos, destacando-se do tipo IncFII, portador de *mcr-8.1* e um do tipo IncI2, carregando *mcr-1.1* e *bla*_{CTX-M-55}, ambos com módulos de transferência conjugativa completos, evidenciando o potencial para disseminação horizontal desses determinantes de resistência. Esses achados demonstram a relevância de *K. pneumoniae* ST15 como clone de alto risco, capaz de atuar como reservatório de múltiplos genes de resistência em ambientes de produção avícola, representando uma ameaça direta à saúde pública (Cui *et al.*, 2025).

Em 2017, foi relatado no Quênia o primeiro registro do gene *mcr* em amostra clínica, a partir de um paciente hospitalizado. Foi detectada uma cepa de *K. pneumoniae* ST15 carreando o gene *mcr-8* associado a plasmídeos dos grupos IncR e IncHI1B, previamente relacionados à mobilização desse determinante de resistência. Esse achado é particularmente relevante, pois evidencia não apenas a disseminação de clones de alto risco, mas também a importância da vigilância contínua e do controle da disseminação de genes móveis de resistência à colistina em diferentes cenários epidemiológicos (Kyany'a; Musila, 2020).

Entre junho e setembro de 2016, foram coletadas 7.401 amostras de swab retal de indivíduos saudáveis em 30 províncias da China, das quais 59 isolados foram identificados como *Klebsiella* spp. Oito cepas portavam o gene *mcr-1* e, por WGS, foram atribuídas a sete STs distintos, incluindo duas ST15, que apresentaram coexistência de *mcr-1* e *mcr-8*. No ST15, *mcr-1* estava localizado no cromossomo, enquanto nos demais isolados os genes *mcr-1* e *mcr-8* estavam associados a plasmídeos IncHI2, IncX4, IncHI2/IncN e IncFIA. As cepas apresentaram ampla disseminação e alta diversidade clonal, indicando emergência isolada em adultos saudáveis. Esses dados reforçam que o ST15 é um vetor clonal importante para a disseminação de genes móveis de resistência à colistina e múltiplos genes de resistência, incluindo ESBLs (Lu *et al.*, 2020).

Os resultados do presente estudo corroboram com a crescente disseminação global de *K. pneumoniae* ST15 portadora do gene *mcr-1*, especialmente associada a plasmídeos IncX4. Desta forma, torna-se necessária a vigilância epidemiológica e adoção de medidas de controle rigorosas para prevenir a disseminação de *K. pneumoniae* ST15 portadora de *mcr-1*, especialmente em ambientes de produção animal e unidades de terapia intensiva hospitalares. A implementação de políticas que restrinjam o uso indiscriminado de colistina em animais e a promoção de práticas de controle de infecção são fundamentais para conter a propagação dessa ameaça à saúde pública (Berglund, 2019).

4.6.2 *Enterobacter* spp. Carreando *mcr-10* e *mcr-1*.

A cepa CCVSU 9821, pertencente a uma linhagem clonal única (ST3343), apresentou o gene *mcr-10*, que até onde é de nosso conhecimento, representa o primeiro relato no Brasil. A identificação da espécie como *Ent. Vonholyi* foi confirmada por meio do Type (Strain) Genome Server (TYGS) (Meier-Kolthoff; Göker, 2019). A cepa apresentou probabilidade > 96% de ser patógeno humano pelo PathogenFinder. Foram encontrados diversos genes de resistência, incluindo o *mcr-10*, *bla*_{ACT}, 39rior, e *oqxAB*, que correspondem ao perfil fenotípico de suscetibilidade previamente observado (Figura 18).

