

Revisión Sistemática sobre Elementos Genéticos Móviles Portadores de Genes de Resistencia a Antibióticos en Aguas Residuales, 2000-2017

Systematic Review about Mobile Genetic Elements Carriers of Genes of Antibiotic Resistance in Waste Water, 2000-2017

Carlos Andrés González Calle¹
and
Jaiberth Antonio Cardona-Arias²

- 1 Grupo de investigación Salud y Sostenibilidad, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín Colombia
- 2 Epidemiología, Universidad de Antioquia, Universidad Cooperativa de Colombia, Medellín Colombia

Resumen

Introducción: La resistencia a antibióticos es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema de salud pública mundial, cuyo estudio ha sido más frecuente en el ámbito hospitalario. No se ha sistematizado la importancia de los elementos genéticos móviles en aguas residuales, como medio de propagación y agudización del problema.

Objetivo: Sistematizar las publicaciones científicas sobre los elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a antibióticos en aguas residuales, en el periodo 2000-2017.

Métodos: Revisión sistemática de la literatura. Se aplicó un protocolo de investigación según las fases de identificación, tamización, elección e inclusión de la guía PRISMA, garantizando exhaustividad y reproducibilidad. Se realizó síntesis cualitativa con análisis basado en frecuencias.

Resultados: Se analizaron 229 artículos que cumplían con el protocolo de búsqueda y selección. Europa y Asia concentraron el mayor número de publicaciones (78,2%). El 63,7% de los estudios estuvo constituido por muestras obtenidas directamente de la planta de tratamiento de aguas residuales, el porcentaje restante se realizó en aguas residuales urbanas, industriales u hospitalarias. El tipo de elemento genético móvil más comúnmente hallado fueron los plásmidos (30,6%), detectando principalmente resistencia a betalactámicos (33,2%) y tetraciclinas (24,9%), empleando PCR (65,1%) y secuenciación (26,6%).

Conclusión: Los estudios sobre elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a antibióticos en aguas residuales es escaso, en comparación con la disponibilidad de estudios en otras matrices y ambientes, como el hospitalario. Esta revisión sistemática de enfoque amplio y exploratoria, pone de manifiesto algunas las necesidades y oportunidades de investigación en este tema. Pese a su importancia, son pocos los países que concentran las publicaciones sobre el rol de los elementos genéticos móviles en la propagación de este problema a la salud ambiental, animal y humana.

Palabras clave: Aguas residuales; Resistencia a medicamentos; Elementos genéticos móviles; Revisión sistemática

*Correspondencia:

Jaiberth Antonio Cardona-Arias

✉ jaiberthcardona@gmail.com

Abstract

Introduction: Resistance to antibiotics is recognized by the World Health Organization (WHO) as a global public health problem, with more frequency of studies in the hospital setting. The importance of mobile genetic elements in wastewater has not been systematized as medium of propagating and exacerbating of the problem.

Objective: To systematize scientific publications on mobile genetic elements carrying antibiotic resistance genes in wastewater, in the period 2000-2017.

Methods: Systematic review of the literature. A research protocol was applied according to the identification, screening, selection and inclusion phases of the PRISMA guide, guaranteeing completeness and reproducibility. Qualitative synthesis was performed with frequency-based analysis.

Results: 229 articles were included that complied with the search and selection protocol. Europe and Asia accounted for the largest number of publications (78.2%). 63.7% of the studies consisted of samples obtained directly from the wastewater treatment plant, the remaining percentage was carried out in urban, industrial or hospital wastewater. The type of mobile genetic element most commonly found were the plasmids (30.6%), mainly detecting resistance to betalactams (33.2%) and tetracyclines (24.9%), using PCR (65.1%) and sequencing (26.6%).

