

Editora Dra. Gislaine Fongaro

BACTERIÓFAGOS

INTRODUÇÃO ÀS SUAS CARACTERÍSTICAS,
CLASSIFICAÇÃO E APLICAÇÕES

APLICAÇÕES CLÍNICAS E ODONTOLÓGICAS

TENDÊNCIAS ALIMENTARES E AMBIENTAIS

DESAFIOS DA RESISTÊNCIA BACTERIANA
RELACIONADOS AOS BACTERIÓFAGOS

©Dos Organizadores, 2024

Editoração: GS4 Editora

Capa: MsC. Yasmin Ferreira Souza Hoffmann Jempierre (Biomédica - contato: yasminfshoffmann@gmail.com)

Revisão: MsC. Beatriz Pereira Savi (Biologia - contato: beatrizsavi2@gmail.com) e MsC. Isabella Dai Prá

(Farmacêutica - contato: isabelladaiprazuchi13@gmail.com)

Open access publication by GS4 Editora.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais

Esta obra é uma produção independente. A exatidão das informações, opiniões e conceitos emitidos, bem como da procedência das tabelas, quadros, mapas e fotografias é de exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Nota: Muito zelo e técnica foram empregados neste livro. No entanto, podem ocorrer erros de digitação ou dúvida conceitual. Em qualquer das hipóteses, solicitamos a comunicação ao nosso Serviço de Atendimento ao Cliente, para podermos esclarecer ou encaminhar a questão.

Serviço de Atendimento ao Cliente

(49) 98847-8760

editorial@gs4editora.com

ISBN: 978-65-998418-7-3

DOI: 10.56041/9786599841873

Todos os direitos reservados.

DADOS INTERNACIONAIS PARA CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

B131 Bacteriófagos - Volume 1 / Organizador/Editor:
Dra. Gislaine Fongaro. -- Concórdia, SC : GS4
Editora, 2024.
1 livro digital (2836kb) : il. color. ; PDF.

Requisitos do sistema: Adobe Acrobat Reader
Acesso: World Wide Web
ISBN 978-65-998418-7-3

1. Bacteriófagos. I. Fongaro, Gislane.

CDD 574
CDU 576.89

Elaborada por: Amanda Moura de Sousa CRB-7/5992

Índices para Catálogo Sistemático:

1. Bacteriófagos 574
2. Bacteriófagos 576.89

2. BACTERIÓFAGOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM RESISTÊNCIA BACTERIANA

DOI: 10.56041/9786599841873-2

CADAMURO, Rafael Dorighello

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-4096-9022>

PILATI, Giulia Von Tönnemann

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-9689-0279>

PESSI, Leonardo da Silveira

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<https://orcid.org/0000-0002-4253-7792>

BATISTA, Jéssica Sueli dos Santos

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<https://orcid.org/0009-0008-5826-6211>

ROGOVSKI, Paula

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<https://orcid.org/0000-0003-1541-3636>

FONGARO, Gislaine

Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
CCB/UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<https://orcid.org/0000-0001-5596-3320>

Resumo

A resistência antimicrobiana (RAM) é um desafio de saúde pública, com origens na descoberta da penicilina, quando já se notava a capacidade das bactérias de desenvolver resistência a qual pode ser natural ou adquirida, por mutações e transferência de genes (THG), acelerada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos e animais. O uso de antibióticos na produção animal, embora inicialmente benéfico, contribuiu para o surgimento de cepas multirresistentes, como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.. Desde 2010, organizações como a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura), a OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) e a OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde) têm trabalhado em conjunto para combater a RAM por meio da abordagem *One Health*. Em 2018, o Brasil implementou o “Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos”, com vigilância nos setores agropecuários. O “Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos” analisa a resistência em alimentos de origem animal, com foco na avicultura, suinocultura e bovinocultura de corte, monitorando microrganismos como *Salmonella* e *Escherichia coli*. A ANVISA também implementa programas de gerenciamento de antimicrobianos (PGA), visando boas práticas de prescrição e controle. Além disso, a abordagem *One Health* é essencial, pois a resistência antimicrobiana é um fenômeno global que interconecta os setores humano, animal e ambiental. Isso requer uma resposta colaborativa para mitigar seus impactos, considerando as atividades humanas que alteram ecossistemas e promovem doenças zoonóticas emergentes.

Palavras-chave: resistência antimicrobiana; saúde única; transferência horizontal de genes.

2.1 Evidências históricas da resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é um dos maiores problemas de saúde pública que acometem a população mundial no século XXI, no entanto, tal situação não é exclusiva de nosso século. Desde a descoberta da penicilina em meados dos anos 1940, o próprio Alexander Fleming notou a capacidade evolutiva das bactérias de resistirem aos seus tratamentos e que, a utilização dos antimicrobianos de forma irracional foi um dos principais fatores para o desencadeamento das resistências. Medicamentos que antes eram tratados como a salvação das doenças infecciosas, hoje enfrentam um grande problema por falta de novas descobertas de antimicrobianos (Mcewen; Collignon, 2018).

Estudos demonstram que as resistências sempre existiram e são processos de adaptação bacteriana visando sua defesa e sobrevivência, exemplo disso são de bactérias oriundas de uma caverna isolada da região do Novo México nos EUA, onde bactérias datadas de mais de quatro milhões de anos apresentavam resistências a mais de 10 antibióticos existentes no mercado atual (Van Der Kolk, 2015). Além disso, sabe-se que muitos dos antibióticos atualmente comercializados tiveram sua origem em outros microrganismos e compostos naturais, o que explica a evolução da resistência por partes das bactérias mesmo sem o contato direto com o antibiótico como se conhece atualmente. Devido à carência de evidências fósseis de origem bacteriana, os estudos filogenéticos para a compreensão da evolução das resistências têm se mostrado uma área de estudo promissora (Waglechner *et al.*, 2021).