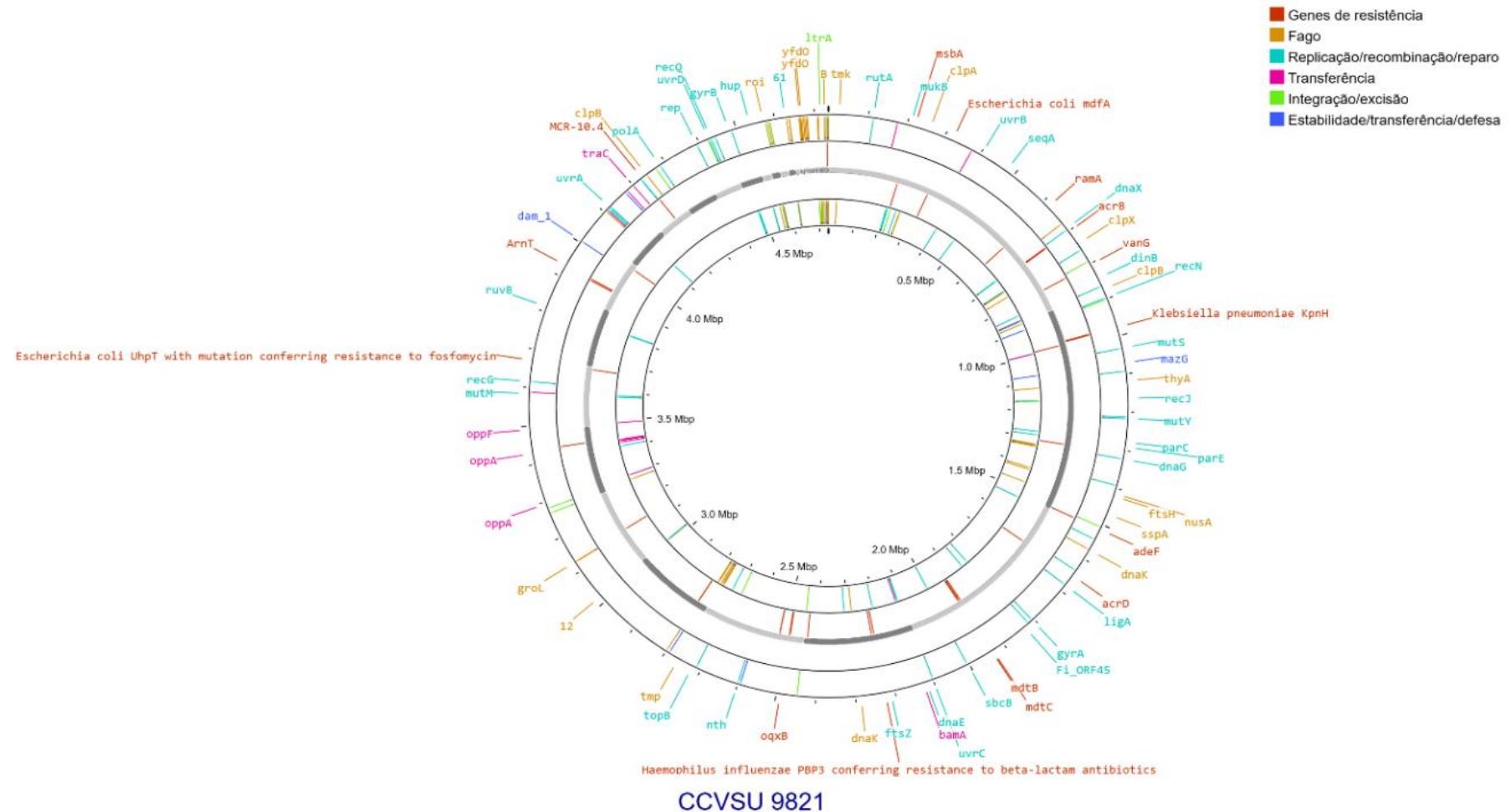


Figura 18. Representação circular do cromossomo CCVSU9821.

A espécie *Enterobacter vonholyi* sp. nov. foi proposta pela primeira vez em 2020, a partir de um estudo conduzido na Alemanha que analisou 42 cepas de enterobactérias resistentes a antibióticos isoladas de produtos frescos comercializados no varejo. Nesse estudo, a espécie foi inicialmente identificada em amostras de manjerona (Cho *et al.*, 2021).

Desde a identificação do gene *mcr-1* em 2015, já foram descritas dez variantes distintas (*mcr-1* a *mcr-10*). Essas variantes têm sido detectadas em bactérias isoladas de diferentes fontes, incluindo humanos, animais, vegetais e ambientes aquáticos, refletindo sua ampla distribuição no contexto Uma Só Saúde (Cherak *et al.*, 2021).

O gene *mcr-10* foi identificado pela primeira vez em uma cepa clínica de *Ent. Roggenkampii* na China, localizado em um plasmídeo do tipo IncFIA. Por meio de triagem em bancos de dados como o GenBank, verificou-se que o *mcr-10* está presente em diversas espécies de Enterobacteriaceae em 11 países distribuídos por quatro continentes (Austrália, Canadá, China, França, Alemanha, Japão, Holanda, Espanha, Tailândia, EUA e Vietnã), indicando que este gene se disseminou globalmente antes de ser descrito formalmente. Esses achados ressaltam a relevância do *mcr-10* para a saúde pública e reforçam a necessidade de medidas de vigilância epidemiológica contínua e o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle para conter a propagação de genes móveis de resistência à colistina (Wang *et al.*, 2020b).

Entre outubro de 2018 e agosto de 2020, foram analisadas 445 amostras de leite bovino com mastite clínica e 125 amostras de leite cru não pasteurizado no Egito. No total, 184 cepas bacterianas foram recuperadas, incluindo espécies multirresistentes como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Ent. Cloacae* e *Proteus mirabilis*. Neste estudo foi detectada uma cepa de *K. pneumoniae* oriunda de leite cru, carreando simultaneamente os genes *mcr-10* e *fosA5*, associados à resistência à colistina e fosfomicina. A análise mostrou que o gene *mcr-10* estava inserido em um plasmídeo IncFIB, com elevada similaridade a plasmídeos de *Enterobacter* spp. A cepa agrupou-se filogeneticamente com cepas *mcr-10* positivas de diferentes países e STs, ressaltando o risco de disseminação de genes de resistência a antibióticos de último recurso e a necessidade urgente de uso racional de antimicrobianos e programas de vigilância integrados (Tartor *et al.*, 2021).