Conclusion: Studies on mobile genetic elements carrying antibiotic resistance genes in wastewater are scarce, in comparison with the availability of studies in other environments, such as the hospital. This systematic review of a broad and exploratory approach, it highlights some of the needs and opportunities of research in this area. Despite their importance, few countries concentrate the publications about the role of mobile genetic elements in the propagation of this problem to environmental, animal and human health.

Keywords: Waste Water; Resistance to medications; Mobile genetic elements; Systematic review

Fecha de recepción: March 21, 2018, **Fecha de aceptación:** May 08, 2018, **Fecha de publicación:** May 15, 2018

Introducción

La resistencia a antibióticos es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema de salud pública mundial [1], dado que incrementa la morbilidad y mortalidad por infecciones bacterianas, así como el costo de su tratamiento [2]. Entre sus principales causas se encuentra el uso inadecuado de los antibióticos en el tratamiento de infecciones que redundan en la presión selectiva de mecanismos de adaptación microbiana, el incremento en el uso de estos medicamentos en la medicina humana y veterinaria, la movilidad de la población, la industrialización exponencial de las áreas urbanas, entre otras [3-4].

La elevada magnitud del problema justificó el hecho que en la resolución WHA 51.17 de la OMS se insta a los estados miembros a promover medidas para reducir la resistencia a los antimicrobianos, desarrollar métodos efectivos para la detección de microorganismos resistentes, evaluar los efectos en las medidas de control, reducir la propagación de microorganismos resistentes, advertir sobre la falta de conocimientos en dicho

tema, incentivar la investigación en esta temática y mejorar los sistemas de vigilancia a nivel nacional [5].

La reducción del espectro de utilidad de diferentes antibióticos, desde el punto de vista microbiológico, se explica por la presencia de diferentes mecanismos de resistencia de las bacterias como la transferencia horizontal de genes en condiciones naturales o en sistemas técnicos, donde la densidad de bacterias es alta y, por consiguiente [6-7] se aumenta el riesgo de propagar los genes de resistencia a bacterias de su misma especie u otra. Específicamente en bacilos gram negativos se presentan diferentes mecanismos de resistencia como cambios de permeabilidad por pérdida o reducción de la expresión de porinas, incremento en la expresión de las bombas de expulsión, modificación del sitio blanco, producción de enzimas modificadoras como betalactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos [8], a lo que se suma la capacidad de esparcir e incorporar esta resistencia en su genoma a través de elementos genéticos móviles o movilizables como son plásmidos, transposones o integrones [9].

El contexto expuesto ha justificado el incremento de esfuerzos por caracterizar el problema de la resistencia antibiótica bacteriana en el ámbito clínico actual [10]. Sin embargo, durante los últimos años se ha demostrado que las bacterias ambientales poseen las mismas capacidades para portar, adquirir y diseminar mecanismos de resistencia a antibióticos, por lo cual adquieren una gran importancia en el estudio de la transferencia genética, no sólo en clínica humana, sino también en la veterinaria y la agricultura como fuente de aumento en la prevalencia de microorganismos resistentes a antibióticos en diferentes nichos ecológicos, máxime al tener presente que los microorganismos producen muchos antimicrobianos en la naturaleza [11,12]. Estos microorganismos deben ser resistentes a los antimicrobianos que ellos mismos producen y los genes que otorgan esta característica pueden ser transferidos a microorganismos no resistentes: problema que se agudiza por la presencia de antibióticos en el medio ambiente que puede proporcionar una presión selectiva a largo plazo para la aparición y transmisión de genes de resistencia a organismos que no los producen [13].

Uno de los mecanismos de mayor eficacia para la transferencia de genes de resistencia a antibióticos son los de tipo horizontal como los plásmidos, transposones y bacteriófagos, estos fueron los posibles precursores del paso del medio ambiente al ámbito clínico de los genes resistentes a antibióticos [14-15]. A pesar de su importancia, estos mecanismos han sido poco estudiados en muestras provenientes de aguas residuales en nuestro medio, pese a capacidad para sobrevivir en este tipo de ambientes debido a sus características estructurales que lo hacen resistente a nucleasas, depredación, radiación y temperatura [16].