A era de ouro do uso dos antibióticos surgiu como citado anteriormente, com a popularização do uso da penicilina por Alexander Fleming em meados de 1940, durante a Segunda Guerra Mundial. A popularização foi tão grande que as pesquisas por novas moléculas com atividades bacteriostáticas e bactericidas obtiveram um grande aporte financeiro para pesquisas e desenvolvimentos de outras classe que não as penicilinas, levando a descoberta e elucidação da classe dos nitrofuranos, macrolídeos e tetraciclínas nos anos 1950, as quinolonas nos anos 1960 e as oxazolidinas nos anos 1980. Desde então, a dificuldade de elucidação de novos antibióticos juntamente com o uso excessivo influenciou a crítica situação de saúde pública que se observa atualmente (Uddin *et al.*, 2021).

2.2 Mecanismos naturais de resistência e sua evolução ao longo do tempo

As bactérias possuem o que se conhece como resistência intrínseca, ou seja, um mecanismo pelo qual naturalmente possuem a capacidade de resistir aos tratamentos com antibióticos. Este mecanismo não é exclusivo para um tipo de antibiótico, pois cada organismo bacteriano possui sua forma de se defender contra invasores e danos que possam causar sua destruição. Essa resistência pode ocorrer por diversos processos distintos, como a inativação de um composto que tem como representantes mais comuns as bactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) que possuem um mecanismo de produção de uma enzima com capacidade de romper a composição química de β -lactâmicos e derivados, a alteração do calibre das porinas situadas na parede celular impedindo que o antibiótico atinja seu alvo farmacológico, a produção de bombas de efluxo responsáveis por expulsar o composto assim que ele atravessa a parede bacteriana, a alteração de sítio de ligação que promove a síntese de proteínas semelhantes à do alvo farmacológico visando desviar o antibiótico de seu verdadeiro alvo e os fatores genéticos que estão relacionados a processos de

mutação e transmissão horizontal de genes (Pulingam *et al.*, 2022).

A transmissão horizontal de genes (HGT) é um mecanismo de resistência que visa obtenção de material genético exógeno visando sobrevivência bacteriana, dessa forma, a bactéria consegue integrar genes que lhe conferem resistência a um determinado antibiótico e suas células filha também herdarão esses genes, dentre os processos mais conhecidos de HGT encontram-se a conjugação, onde ocorre a transferência de material genético entre bactérias, a transformação, processo responsável por aquisição de DNA livre no ambiente e sua incorporação e a transdução que ocorre concomitantemente com o ciclo de replicação de um bacteriófago (Lerminiaux & Cameron, 2019).

2.3 Impacto do uso de antibióticos na seleção e disseminação de resistência

O uso de antibióticos seja na medicina humana ou animal ainda é amplamente utilizado ao redor do mundo, no entanto, com o aumento das resistências por parte das bactérias, notam-se cepas resistentes e de difícil tratamento (Batuman *et al.*, 2024; Patangia *et al.*, 2022). As resistências desenvolvidas pelas bactérias aos seus antibióticos alvos geram um quadro de seleção de bactérias multirresistentes a diversas classes de antibióticos, gerando um quadro cada vez mais alarmante tratando-se da disseminação das resistências, além disso, atualmente enfrenta-se um grupo seletivo de bactérias conhecidas como ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp). Estas desenvolveram múltiplas resistências e acenderam um alerta vermelho para todos os setores que lidam com a administração de antibióticos, como o setor farmacêutico e pecuário (De Oliveira *et al.*, 2020).

Visando diminuir o surgimento de resistências, medidas como padronização do uso de antibióticos, acesso à saúde, qualidade de saneamento e água potável, são medidas que devem ser tomadas para que essa crise cesse (Samreen *et al.*, 2021). A sociedade já enfrentou diversas condições de saúde pública, na qual estas medidas foram essenciais para o sucesso no tratamento de diversas enfermidades, como a peste-bubônica, que mesmo sendo um quadro endêmico atualmente, em diversos países subdesenvolvidos como Madagascar e Congo, foi possível o seu controle e eliminação (Glatter & Finkelman, 2020).

2.4 Bacteriófagos e transferência de genes de resistência

A descoberta dos fagos remonta a 1896, quando o bacteriologista britânico Ernest Hanbury Hankin relatou atividade antibacteriana nas águas dos rios Ganges e Yamuna, na Índia. Observou-se que um componente filtrável e sensível ao calor limitava a infecção bacteriana, embora o agente responsável não tenha sido identificado (Moelling *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2017). Anos depois, o professor de bacteriologia Frederick William Twort e o pesquisador microbiologista Félix d'Herelle descreveram, quase simultaneamente, agentes que restringiam o crescimento bacteriano em suas pesquisas. Assim, o crédito e mérito pela descoberta dos bacteriófagos é atribuído independentemente a esses dois cientistas (Twort, 1915).

Desde os primeiros estudos sobre as interações entre bacteriófagos e bactérias, diversas comunidades têm sido utilizadas para corroborar teorias evolutivas que envolvam ambos os grupos (Brockhurst & Koskella, 2013). Os ciclos de vida de curta duração e as populações numerosas

de células bacterianas facilitam o processo evolutivo, assim como o processo de seleção natural (McDonald, 2019).