Fraccalvieri e colaboradores, avaliaram a prevalência de Enterobacteriales resistentes à colistina em 1.000 amostras de alimentos crus e prontos para consumo entre 2018 e 2023, no sul da Itália. Detectaram 45 cepas resistentes, majoritariamente *Enterobacter* spp., seguidos por *Moellerella wisconsensis*, *Atlantibacter hermannii*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. Destes, sete eram portadores de genes *mcr*: um de *E. coli* com *mcr-1.1* e seis de *Enterobacter* spp. com *mcr-9.1* e *mcr-10.1*. Quatro dessas cepas continham plasmídeos IncHI2, sugerindo a contribuição de plasmídeos na transferência horizontal. Os resultados reforçam o papel dos alimentos como reservatórios de resistência à colistina e destacam a necessidade de monitoramento contínuo de genes *mcr* em patógenos transmitidos por alimentos. (Fraccalvieri *et al.*, 2025)

Em 2019, um estudo de vigilância realizado na China investigou a disseminação do gene *mcr-10* entre Enterobacteriales detectados em fezes de galinhas, trabalhadores de abatedouros e moradores locais. Foram identificadas 200 cepas, sendo 102 oriundas de galinhas, 58 de trabalhadores e 40 de moradores. Quatro cepas foram positivas para *mcr-10*, incluindo duas *K. pneumoniae* de galinhas, uma *E. coli* de um trabalhador e uma *Ent. Kobei* de um morador local. Os plasmídeos das cepas de *K. pneumoniae* apresentaram múltiplos genes de resistência antimicrobiana, como *mcr-10*, *mcr-8*, *qnrB52*, *qnrS1*, *sul1*, *tet(A)*, *blATEM-1B*, *blACTX-M-15* e *floR*, conferindo um fenótipo de multirresistência. Em contraste, o gene *mcr-10* da cepa de *Ent. Kobei* foi identificado no cromossomo, e não em plasmídeo.

A análise filogenética comparativa com cepas portadoras de *mcr-10* do GenBank revelou ampla diversidade genômica, com distribuição esporádica do gene em diferentes regiões geográficas e entre variados hospedeiros. Os achados evidenciam a presença de novos plasmídeos portadores de *mcr-10* e a capacidade de disseminação interespécies desse determinante de resistência, reforçando a necessidade de vigilância contínua e estudos adicionais para elucidar seus mecanismos de mobilização e impacto na saúde pública (Xu *et al.*, 2022b).

Foram coletadas 62 amostras de esgoto bruto provenientes de uma estação de tratamento da Itália, entre os anos de 2021 e 2022. Foram obtidas 22 cepas bacteriana, incluindo *E. coli* (n=14), *E. fergusonii* (n=4) e *Klebsiella* spp. (n=4). Três cepas de *K. quasipneumoniae* foram positivas para o gene *mcr-10*, identificados em plasmídeos IncFII(K) e IncR. Este estudo, representa o primeiro relato da detecção de *mcr-10* em *K. quasipneumoniae* na Itália, obtido por vigilância baseada em águas residuais. Os achados reforçam o potencial das águas residuais como ferramenta eficaz e custo-efetiva para a detecção precoce e rastreamento de genes de resistência antimicrobiana na interface humano-ambiente (Formenti *et al.*, 2022).

Nosso estudo demonstra que *Enterobacter* spp. portadoras de *mcr-10* persistem em efluentes de abatedouro avícola, inclusive após o tratamento, configurando um canal relevante de disseminação ambiental da resistência à colistina. Considerando o conceito *Uma só saúde* e a classificação da colistina como antibiótico crítico pela OMS (2019), nossos achados reforçam a necessidade de vigilância integrada envolvendo ambientes agrícola, clínico e ambiental. A detecção inédita de uma nova linhagem portadora de *mcr-10* no Brasil constitui um alerta regional com implicações globais, destacando a urgência de investir em tecnologias avançadas de tratamento de efluentes e em políticas restritivas ao uso da colistina na agropecuária, de modo a preservar a eficácia dos antimicrobianos de último recurso.

5 CONCLUSÕES

Este estudo destaca como as águas residuais de abatedouro avícola podem servir como reservatório e via de disseminação de determinantes de resistência à colistina, ou seja, genes móveis de resistência à colistina (*mcr*) em Enterobacterales. Os resultados enfatizam a ligação entre a poluição ambiental, a produção animal intensiva e o aumento da resistência bacteriana a medicamentos, que representam um grande risco para a saúde humana e animal. Regras mais rigorosas sobre o uso de antibióticos na agricultura e programas de vigilância são essenciais, como evidenciado pela descoberta de genes de resistência em efluentes lançados em corpos d'água naturais. Para retardar a disseminação da resistência e manter a eficácia de antibióticos de último recurso, como a colistina, é crucial aprimorar os métodos de tratamento de águas residuais e promover o conceito de Uma Só Saúde.