Otros elementos que agudizan esta problemática incluyen el hecho que aún no se ha establecido un nivel máximo de antibióticos permitido en estas aguas [17-19]. El proceso de tratamiento biológico en las plantas de aguas residuales crea un entorno adecuado para el desarrollo de resistencia y su propagación, debido a la mezcla bacteriana con concentraciones subinhibitorias [20,21]. La detección de perfiles de resistencia a antibióticos ha sido muy poco estudiada en aguas residuales en comparación con el ámbito clínico, a pesar del impacto en la salud humana y animal [22-25].

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue sistematizar las publicaciones científicas sobre los elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a antibióticos en aguas residuales, en el periodo 2000-2017.

Métodos

Tipo de estudio: Revisión sistemática de la literatura.

Protocolo de búsqueda y selección de estudios: Se aplicaron las fases de identificación, tamización, elección e inclusión de la guía PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses)

Identificación: Revisión sistemática de la literatura en 4 bases de datos especializadas y multidisciplinarias (Pubmed, Science Direct, Scopus y Scielo) a partir de un protocolo de búsqueda

exhaustivo y reproducible circunscrito a términos DeCS. Se emplearon los términos: (tw:(resistencia a antibióticos)) AND (tw:(aguas residuales)) AND (tw:(plásmidos)), (tw:(antibiotic resistance)) AND (tw:(wastewater)) AND ((plasmid)) y algunos sinónimos de los elementos genéticos móviles como mobile element genetic, bacteriophages, plasmid, transposon, integron, insertion sequence, cassette genetic, resistome, metamobilomic y mobilome, con sus equivalentes en español y portugués. Se eliminaron los estudios duplicados con la exportación de los artículos al administrador de referencias Endnote.

Tamización: En esta etapa se aplicaron los criterios de inclusión i) estudios originales ii) disponibles en inglés, español o portugués, iii) con términos de búsqueda en el título, resumen y/o palabra clave, iv) relacionado con resistencia a antibióticos v) que reporte elementos genéticos móviles en aguas residuales.

Elección: Los criterios de exclusión correspondía a estudios que no contribuyan al logro del objetivo general de esta revisión, en este sentido se excluyeron investigaciones que no expliciten los mecanismos de identificación de resistencia, los elementos genéticos móviles mediante técnicas de biología molecular y aquellos artículos que no se realizaron en una matriz de agua residual.

Inclusión: A los estudios seleccionados con las fases anteriores se les realizó extracción de las siguientes variables, para hacer la síntesis cualitativa: año y lugar de estudio, tipo de muestra de agua residual, tipo de elemento genético móvil, clase de resistencia antibiótica investigada y método de detección.

Evaluación de la reproducibilidad: La búsqueda e identificación de los estudios se realizó de manera independiente por dos revisores. Se diseñó una base de datos con las variables del estudio, la cual fue diligenciada por dos revisores para garantizar la reproducibilidad de esta etapa. Las discrepancias se resolvieron por consenso.

Análisis de la información: En el análisis se realizó síntesis cualitativa de la información, las variables del estudio se describieron con frecuencias absolutas y relativas.

Resultados

En la búsqueda inicial se identificaron 5.465 estudios en Scopus, 3.689 en Science-Direct, 505 en Pubmed y 6 en Scielo; de los cuales se tamizaron 9.563 con los filtros propios de las bases de datos resultando 351 estudios elegibles. Con base en la lectura de los títulos y resúmenes se excluyeron 122 por no reportar información referida a la matriz de agua, el método de detección o algún elemento móvil (**Figura 1**).

El 49,9% de los estudios se publicó en los últimos 3 años de la revisión, superando el número de investigaciones del periodo 2011-2014, lo que evidencia el aumento progresivo de las publicaciones sobre elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a antibióticos en aguas residuales en los últimos años (**Tabla 1**).