Atualmente, compreende-se que os bacteriófagos podem infectar uma ampla gama de bactérias, embora a literatura também descreva fagos monovalentes, capazes de infectar grupos específicos. Ainda assim, a gama de hospedeiros pode apresentar certa plasticidade ao longo do tempo, demonstrando a capacidade de evolução por meio da seleção natural dependendo dos ambientes. Mutações específicas em regiões do genoma do fago podem permitir a infecção de outros grupos de bactérias, codificando para novas proteínas. Essa ocorrência é bem observada na natureza, atravessando espécies, gêneros, famílias e classes de bactérias (De Jonge *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2016).

Dentre as interações que ocorrem entre bactérias e bacteriófagos, podemos destacar a transferência horizontal de genes (HGT), um mecanismo evolutivo que permite a troca de material genético entre diferentes células bacterianas. Por meio deste, os bacteriófagos desempenham um papel fundamental na evolução e patogênese bacteriana ao transferir material genético entre diferentes bactérias (Brüssow *et al.*, 2004; Canchaya *et al.*, 2003).

Ao infectar um hospedeiro, os fagos temperados podem integrar-se ao cromossomo do hospedeiro, no qual permanecem como profagos, até serem reativados sob certas condições específicas. Profagos que carregam genes codificadores de toxinas e outros fatores de virulência podem provocar conversão lisogênica, que pode contribuir para a patogênese bacteriana (Meng *et al.*, 2022; Penadés & Christie, 2015).

A replicação de fagos e bactérias está intrinsecamente conectada, compartilhando a maquinaria bacteriana como recurso. À medida que as bactérias atingem a fase estacionária e cessam a proliferação, os fagos tendem a agir concomitantemente (Roy *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2014). A transdução, um dos mecanismos de transferência horizontal de genes mediado por fagos, desempenha um papel crucial nesse contexto, ocorrendo em três formas distintas: generalizada, especializada e lateral.

2.4.1 Transdução generalizada

Durante a transdução generalizada, os bacteriófagos podem empacotar e transferir DNA bacteriano, seja ele cromossômico ou plasmidial, para um novo hospedeiro bacteriano. Esse processo ocorre quando o DNA do hospedeiro é erroneamente incorporado na cápsula do fago durante o empacotamento, em vez do genoma viral. Este fenômeno é especialmente comum em fagos do tipo *pac*, devido ao seu mecanismo específico de empacotamento. Fagos do tipo *pac* preenchem seus capsídeos com material genético até que um códon específico indique parada no processo de empacotamento. Conforme regiões pseudo-*pac* são identificadas, logo, o genoma bacteriano é encapsulado ao invés do viral, gerando fagos sem capacidade replicativa, mas, com possibilidade de transferência de genes para outras bactérias (Thierauf *et al.*, 2009).

2.4.2 Transdução especializada

A transdução especializada foi inicialmente identificada em colifagos λ , sendo o segundo mecanismo de transdução descoberto. Diferente da transdução generalizada, a qual pode empacotar qualquer tipo de DNA bacteriano, a transdução especializada empacota apenas conjuntos específicos de genes. Nesse processo, as partículas fágicas são formadas com uma combinação de DNA viral e

DNA do hospedeiro, criando uma molécula híbrida. O mecanismo é baseado no modelo dos colifagos λ , no qual a excisão do DNA viral frequentemente inclui segmentos adjacentes do DNA bacteriano do hospedeiro. Se um sítio *cos* é preservado, o DNA híbrido pode ser empacotado em capsídeos fágicos pela maquinaria de empacotamento *cos* e transferido para novas células hospedeiras. No entanto, este evento é raro, e a quantidade de DNA transferida é limitada, o que resulta em uma contribuição relativamente pequena para a transferência de genes mediada por fagos, usando a transdução especializada (Thierauf *et al.*, 2009).

2.4.3 Transdução lateral

A transdução generalizada e a especializada são comumente vistas como erros cometidos pelos fagos que levam à incorporação de DNA do hospedeiro nas partículas fágicas. Erros no reconhecimento dos sítios *pac* são relativamente raros, e erros na excisão de profagos são ainda menos frequentes, o que explica as baixas taxas de transferência de genes do hospedeiro observadas com esses mecanismos. Em contrapartida, a transdução lateral, descoberta em fagos de *Staphylococcus aureus*, não parece ser um erro do fago, mas uma parte integral de seu ciclo de vida. Diferente do ciclo lítico usual, o profago na transdução lateral é excisado tardiamente no ciclo de vida. Isso resulta em uma forma de transdução que transfere DNA cromossômico bacteriano em frequências pelo menos 1.000 vezes superiores às observadas em outros métodos de transdução (Fillol-Salom *et al.*, 2021).

2.5 Reservatórios naturais de genes de resistência a antibióticos e disseminação mediada por fagos

As atividades antropogênicas têm sido associadas ao surgimento de reservatórios de resistência a antibióticos em ambientes terrestres e aquáticos (Gatica & Cytryn, 2013). Estas atividades introduzem bactérias e genes resistentes a antibióticos, exercendo uma pressão seletiva que favorece sua persistência. No entanto, descobertas recentes desafiam essa ideia, indicando que ambientes intocados, aquáticos e terrestres, possuem altos níveis de bactérias resistentes a antibióticos, inclusive genes de resistência clinicamente relevantes (Bezuidt *et al.*, 2020; Roy *et al.*, 2020; Van Goethem *et al.*, 2018; Walsh & Duffy, 2013). A partir dessas observações, originou-se a hipótese do resistoma, que sugere que certos patógenos com genes de resistência a antimicrobianos (ARG, sigla em inglês) se originaram de bactérias ambientais produtoras de antibióticos, e posteriormente chegaram aos patógenos via HGT, utilizando fagos como agentes de transdução (Naidoo *et al.*, 2020; Perry & Wright, 2013).