6 REFERÊNCIAS

- AGHAPOUR, Zahra *et al.* Molecular mechanisms related to colistin resistance in 44prioritization44eae. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 965–975, 2019.
- ALCOCK, Brian P. *et al.* CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. 1 D, p. D690–D699, 6 jan. 2023.
- ALMEIDA DA SILVA, Rafael *et al.* The One Health approach to face bacterial resistance to antibiotics in livestock production A Saúde Única no enfrentamento da resistência bacteriana a antibióticos no âmbito da agropecuária. [S.d.]
- ANDRADE, Ferdinando F. *et al.* Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 1 nov. 2020.
- ANGELETTI, Silvia. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, v. 138, p. 20–29, 1 jul. 2017.
- ANTIPOV, Dmitry *et al.* Metaviral SPAdes: Assembly of viruses from metagenomic data. **Bioinformatics**, v. 36, n. 14, p. 4126–4129, 15 jul. 2020.
- ANYANWU, Madubuike Umunna *et al.* Prevalence and Traits of Mobile Colistin Resistance Gene Harbouring Isolates from Different Ecosystems in Africa. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.
- ANYANWU, Madubuike Umunna *et al.* Mobile Colistin Resistance (mcr) Gene-Containing Organisms in Poultry Sector in Low- and Middle-Income Countries: Epidemiology, Characteristics, and One Health Control Strategies. **Antibiotics**, v. 12, n. 7, p. 1117, 1 jul. 2023.
- AZZOPARDI, Ernest A. *et al.* Colistin in burn intensive care: Back to the future? **Burns**, v. 39, n. 1, p. 7–15, fev. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA), **Relatório Anual 2025**. Disponível em: <https://abpa-br.org/noticias/abpa-lanca-seu-relatorio-anual-2025/>. 44prioritiz: 23 de Maio de 2025.
- BERGLUND, Björn. Acquired Resistance to Colistin via Chromosomal And Plasmid-Mediated Mechanisms in Klebsiella pneumoniae. **Infectious Microbes and Diseases**, v. 1, n. 1, p. 10–19, 1 set. 2019.
- BISWAS, Silpak *et al.* Colistin: An update on the antibiotic of the 21st century. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 10, n. 8, p. 917–934, ago. 2012.
- BOLUKAOTO, John Y. *et al.* Molecular characteristics and genotypic diversity of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 isolates in Gauteng region, South Africa. **Science of The Total Environment**, v. 692, p. 297–304, 20 nov. 2019.

BOROWIAK, Maria *et al.* Development of a Novel mcr-6 to mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of mcr-1 to mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011-2018) in Germany. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 4 fev. 2020.

BOUKI, Chryssa; VENIERI, Danae; DIAMADOPoulos, Evan. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 91, p. 1–9, 1 maio 2013.

BRANCO, N. M. C. et al. Ocorrência de antimicrobianos em águas superficiais e resíduais do Município do Rio de Janeiro: uma questão de vulnerabilidade ambiental e de saúde pública. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e415101019000, 2021.

BRASIL, Ministério Do Meio Ambiente. **Portaria CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Diário Oficial da União: República Federativa do Brasil – Imprensa Nacional, 16 maio 2011.

BRENNAN, Fiona P. *et al.* Characterization of environmentally persistent *Escherichia coli* isolates leached from an irish soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2175–2180, abr. 2010.

BrCAST – Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos.** 2025. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>.

BROGDEN, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

CALISKAN-AYDOGAN, Oznur; ALOCILJA, Evangelyn C. A Review of Carbapenem Resistance in Enterobacteriales and Its Detection Techniques. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1491, 1 jun. 2023.

CARATTOLI, Alessandra; HASMAN, Henrik. PlasmidFinder and In Silico Pmlst: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). **Methods in Molecular Biology**, v. 2075, p. 285–294, 2020.

CHEN, Shifu *et al.* Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884–i890, 1 set. 2018.

CHEN, Yun *et al.* Antibiotic resistance gene pollution in poultry farming environments and approaches for mitigation: A system review. **Poultry science**, v. 104, n. 3, 1 mar. 2025.

CHERAK, Zineb *et al.* Epidemiology of mobile colistin resistance (mcr) genes in aquatic environments. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 51–62, 1 dez. 2021.

CHERKAOUI, Abdessalam *et al.* Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1169, 1 abr. 2010.

CHI, Xiaohui *et al.* Strains of extended-spectrum β -lactamase-producing *klebsiella pneumoniae* occurring in environmental sources in a rural area of China by using whole-genome sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 211, 2019.

CHO, Gyu Sung *et al.* Polyphasic study of antibiotic-resistant enterobacteria isolated from fresh produce in Germany and description of *Enterobacter vonholyi* sp. Nov. isolated from marjoram and *Enterobacter dykesii* sp. Nov. isolated from mung bean sprout. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 44, n. 1, 1 jan. 2021.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, 2000.

CLERMONT, Olivier *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 58–65, fev. 2013.

CLERMONT, Olivier *et al.* Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. **Environmental Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 3107–3117, 2019.

CLERMONT, Olivier *et al.* The E phylogroup of *Escherichia coli* is highly diverse and mimics the whole *E. coli* species population structure. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 11, p. 7139–7151, 1 nov. 2021.

CLERMONT, Olivier; GORDON, David; DENAMUR, Erick. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 161, n. 5, p. 980–988, 1 maio 2015.

COSTA-JÚNIOR, Sérgio Dias *et al.* Gram-negative bacilli carrying *mcr* gene in Brazil: a pathogen on the rise. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 1009–1020, 1 jun. 2023.

CUI, Dong'an *et al.* Emerging patterns of antimicrobial resistance: Concurrent presence of *mcr*-1.1 and *mcr*-8.1 in a ST15 *Klebsiella pneumoniae* isolated from poultry in China. **Journal of Integrative Agriculture (JIA)**, v. 24, n. 1, p. 403–407, 1 jan. 2025.

DE KOSTER, Sien *et al.* One Health surveillance of colistin-resistant Enterobacteriales in Belgium and the Netherlands between 2017 and 2019. **PloS ONE**, v. 19, n. 2 February, 1 fev. 2024.