Europa registró cerca de la mitad de las publicaciones (43,7%)

y presenta mayor variabilidad respecto a los países dado que los estudios de esta región se realizaron en 19 países diferentes, siendo mayores en Alemania, Francia y Polonia. En Asia, la frecuencia de publicaciones fue alta (34,5%), con mayor concentración en China de donde provienen el 66% de las publicaciones realizadas en este continente, siendo a su vez el país del mundo con mayor cantidad de investigaciones en este tema. En América, la frecuencia de publicaciones no es tan alta, éstas están concentradas en Estados Unidos (Tabla 1).

Con respecto al tipo de elemento genético móvil investigado, la mayor frecuencia se obtuvo en los estudios que indagaban la presencia de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos (31%), los estudios que buscaban la presencia de secuencias de inserción, casetes genéticos, transposones y genes libres que confieren resistencia a antibióticos en aguas residuales representaron sólo el 11% mientras que los integrones correspondieron al 27,5% (Tabla 2). Se encontró que el integrón de clase 1 o sus variantes filogenéticas fueron las más frecuentes (29,3%) con respecto al hallazgo de 2 o 3 integrones.

Se encontró que el tipo de muestra de aguas residual más frecuentemente investigado fueron las de plantas de tratamiento, seguido por las aguas residuales urbanas, industriales y agropecuarias (Tabla 2).

El principal método de detección fueron las diferentes variantes de PCR, seguido por algunos tipos de secuenciación. Estas técnicas se emplearon para detección de diferentes resistencias antibióticas, siendo más frecuentes las correspondientes a betalactámicos, tetraciclinas y quinolonas (Tabla 2).

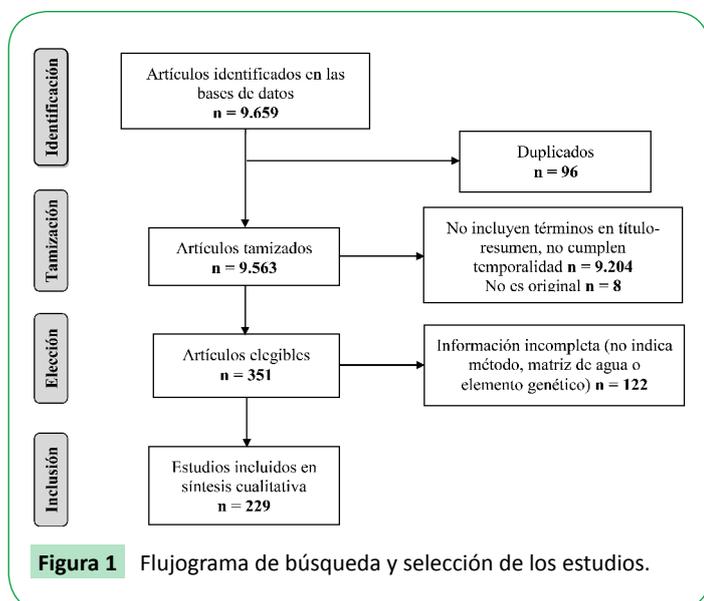
Entre las publicaciones que evaluaron plásmidos la mayor frecuencia se utilizó en el estudio de betalactámicos y quinolonas. En los integrones se halló mayor frecuencia de estudios en tetraciclina, sulfonamidas y macrólidos (Tabla 3). En los bacteriófago se hallaron cuatro estudios en betalactámicos, uno en metilina, dos en sulfonamida, tres en quinolona y uno con macrólidos.

Tabla 1 Descripción de los estudios según año y lugar de estudio.