De acordo com essa hipótese, é possível que em nichos ecológicos ainda não completamente descritos, bacteriófagos possam atuar na transferência inicial de ARG de microrganismos ambientais para a microbiota de humanos e animais, eventualmente atingindo grupos bacterianos patogênicos ao longo da evolução (Moon *et al.*, 2020).

No contexto de Saúde Única, ambientes podem ser contaminados por patógenos, produtos químicos e resíduos oriundos do escoamento de águas residuais ou práticas agrícolas. A contaminação pode ocorrer na irrigação do solo ou aplicação de biossólidos e esterco como fertilizantes. O uso prolongado e inadequado de antibióticos químicos no ambiente é um dos fatores no aumento dos ARGs em diversos ambientes. Além disso, essa contaminação pode se propagar pela cadeia alimentar,

contaminando vegetais e produtos prontos para o consumo.

2.6 Desafios na produção animal e segurança alimentar

2.6.1 Uso de antibióticos na produção animal e seu impacto na resistência antimicrobiana

Agentes antimicrobianos são substâncias, que podem ser naturais, semissintéticas ou sintéticas, projetadas para inibir ou eliminar microrganismos. Eles desempenham um papel vital no tratamento de várias infecções causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas (OIE, 2021). A busca por novos compostos bioativos tornou-se uma prioridade na sociedade moderna, especialmente em face aos desafios impostos pela resistência antimicrobiana.

Na produção animal, os antimicrobianos químicos são amplamente utilizados não apenas para tratar infecções, mas também como medidas profiláticas e metafiláticas. Além disso, muitos antibióticos são adicionados à ração animal para melhorar o desempenho dos rebanhos. Embora essa prática tenha mostrado benefícios iniciais, seu uso levanta preocupações sobre o impacto na resistência a antibióticos em populações tanto animais quanto humanas. O uso indiscriminado e inadequado desses medicamentos permite que microrganismos desenvolvam mecanismos de defesa contra os mesmos (Callaway *et al.*, 2003; Gambi *et al.*, 2022; Ibrahim *et al.*, 2019; Roth *et al.*, 2019).

Para enfrentar essas preocupações, muitos países implementaram regulamentações rigorosas sobre o uso de antibióticos na produção animal. Alguns países proibiram totalmente o uso de antibióticos como promotores de crescimento, enquanto outros impuseram restrições ao seu uso (EFSA (European Food Safety Authority) & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022)). Essas medidas visam não apenas proteger a saúde pública, mas também garantir práticas mais sustentáveis na produção animal.

A contaminação de alimentos e animais na produção animal, com microrganismos resistentes a antibióticos e fagos que podem conter genes de resistência a antibióticos, pode ocorrer em toda a cadeia, “do campo à mesa”. Isso ocorre por meio do contato com matrizes ambientais como esgoto, resíduos animais, lodo e resíduos agrícolas, além de práticas agrícolas, como o uso de resíduos na fertilização do solo, aplicação de lodo de estações de tratamento de águas residuais urbanas, irrigação com água residual tratada, e o uso abusivo de antibióticos na medicina veterinária e aquicultura (Marti *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2012).

Esses fatores podem contribuir para a propagação de ARGs ao longo da cadeia alimentar, incluindo alimentos prontos para consumo, como frutas e vegetais, antes de seu processamento e conservação. Ao serem consumidos, esses vegetais representam uma via de disseminação de genes de resistência a antibióticos para bactérias presentes no intestino humano (Dharmarha *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2015).

A administração de antibióticos para os animais de produção em níveis terapêuticos e subterapêuticos, as estações de tratamento de água associadas a abatedouros e resíduos de vacas leiteiras, também podem ser uma fonte de fagos que possuem ARGs. Nesse contexto, a seleção de bactérias resistentes a antibióticos pode ocorrer no trato intestinal dos animais e ser excretada nas fezes (Alexander *et al.*, 2008). De fato, estudos mostram que até 80% dos antibióticos administrados

aos animais podem ser excretados como compostos ativos ou metabólitos na urina e nas fezes (Arikan *et al.*, 2007; Winckler & Grafe, 2001).

Este ciclo se perpetua, uma vez que o resíduo animal é frequentemente utilizado como adubo para o solo e fertilizante para a produção agrícola, introduzindo bactérias resistentes a antibióticos e ARGs no ambiente (Chee-sanford *et al.*, 2009). Dependendo de sua taxa de degradação, hidrofobicidade e potencial de adsorção, os antibióticos excretados podem continuar exercendo pressão seletiva em resíduos animais, solo, água, águas residuais, sedimentos e lodo, assim como representado na figura 1 (Mckinney *et al.*, 2018).