DERIS, Zakuan Z. et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. **The Journal of antibiotics**, v. 67, n. 2, p. 147-151, 2014

DI CESARE, Andrea *et al.* Treated wastewater: A hotspot for multidrug- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Environmental Pollution**, v. 359, p. 124598, 15 out. 2024.

DIALLO, Alpha Amadou *et al.* Persistence and prevalence of pathogenic and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in municipal wastewater treatment plant receiving slaughterhouse wastewater. **Water Research**, v. 47, n. 13, p. 4719–4729, 1 set. 2013a. DIANCOURT, Laure *et al.* Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178–4182, ago. 2005.

EL-SAYED AHMED, Mohamed Abd El Gawad *et al.* Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 868, 1 jan. 2020.

FAIRBROTHER, John M.; NADEAU, Éric; GYLES, Carlton L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 17–39, jun. 2005.

FALAGAS, Matthew E.; KASIAKOU, Sofia K. Toxicity of polymyxins: A systematic review of the evidence from old and recent studies. **Critical Care**, v. 10, n. 1, 13 fev. 2006.

FALAGAS, Matthew E.; RAFAILIDIS, Petros I.; MATTHAIOS, Dimitrios K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 4–5, p. 132–138, 1 ago. 2010.

FENG, Jun *et al.* Stability and genetic insights of the co-existence of blaCTX-M-65, blaOXA-1, and mcr-1.1 harboring conjugative IncI2 plasmid isolated from a clinical extensively-drug resistant *Escherichia coli* ST744 in Shanghai. **Frontiers in Public Health**, v. 11, p. 1216704, 2023.

FLORENSA, Alfred Ferrer *et al.* Whole-genome prediction of bacterial pathogenic capacity on novel bacteria using protein language models, with PathogenFinder2. **BioRxiv**, p. 2025.04.12.648497, 18 abr. 2025.

FORMENTI, Nicoletta *et al.* Wastewater-based surveillance in Italy leading to the first detection of mcr-10-positive *Klebsiella quasipneumoniae*. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 11, n. 1, p. 155, 1 dez. 2022.

FRACCALVIERI, Rosa *et al.* Isolation and Characterization of Colistin-Resistant Enterobacteriaceae from Foods in Two Italian Regions in the South of Italy. **Microorganisms**, v. 13, n. 1, p. 163, 1 jan. 2025.

FUGA, Bruna *et al.* WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e01256-21, 27 abr. 2022.

FUGA, Bruna *et al.* Extended-spectrum β-lactamase (EsBL)-producing *Escherichia coli* in antibiotic-free and conventional chicken meat, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 2025.

GALLARDO-GODOY, Alejandra *et al.* Activity and Predicted Nephrotoxicity of Synthetic Antibiotics Based on Polymyxin B. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 1068–1077, 11 fev. 2016.

GEHRING, Ronette; MOCHEL, Jonathan P.; SCHMEROLD, Ivo. Understanding the background and clinical significance of the WHO, WOAH, and EMA classifications of antimicrobials to mitigate antimicrobial resistance. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1153048, 2023.

GIRARDELLO, Raquel *et al.* Cation concentration variability of four distinct Mueller-Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2414–2418, jul. 2012.

GOUGH, Monisha; HANCOCK, R. E.; KELLY, Niamh M. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. **Infection and immunity**, v. 64, n. 12, p. 4922-4927, 1996.

GREGÓRIO, Mailson Gonçalves *et al.* Fatores que influenciam na qualidade da carne de frango: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e77996530, 12 ago. 2020.

HAENNI, Marisa *et al.* Epidemic spread of Escherichia coli ST744 isolates carrying mcr-3 and blaCTX-M-55 in cattle in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 2, p. 533, 1 fev. 2017.

HOLMES, Alison H. *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, 9 jan. 2016.

HOMEIER-BACHMANN, Timo *et al.* Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Wastewater of Abattoirs. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 568, 1 maio 2021^a.

ISLAM, Md Ariful *et al.* A review of antimicrobial usage practice in livestock and poultry production and its consequences on human and animal health. **Journal of advanced veterinary and animal research**, v. 11, n. 3, p. 675–685, 1 set. 2024.

Isolate information: id-811 (PDT000720785.1) – Enterobacter spp. isolates. Disponível em: <https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_ecloacae_isolates&page=info&id=811>. 48prioritiz: 17 ago. 2025.

JOHANSSON, Markus H. K. *et al.* Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 1, p. 101–109, 2021.

JOLLEY, Keith A.; BRAY, James E.; MAIDEN, Martin C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. **Wellcome Open Research**, v. 3, 2018.

KELLY, Madeleine *et al.* The use of *E. coli* phylogrouping and microbial source tracking (non-species specific, human-specific, bovine-specific bacteroidales markers) to elucidate hydro(geo)logical contamination mechanisms in southeastern Ontario, Canada. **Environmental Pollution**, v. 363, p. 125080, 15 dez. 2024.

KEMPF, Isabelle *et al.* What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 5, p. 379–383, 1 nov. 2013.

KIM, Yoonjung *et al.* In vivo emergence of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates of sequence type 357 during colistin treatment. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 3, p. 362–366, 2014.