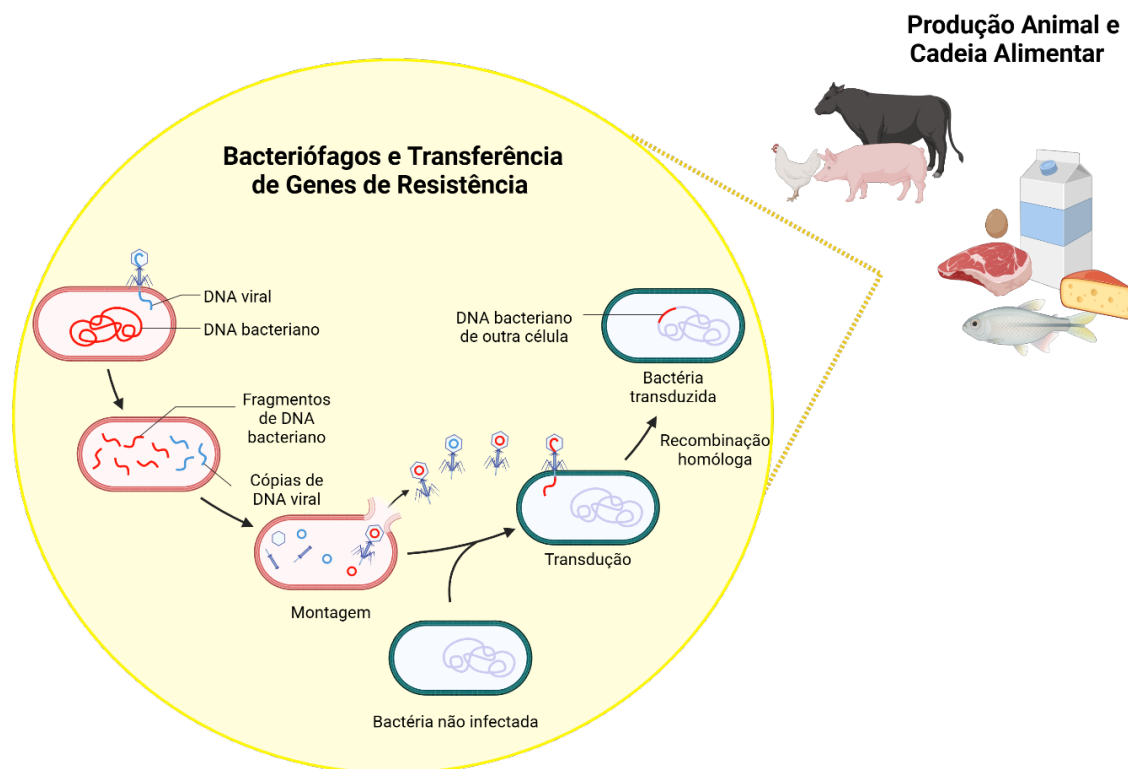


Figura 1- Bacteriófagos e a transferência horizontal relacionado com a produção animal (Autor, 2024).

2.6.2 Estratégias para redução da resistência antimicrobiana na cadeia alimentar

Desde 2010, há um compromisso sólido entre a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) para combater a resistência antimicrobiana (RAM). Essas organizações trabalham de forma coordenada para mitigar os riscos na interface entre saúde pública, saúde animal e meio ambiente (MAPA, 2021).

Em 2018 foi publicado o “Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única” (PAN-BR), desenvolvido em alinhamento com os objetivos estabelecidos pela Aliança Tripartite, que inclui a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). O plano visa abordar as questões relacionadas à resistência antimicrobiana (RAM) de forma integrada, reconhecendo a interdependência entre a saúde humana, animal e

ambiental (MAPA, 2021).

O “Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária” visa avaliar os riscos, tendências e padrões relacionados à ocorrência e disseminação da AMR em alimentos de origem animal produzidos no Brasil. Além disso, o programa visa fornecer dados essenciais para análises de risco que sejam relevantes tanto para a saúde animal quanto para a saúde humana (MAPA, 2021).

As informações geradas por este programa serão fundamentais para embasar a tomada de decisões, o estabelecimento de políticas públicas e a alocação adequada de recursos nas ações voltadas para a prevenção e contenção da resistência antimicrobiana na cadeia de produção de alimentos. Essa abordagem integrada é crucial para garantir a segurança alimentar e proteger a saúde pública, considerando a interdependência entre os setores agropecuário, de saúde animal e de saúde humana (MAPA, 2021).

2.7 Vigilância e controle da resistência antimicrobiana

2.7.1 Métodos de monitoramento da resistência em diferentes ambientes

O “Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária”, proposto pelo governo brasileiro, é implementado de forma progressiva e periódica, com revisões a cada dois anos. A evolução da implementação da Fase 2 do programa leva em consideração diversos fatores, como a disponibilidade de recursos humanos e financeiros, a capacidade laboratorial, questões logísticas, e os resultados obtidos na Fase 1. Além disso, a Fase 2 introduz métodos específicos para monitorar a resistência antimicrobiana em ambientes agrícolas e pecuários. Na Fase 1, realizada entre 2019 e 2020, o foco esteve na avicultura de corte e na suinocultura, nos quais foram estabelecidos protocolos de coleta e análise para monitorar a resistência antimicrobiana nos setores. Em seguida, a Fase 2, implementada entre 2021 e 2022, expandiu a vigilância, incluindo também a bovinocultura de corte. Essa abordagem gradual permite a construção de uma base sólida para mitigar a resistência antimicrobiana nos sistemas agropecuários brasileiros (MAPA, 2021).

O monitoramento da resistência aos antimicrobianos no programa é realizado em etapas e envolve diversas metodologias específicas. A primeira etapa consiste na seleção dos sistemas produtivos e pontos críticos dentro da cadeia agropecuária, priorizando setores de produção relevantes, como a avicultura, suinocultura e bovinocultura de corte, e pontos críticos na cadeia, como granjas e frigoríficos. Em seguida, são coletadas diferentes amostras, incluindo *swabs*, fezes, conteúdo fecal e amostras de carcaças, ao longo de toda a cadeia de produção, refletindo a exposição antimicrobiana dos animais e do ambiente. As amostras são coletadas de maneira progressiva e sazonal, com uma abordagem tanto passiva quanto ativa, para capturar as variações sazonais e possibilitar uma análise contínua da resistência ao longo do tempo (MAPA, 2021).

Os microrganismos monitorados são principalmente bactérias de relevância veterinária e para a saúde pública, como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Os isolados dessas bactérias são submetidos a análises de suscetibilidade antimicrobiana, permitindo determinar os níveis de resistência a antimicrobianos essenciais para o controle das infecções. Essas metodologias são aplicadas de forma integrada, visando fornecer uma visão abrangente dos padrões de resistência nos ambientes

agropecuários, contribuindo para a implementação de estratégias de controle mais eficazes (MAPA, 2021).

Os resultados dos testes são analisados quantitativamente (MIC) e qualitativamente (sensível, intermediário ou resistente). O armazenamento dos isolados segue normas de qualidade, com um mínimo de cinco anos de conservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A gestão dos dados é feita em uma base específica, com relatórios anuais detalhando os resultados, divulgados para órgãos governamentais, setor produtivo e público. O programa também prevê ações de intervenção e comunicação de risco, com foco em educação e treinamento (MAPA, 2021).

A implementação de Programas de Gerenciamento de Antimicrobianos (PGA) pela ANVISA no Brasil, possui ênfase na prevenção e controle da resistência microbiana. A implementação de boas práticas para o uso racional desses medicamentos visa reduzir a resistência de microrganismos e garantir o tratamento adequado. A estratégia envolve a criação de programas de gerenciamento que devem ser personalizados conforme as necessidades de cada unidade de saúde, para monitorar e regular o uso de antimicrobianos, assegurar que sejam administrados corretamente e educar os profissionais de saúde. O gerenciamento inclui ações como: vigilância epidemiológica, educação continuada dos profissionais, avaliação e revisão de prescrição, além de adotar protocolos clínicos que definem os melhores tratamentos para infecções. O controle rigoroso do estoque de antimicrobianos e a auditoria contínua também são recomendados para garantir a eficácia dessas intervenções (Barra *et al.*, 2023).

2.7.2 Importância da abordagem “One Health” integrando saúde humana, animal e ambiental

A evolução da resistência aos antibióticos em bactérias é um fenômeno que antecede muito o uso em larga escala destes medicamentos pela humanidade para combater doenças infecciosas. Estudos em ambientes isolados, amostras de *permafrost* e cavernas, revelam mecanismos de resistência que existiam na era pré-antibiótica, livre de contaminação antropogênica (Waglechner *et al.*, 2021).

A competição por recursos entre microrganismos, incluindo a produção natural de metabólitos secundários similares aos antibióticos atuais, provavelmente influenciou essa evolução ancestral e contínua dos mecanismos de resistência, favorecendo o processo de seleção natural. No entanto, a introdução dos antibióticos na prática clínica alterou drasticamente as condições para a evolução e disseminação da resistência, criando pressões seletivas sem precedentes, especialmente na microbiota humana e animal, bem como em ambientes contaminados por antibióticos.

Essa pressão seletiva favoreceu a mobilização e transferência horizontal de diversos ARGs para várias espécies bacterianas, sendo a maioria com potencial patogênico. Como resultado, enfrentamos dificuldades crescentes na prevenção e tratamento de infecções bacterianas (Munita & Arias, 2016). Considerando que bactérias e genes frequentemente atravessam fronteiras ambientais e entre espécies, é fundamental compreender as conexões entre as microbiotas humana, animal e ambiental (conceito Saúde Única - “*One Health*”) para enfrentar esse desafio global de saúde.

Ao longo das últimas três décadas, observa-se que uma parcela de novas doenças zoonóticas emergentes têm origem em animais silvestres. Os principais fatores que impulsionam seu surgimento estão relacionados às atividades humanas, incluindo alterações nos ecossistemas, mudanças no uso da terra, intensificação da agricultura, urbanização e aumento do comércio e viagens internacionais.

Para compreender a ecologia de cada doença zoonótica emergente, realizar avaliações de risco e desenvolver planos de resposta e controle, é necessária uma abordagem colaborativa e multidisciplinar que integre as áreas de saúde animal, humana e ambiental, visualizando-as como um todo (Mackenzie & Jeggo, 2019).

2.8 Conclusão

Genes de resistência a antimicrobianos e bacteriófagos possuem uma íntima ligação, em especial na propagação de ARGs, um problema estreitamente relacionado ao conceito de Saúde Única, no qual há a relação entre dinâmicas biológicas e microbiológicas, entre o ambiente, a saúde animal e a saúde humana. Existem políticas públicas com o objetivo de diminuir a disseminação de genes de resistência, em especial ao uso pecuário, que por sua vez diminui sua presença de ARGs no ambiente também. A indústria possui também papel fundamental para evitar focos de patógenos na produção de alimento, diminuindo assim a possibilidade de transferência de genes já existentes. Abordar estes desafios demanda uma pesquisa interdisciplinar que integre microbiologia, biotecnologia, ecologia e saúde pública, com foco na identificação de fagos específicos envolvidos na transferência horizontal de genes e no desenvolvimento de tecnologias emergentes com a função para monitorar e possivelmente controlar sua disseminação de forma eficaz.