KIPPER, Diéssy *et al.* Emergence, Dissemination and Antimicrobial Resistance of the Main Poultry-Associated *Salmonella* Serovars in Brazil. **Veterinary Sciences** 2022, Vol. 9, Page 405, v. 9, n. 8, p. 405, 3 ago. 2022.

KOBER, Luisa *et al.* Hop as a phytogenic alternative to antibiotic growth promoters in poultry production. **Journal of the science of food and agriculture**, 2024.

KUANA, Suzete Lora *et al.* *Campylobacter* em humanos e sua relação com animais de produção. **Higiene Alimentar**, v. 23, n. 178–179, p. 80–85, 2009.

KYANY'A, Cecilia; MUSILA, Lillian. Colistin Resistance Gene mcr-8 in a High-Risk Sequence Type 15 *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Kenya. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 39, p. e00783-20, 24 set. 2020.

LANDMAN, David *et al.* Polymyxins revisited. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 449–465, jul. 2008.

LI, Guoli *et al.* Genomic Insights into the Colistin Resistant mcr-Carrying *Escherichia coli* Strains in a Tertiary Hospital in China. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1522, 1 nov. 2022a.

LI, Qinmei *et al.* Antimicrobial Resistance and Transconjugants Characteristics of sul3 Positive *Escherichia coli* Isolated from Animals in Nanning, Guangxi Province. **Animals**, v. 12, n. 8, p. 976, 1 abr. 2022b.

LIU, Yi Yun *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 1 fev. 2016.

LU, Jiayue *et al.* Prevalence and molecular epidemiology of mcr-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in healthy adults from China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 9, p. 2485–2494, 1 set. 2020.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 1 mar. 2012.

MAIDEN, Martin C. J. *et al.* MLST revisited: The gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728–736, out. 2013.

MANAIA, Célia M. *et al.* Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1543–1557, 1 fev. 2016.

MANNI, Mosè *et al.* BUSCO: Assessing Genomic Data Quality and Beyond. **Current Protocols**, v. 1, n. 12, p. e323, 1 dez. 2021.

MATAMOROS, S., van Hattem, J.M., Arcilla, M.S. *et al.* Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. **Scientific Reports** 7, 15364 (2017).

MEIER-KOLTHOFF, Jan P.; GÖKER, Markus. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2019.

MENDES, Carlos Alberto Caldeira; BURDMANN, Emmanuel A. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 752–759, 2009.

MENTASTI, M. *et al.* Rapid detection and differentiation of mobile colistin resistance (*mcr-1* to *mcr-10*) genes by real-time PCR and melt-curve analysis. **The Journal of hospital infection**, v. 110, p. 148–155, 1 abr. 2021.

MICHAEL, I. *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. **Water Research**, v. 47, n. 3, p. 957–995, 1 mar. 2013.

MIYOSHI-AKIYAMA, Tohru *et al.* Multilocus Sequence Typing (MLST) for Characterization of Enterobacter cloacae. **PloS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66358, 11 jun. 2013.

MMATLI, Masego; MBELLE, Nontombi Marylucy; SEKYERE, John Osei. Global Epidemiology and Genetic Environment of *mcr* genes: A One Health Systematic Review of Current and Emerging Trends. **MedRxiv**, p. 2022.02.28.22271560, 1 mar. 2022a.

MOGI, Tatsushi; KITA, Kiyoshi. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 23, p. 3821–3826, 2009.

MONDAL, Aftab Hossain *et al.* A Review on Colistin Resistance: An Antibiotic of Last Resort. **Microorganisms**, v. 12, n. 4, p. 772, 1 abr. 2024a.

MOORE, David P. Battling antimicrobial resistance: new guidance and insights. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 0, n. 0, 2025.

MULCHANDANI, Ranya *et al.* Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030. **PLOS Global Public Health**, v. 3, n. 2, p. e0001305, 1 fev. 2023.

NATION, Roger L.; LI, Jian. Colistin in the 21st century. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 535–543, dez. 2009.

NGUYEN, Anh Q. *et al.* Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: Current strategies and future challenges. **Science of The Total Environment**, v. 783, p. 146964, 20 ago. 2021.

NUNES, Juliana Ferreira *et al.* Poultry slaughterhouse wastewater as a source of bacterial antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 3363–3372, 1 dez. 2024.

O'NEILL, J. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. **The review on antimicrobial resistance**. 2015. Disponível em:<https://amrreview.org/sites/default/files/Antimicrobials%20in%20agriculture%20and%20the%20environment%20%20Reducing%20unnecessary%20use%20and%20waste.pdf>.

PARENTE, C. E. T.; AZEREDO, A.; VOLLÚ, R. E.; ZONTA, E.; AZEVEDO-SILVA, C. E.; BRITO, E. M. S.; SELDIN, L.; TORRES, J. P. M.; MEIRE, R. O.; MALM, O. Fluoroquinolones in agricultural soils: Multi-temporal variation and risks in Rio de Janeiro upland region. **Chemosphere**, vol. 219, p. 409–417, Mar. 2019.

PILATI, Giulia Von Tönnemann *et al.* Isolation and Characterization of Escherichia coli from Brazilian Broilers. **Microorganisms 2024, Vol. 12, Page 1463**, v. 12, n. 7, p. 1463, 18 jul. 2024.