Referências

Alexander, T. W., Yanke, L. J., Topp, E., Olson, M. E., Read, R. R., Morck, D. W., & McAllister, T. A. (2008). Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4405–4416. <https://doi.org/10.1128/AEM.00489-08/ASSET/15BE499E-BD5A-41D0-9964-02DBFBC8119D/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0140890170005.JPEG>

Arikan, O. A., Sikora, L. J., Mulbry, W., Khan, S. U., & Foster, G. D. (2007). Composting rapidly reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves. *Bioresource Technology*, 98(1), 169–176. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2005.10.041>

Barra, A., Chefe De Gabinete, T., Schuck, K., Diretores, H. M., Machado, A., Antônio, C., Torres, B., Meirelles, D., Pereira, F., Sousa, M., Rômison, F., Mota, R., Campos, A. M., Silva, G., Calais, P., Machado, M., Costa, M., Clara, A., Bello, R., ... Nogueira, P. (2023). *Diretriz Nacional para Elaboração de Programa de Gerenciamento de Antimicrobianos em Serviços de Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasil*. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/DiretrizGerenciamentoAntimicrobianosANVISA2023FINAL.pdf>

Batuman, O., Britt-Ugartemendia, K., Kunwar, S., Yilmaz, S., Fessler, L., Redondo, A., Chumachenko, K., Chakravarty, S., & Wade, T. (2024). The Use and Impact of Antibiotics in Plant Agriculture: A Review. *Phytopathology*, 114(5), 885–909. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-23-0357-IA/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-10-23-0357-IAT4-1716888776401.JPEG>

Bezuidt, O. K. I., Lebre, P. H., Pierneef, R., León-Sobrino, C., Adriaenssens, E. M., Cowan, D. A., Van de Peer, Y., & Makhalanyane, T. P. (2020). Phages Actively Challenge Niche Communities in Antarctic Soils. *mSystems*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00234-20>

Brockhurst, M. A., & Koskella, B. (2013). Experimental coevolution of species interactions. *Trends in ecology & evolution*, 28(6), 367–375. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2013.02.009>

Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.-D. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560–602. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004/FORMAT/EPUB>

Callaway, T. R., Edrington, T. S., Rychlik, J. L., Genovese, K. J., Poole, T. L., Jung, Y. S., Bischoff, K. M., Anderson, R. C., Nisbet, D. J., & Rd, B. (2003). Ionophores: Their Use as Ruminant Growth Promotants and Impact on Food Safety. *Ionophores Impact on Food Safety 43 Curr. Issues Intest. Microbiol*, 4, 43–51. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14503688/>

Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L., & Brüssow, H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 417–424. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00086-9)

Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y.-F., Yannarell, A. C., Maxwell, S., & Aminov, R. I. (2009). Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. *Journal of Environmental Quality*, 38(3), 1086–1108. <https://doi.org/10.2134/JEQ2008.0128>

de Jonge, P. A., Nobrega, F. L., Brouns, S. J. J., & Dutilh, B. E. (2019). Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range. *Trends in microbiology*, 27(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.08.006>

De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>

Delgado Baquerizo, M., Roux, S., Hu, H., Liang, X., Radosevich, M., Ghosh, D., Roy, K., DeBruyn, J. M., Dasgupta, T., Eric Wommack, K., & Wagner, R. E. (2020). Temporal Dynamics of Soil Virus and Bacterial Populations in Agricultural and Early Plant Successional Soils. 11, 1494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01494>

Dharmarha, V., Guron, G., Boyer, R. R., Niemira, B. A., Pruden, A., Strawn, L. K., & Ponder, M. A. (2019). Gamma irradiation influences the survival and regrowth of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic-resistance genes on romaine lettuce. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 440728. <https://>

doi.org/10.3389/FMICB.2019.00710/BIBTEX

EFSA (European Food Safety Authority), & ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2022). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. Em *EFSA Journal* (Vol. 20, Número 3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>

Fillol-Salom, A., Bacigalupe, R., Humphrey, S., Chiang, Y. N., Chen, J., & Penadés, J. R. (2021). Lateral transduction is inherent to the life cycle of the archetypical *Salmonella* phage P22. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–12.

Gambi, L., Crippa, C., Lucchi, A., De Cesare, A., Parisi, A., Manfreda, G., & Pasquali, F. (2022). The resistome of commensal *Escherichia coli* isolated from broiler carcasses “produced without the use of antibiotics”. *Poultry Science*, 101(4). <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2022.101770>

Gatica, J., & Cytryn, E. (2013). Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. *Environmental Science and Pollution Research* 2013 20:6, 20(6), 3529–3538. <https://doi.org/10.1007/S11356-013-1505-4>

Glatter, K. A., & Finkelman, P. (2020). History of the Plague: An Ancient Pandemic for the Age of COVID-19. *The American Journal of Medicine*, 134(2), 176. <https://doi.org/10.1016/J.AMJMED.2020.08.019>

Ibrahim, R. A., Cryer, T. L., Lafi, S. Q., Basha, E. A., Good, L., & Tarazi, Y. H. (2019). Identification of *Escherichia coli* from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors. *BMC Veterinary Research*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1901-1>

Le Romancer, M., Gaillard, M., Geslin, C., & Prieur, D. (2006). Viruses in extreme environments. *Life in Extreme Environments*, 9781402062858, 99–113. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6285-8_6

Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian journal of microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/CJM-2018-0275>

Lin, L., Hong, W., Ji, X., Han, J., Huang, L., & Wei, Y. (2010). Isolation and characterization of an extremely long tail Thermus bacteriophage from Tengchong hot springs in China. *Journal of Basic Microbiology*, 50(5), 452–456. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201000116>

Mackenzie, J. S., & Jeggo, M. (2019). The one health approach-why is it so important? Em

Tropical Medicine and Infectious Disease (Vol. 4, Número 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>

Marti, R., Tien, Y. C., Murray, R., Scott, A., Sabourin, L., & Topp, E. (2014). Safely coupling livestock and crop production systems: How rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(10), 3258–3265. https://doi.org/10.1128/AEM.00231-14/SUPPL_FILE/ZAM999105360SO1.PDF

McDonald, M. J. (2019). Microbial Experimental Evolution – a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. *EMBO Reports*, *20*(8). <https://doi.org/10.15252/EMBR.201846992>

McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology spectrum*, *6*(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>

Mckinney, C. W., Dungan, R. S., Moore, A., & Leytem, A. B. (2018). Occurrence and abundance of antibiotic resistance genes in agricultural soil receiving dairy manure. *FEMS Microbiology Ecology*, *94*, 10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy010>

Meng, M., Li, Y., & Yao, H. (2022). Plasmid-Mediated Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Soil. *Antibiotics* 2022, Vol. 11, Page 525, *11*(4), 525. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11040525>

Moelling, K., Broecker, F., & Willy, C. (2018). A Wake-Up Call: We Need Phage Therapy Now. *Viruses* 2018, Vol. 10, Page 688, *10*(12), 688. <https://doi.org/10.3390/V10120688>

Moon, K., Jeon, J. H., Kang, I., Park, K. S., Lee, K., Cha, C. J., Lee, S. H., & Cho, J. C. (2020). Freshwater viral metagenome reveals novel and functional phage-borne antibiotic resistance genes. *Microbiome*, *8*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00863-4/FIGURES/6>

Naidoo, I., Mabaso, M., Moshabela, M., Sewpaul, R., & Reddy, S. P. (2020). South African health professionals' state of well-being during the emergence of COVID-19. *South African Medical Journal*, *110*(10), 956. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2020.V110I10.15250>

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, *4*(2). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0016-2015>

Oliveira, M., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., & Abadias, M. (2012). Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology*, *156*(2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.014>

Patangia, D. V., Anthony Ryan, C., Dempsey, E., Paul Ross, R., & Stanton, C. (2022). Impact of

antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *MicrobiologyOpen*, 11(1). <https://doi.org/10.1002/MBO3.1260>

Penadés, J. R., & Christie, G. E. (2015). The Phage-Inducible Chromosomal Islands: A Family of Highly Evolved Molecular Parasites. *Annual review of virology*, 2(1), 181–201. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-031413-085446>

Perry, J. A., & Wright, G. D. (2013). The antibiotic resistance “mobilome”: Searching for the link between environment and clinic. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAY), 48597. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2013.00138/BIBTEX>

Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Brasil*. (2019). <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/pan-br-agro/ProgramadeVigilnciaeMonitoramentoAMRFINAL5.pdf>

Pulingam, T., Parumasivam, T., Gazzali, A. M., Sulaiman, A. M., Chee, J. Y., Lakshmanan, M., Chin, C. F., & Sudesh, K. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 170. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2021.106103>

Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*, 98(4), 1791–1804. <https://doi.org/10.3382/PS/PEY539>

Roy, K., Ghosh, D., DeBruyn, J. M., Dasgupta, T., Wommack, K. E., Liang, X., Wagner, R. E., & Radosevich, M. (2020). Temporal Dynamics of Soil Virus and Bacterial Populations in Agricultural and Early Plant Successional Soils. *Frontiers in Microbiology*, 11, 541049. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01494/BIBTEX>

Samreen, Ahmad, I., Malak, H. A., & Abulreesh, H. H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *Journal of global antimicrobial resistance*, 27, 101–111. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2021.08.001>

Santos, S. B., Carvalho, C., Azeredo, J., & Ferreira, E. C. (2014). Population Dynamics of a *Salmonella* Lytic Phage and Its Host: Implications of the Host Bacterial Growth Rate in Modelling. *PLOS ONE*, 9(7), e102507. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0102507>

Säwström, C., Lisle, J., Anesio, A. M., Priscu, J. C., & Laybourn-Parry, J. (2008). Bacteriophage in polar inland waters. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 12(2), 167–175. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0250-7>

org/10.1007/S00792-007-0134-6

Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K., & Vairale, M. G. (2017). Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiologica*, 62(1), 17–55. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0471-x>

Thierauf, A., Perez, G., & Maloy, A. S. (2009). Generalized transduction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 501, 267–286. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_23

Twort, F. W. (1915). AN INVESTIGATION ON THE NATURE OF ULTRA-MICROSCOPIC VIRUSES. *The Lancet*, 186(4814), 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3)

Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of infection and public health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2021.10.020>

van der Kolk, J. H. (Han). (2015). Antibiotic resistance from prehistoric to modern times. *Veterinary Quarterly*, 35(1), 1. <https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1008215>

Van Goethem, M. W., Pierneef, R., Bezuidt, O. K. I., Van De Peer, Y., Cowan, D. A., & Makhalanyane, T. P. (2018). A reservoir of “historical” antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40168-018-0424-5/FIGURES/6>

Waglechner, N., Culp, E. J., & Wright, G. D. (2021). Ancient Antibiotics, Ancient Resistance. *EcoSal Plus*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0027-2020>

Walsh, F., & Duffy, B. (2013). The Culturable Soil Antibiotic Resistome: A Community of Multi-Drug Resistant Bacteria. *PLOS ONE*, 8(6), e65567. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0065567>

Waglechner, N., Culp, E. J., & Wright, G. D. (2021). Ancient Antibiotics, Ancient Resistance. *EcoSal Plus*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0027-2020>

Wang, F. H., Qiao, M., Chen, Z., Su, J. Q., & Zhu, Y. G. (2015). Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. *Journal of Hazardous Materials*, 299, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.028>

Winckler, C., & Grafe, A. (2001). Use of veterinary drugs in intensive animal production evidence for persistence of tetracycline in pig slurry. *Journal of Soils and Sediments*, 1(2), 66–70. <https://doi.org/10.1007/BF02987711/METRICS>

Yu, P., Mathieu, J., Li, M., Dai, Z., & Alvarez, P. J. J. (2016). Isolation of Polyvalent Bacteriophages by Sequential Multiple-Host Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(3), 808. <https://doi.org/10.1128/AEM.02382-15>