POIREL, Laurent; JAYOL, Aurélie; NORDMANNA, Patrice. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 557–596, 1 abr. 2017.

Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) — Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/programa-nacional-de-sanidade-avicola-pnsa?utm_source=chatgpt.com>. 51rioritiz: 19 maio. 2025.

PULJKO, Ana *et al.* Treated municipal wastewater as a source of high-risk and emerging multidrug-resistant clones of *E. coli* and other Enterobacteriales producing extended-spectrum β-lactamases. **Environmental Research**, v. 243, p. 117792, 15 fev. 2024.

QUIROGA, Cecilia; NASTRO, Marcela; DI CONZA, José. Current scenario of plasmid-mediated colistin resistance in Latin America. **Revista argentina de 51rioritatio**, v. 51, n. 1, p. 93-100, 2019.

REBELO, Ana Rita *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 23, n. 6, 8 fev. 2018.

REGUA-MANGIA, Adriana Hamond. MÉTODOS MOLECULARES NA VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE DOENÇAS INFECCIOSAS. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde – ISSN:2236-1103**, 8 maio 2015.

RIZZO, L. *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 345–360, 1 mar. 2013a.

ROCHA, Jaqueline *et al.* Third generation cephalosporin-resistant *Klebsiella pneumoniae* thriving in patients and in wastewater: what do they have in common? **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2022.

RODRIGUES, Naiara Miranda Bento *et al.* The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests:

a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 48, n. 1, p. 132–138, 1 jan. 2017.

SALAM, Md Abdus *et al.* Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. 2023a.

SATI, Hatim *et al.* The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a 52rioritization study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 0, n. 0, 2025.

SAVIN, Mykhailo *et al.* ESKAPE Bacteria and Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Escherichia coli Isolated from Wastewater and Process Water from German Poultry Slaughterhouses. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 8, 1 abr. 2020a.

SAVIN, Mykhailo *et al.* Colistin-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Process Waters and Wastewater From German Poultry and Pig Slaughterhouses. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 575391, 30 out. 2020b.

SAVIN, Mykhailo *et al.* Antibiotic-resistant bacteria, antibiotic resistance genes, and antibiotic residues in wastewater from a poultry slaughterhouse after conventional and advanced treatments. **Scientific Reports 2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 17 ago. 2021.

SAVIN, Mykhailo *et al.* Slaughterhouse wastewater as a reservoir for extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing, and colistin-resistant Klebsiella spp. And their impact in a “One Health” perspective. **Science of The Total Environment**, v. 804, p. 150000, 15 jan. 2022.

SCHMIDT, Nádia Solange; DA SILVA, Christian Luiz. Pesquisa e Desenvolvimento na Cadeia Produtiva de Frangos de Corte no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 3, p. 467–482, 1 jul. 2018.

SUN J, Zhang H, Liu YH, Feng Y. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. **Trends Microbiobiology**. V. 26, n. 9, p. 794-808, Sep. 2018.

TARTOR, Yasmine H. *et al.* Whole-Genome Sequencing of Gram-Negative Bacteria Isolated From Bovine Mastitis and Raw Milk: The First Emergence of Colistin mcr-10 and Fosfomycin fosA5 Resistance Genes in Klebsiella pneumoniae in Middle East. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 770813, 8 dez. 2021.

TETZSCHNER, Anna Maria Malberg *et al.* In Silico genotyping of Escherichia coli isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 10, 1 out. 2020.

TOUATI, Abdelaziz *et al.* One Health at Risk: Plasmid-Mediated Spread of mcr-1 Across Clinical, Agricultural, and Environmental Ecosystems. **Antibiotics**, v. 14, n. 5, p. 506, 1 maio 2025.

TSOLAKIDOU, Pandora *et al.* NDM-1 and VIM-1 dual metallo-beta-lactamase producing Klebsiella pneumoniae ST15 high-risk clone from a blood culture of a patient at Intensive Care

Unit in a Greek Tertiary Care Hospital. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 72, n. 2, p. 93–98, 24 mar. 2025.

TYSO, Gregory H. *et al.* The mcr-9 Gene of *Salmonella* and *Escherichia coli* Is Not Associated with Colistin Resistance in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 8, p. e00573-20, 1 ago. 2020.

VÁZQUEZ-VILLANUEVA, José *et al.* Molecular and Antimicrobial Susceptibility Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Bovine Slaughterhouse Process. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 291, 1 fev. 2023.

VELKOV, Tony *et al.* Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1898–1916, 11 mar. 2010.

WANG, Chengcheng *et al.* Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 508–516, 1 jan. 2020a. WANG, Xinxing *et al.* Detection of mcr-1-positive *Escherichia coli* in slaughterhouse wastewater collected from Dawen river. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 5, p. 1587–1592, 1 set. 2021.

WICK, Ryan R. *et al.* Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PloS Computational Biology**, v. 13, n. 6, 1 jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* Critically important antimicrobials for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use: report of the second. **WHO Expert Meeting**, Copenhagen, 29-31 May 2000.

XEDZRO, Christian *et al.* First Report of mcr-10 in a Seafood-Borne ESBL-Producing *Enterobacter xiangfangensis* Strain. **Current Microbiology**, v. 82, n. 5, p. 1–8, 1 maio 2025.

XIAO, Zhihua *et al.* Insights into the removal of antibiotics from livestock and aquaculture wastewater by algae-bacteria symbiosis systems. **Environmental Research**, v. 257, p. 119326, 15 set. 2024.

XU, Linna *et al.* Emergence of Colistin Resistance Gene mcr- 10 in Enterobacterales Isolates Recovered from Fecal Samples of Chickens, Slaughterhouse Workers, and a Nearby Resident. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 2, 27 abr. 2022^a.

XU, Te *et al.* Clinical and resistance characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from intensive care units in China. **Annals of Translational Medicine**, v. 10, n. 20, p. 1109–1109, out. 2022c.

ZANOL, Mirel Bonadiman *et al.* Assessment of characteristics and treatment processes of wastewater from slaughterhouses in the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 358, p. 120862, 1 maio 2024.

ZHANG, Shaqiu *et al.* Updates on the global dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli*: An emerging threat to public health. **Science of The Total Environment**, v. 799, p. 149280, 10 dez. 2021.

ZHOU, Qian *et al.* Prevalence, detection of virulence genes and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from arbor acres broilers feeding cycle in China. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, 2024.

ZHUGE, Xiangkai *et al.* Chicken-source *Escherichia coli* within phylogroup F shares virulence genotypes and is closely related to extraintestinal pathogenic *E. coli* causing human infections. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 2, p. 880–895, 1 mar. 2021.

7 ANEXOS

ANEXO A

Cepas resistentes à colistina, com suas respectivas CIMs e pontos de coleta.

Espécie	Código da cepa	CIM colistina (ug/mL)	Ponto Estação
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9786	2	Efluente bruto (P1)
<i>Klebsiella variicola</i>	CCVSU 9799	128	Efluente bruto (P1)
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9804	4	Efluente bruto (P1)
<i>Enterobacter asburiae</i>	CCVSU 9809	2	Efluente bruto (P1)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CCVSU 9813	512	Efluente bruto (P1)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9819	8	Efluente bruto (P1)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9831	2	Efluente bruto (P1)
<i>Enterobacter sp.</i>	CCVSU 9839	> 512	Efluente bruto (P1)
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9844	> 512	Efluente bruto (P1)
<i>Enterobacter asburiae</i>	CCVSU 9846	512	Efluente bruto (P1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCVSU 9977	512	Efluente bruto (P1)
<i>Enterobacter asburiae</i>	CCVSU 9995	512	Efluente bruto (P1)
<i>Enterobacter asburiae</i>	CCVSU 9997	256	Efluente bruto (P1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCVSU 11002	4	Efluente bruto (P1)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 11011	2	Efluente bruto (P1)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 11168	256	Efluente bruto (P1)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 11169	> 512	Efluente bruto (P1)
<i>Enterobacter rogenkampii</i>	CCVSU 11593	512	Efluente bruto (P1)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9803	2	Pós-flocação (P2)
<i>Enterobacter asburiae</i>	CCVSU 9805	32	Pós-flocação (P2)
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9806	256	Pós-flocação (P2)
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9807	4	Pós-flocação (P2)
<i>Enterobacter asburiae</i>	CCVSU 9976	> 512	Pós-flocação (P2)
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9992	512	Pós-flocação (P2)
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9994	> 512	Pós-flocação (P2)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9998	4	Pós-flocação (P2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCVSU 11017	512	Pós-flocação (P2)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCVSU 11596	4	Pós-flocação (P2)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9781	256	Efluente tratado (P3)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9783	> 512	Efluente tratado (P3)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9820	2	Efluente tratado (P3)
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9821	> 512	Efluente tratado (P3)
<i>Enterobacter hormaechei</i>	CCVSU 9829	2	Efluente tratado (P3)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9834	2	Efluente tratado (P3)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9840	4	Efluente tratado (P3)
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCVSU 9978	8	Efluente tratado (P3)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCVSU 9999	8	Efluente tratado (P3)
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 11007	256	Efluente tratado (P3)
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 11515	4	Efluente tratado (P3)

ANEXO B

Cepas resistentes à colistina portadoras de gene *mcr*, com suas respectivas CIMs e pontos de coleta.

Espécie	Código da cepa	CIM colistina (ug/mL)	Gene detectado	Ponto Estação
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9786	2	<i>mcr-1</i>	P1
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 11011	2	<i>mcr-1</i>	P1
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 11168	256	<i>mcr-1</i>	P1
<i>Enterobacter</i> sp.	CCVSU 9839	> 512	<i>mcr-1</i>	P1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCVSU 11002	4	<i>mcr-1</i>	P1
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9844	> 512	<i>mcr-10</i>	P1
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9803	2	<i>mcr-1</i>	P2
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9998	4	<i>mcr-1</i>	P2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCVSU 11596	4	<i>mcr-1</i>	P2
<i>Enterobacter hormaechei</i>	CCVSU 9829	2	<i>mcr-1</i>	P2
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9992	512	<i>mcr-10</i>	P2
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9781	256	<i>mcr-1</i>	P3
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9820	2	<i>mcr-1</i>	P3
<i>Escherichia coli</i>	CCVSU 9834	2	<i>mcr-1</i>	P3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CCVSU 9999	8	<i>mcr-1</i>	P3
<i>Enterobacter bugandensis</i>	CCVSU 9821	> 512	<i>mcr-10</i>	P3