Variable	Factores	n	%
Año del estudio	2000-2005	11	4,8
	2006-2010	29	12,7
	2011-2014	86	37,5
	2015-2017	103	44,9
Estudios en Europa	Alemania	21	9,2
	Francia	12	5,2
	Polonia	12	5,2
	Portugal	10	4,4
	España	9	4,9
	Italia	7	3
	Suecia	6	2,6
	Otros	23	10
	Total continente	100	43,7
	Estudios en América	Estados Unidos	23
Brasil		8	3,5
Canadá		4	1,7
Otros		5	2,2
Total continente	40	17,5	
Estudios en Asia	China	52	22,7
	India	9	3,9
	Israel	3	1,3
	Corea del sur	4	1,7
	Otros	11	4,8
	Total continente	79	34,5
Estudios en África y Oceanía	Túnez	3	1,3
	Nigeria	2	0,9
	Australia	2	0,9
	Otros	3	1,3
Total	10	4,4	

Tabla 2 Descripción de los estudios según año y lugar de estudio.

Variable	Factores	n	%
Tipo de elemento genético móvil	Plásmido	70	30,6
	secuencias de inserción, casetes genéticos, trasposones y genes libres	25	10,9
	Integrones	63	27,5
	Varios	62	27
	Bacteriófagos	9	3,9
Tipo de muestra de agua residual	Planta de tratamiento	146	63,7
	Urbanas (hospitales, lagos públicos)	59	25,8
	Industriales (laboratorios, empresas)	12	5,2
	Agropecuario	12	5,2
Método de estudio de genes	PCR	149	65,1
	Secuenciación	61	26,6
	Otros	19	8,3



Tipo de resistencia antibiótica por grupos			
	Betalactámicos	76	33,2
	Subgrupo Carbapénemicos	15	6,5
	Tetraciclinas	57	24,9
	Sulfonamidas	44	19,2
	Macrólidos	21	9,2
	Aminoglucósidos	10	4,4
	Quinolonas	41	17,9
	Glucopéptidos	16	7
	Fenicoles	6	2,6
	Antibiótico: Meticilina	3	1,3
	Antibiótico: Trimetoprim	15	6,5
	Antibiótico: Colistina	1	0,44

Tabla 3 Frecuencia absoluta de estudios que evaluaron plásmidos, integrones y ARGs según el tipo de antibiótico.

Antibiótico	Plásmidos	Integrones	ARGs
Betalactámicos	18	12	3
Carbapenémico	6	2	0
Meticilina	0	0	0
Tetraciclina	6	33	4
Sulfonamida	4	22	3
Quinolona	13	7	1
Macrólido	2	12	2
Aminoglucósido	2	3	0
Glucopéptido	1	2	0
Fenicol	2	1	0
Trimetoprim	2	2	1

Discusión

Esta revisión sistemática da cuenta de la importancia que tiene el estudio de los elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a antibióticos en diferentes tipos de muestras de aguas residuales, revelando el creciente interés en los últimos años, principalmente en Europa y Asia.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales constituyeron la principal matriz estudiada, lo cual da cuenta de su relevancia como posible fuente de propagación de los elementos genéticos móviles asociados con la resistencia antibiótica. En este sentido, el estudio de Guo et al. encontró una alta cantidad y diversidad de genes de resistencia a antibióticos, así como diferentes tipos de elementos genéticos móviles involucrados en procesos de transferencia horizontal [26]. Lo que implicaría un gran riesgo para la salud ambiental, animal y humana, dada la relevancia de este tipo de matriz y el hecho que en muchas partes no se hace una correcta desinfección o tratamiento para este tipo de elementos.

La secuenciación de elementos genéticos móviles es considerada un marco de referencia en el estudio de la adaptación bacteriana a los antibióticos por medio de la presencia de genes de resistencia en estos [26], por lo que se debe incrementar las investigaciones de este tipo que garanticen buena evidencia científica para profundizar en el entendimiento de su propagación a diferentes

ambientes, así como el nexo entre la detección del problema en aguas residuales y el ámbito hospitalario.

A pesar de ser un grave problema a nivel mundial por la alta tasa de infecciones adquiridas en hospitales [27], llama la atención la alta concentración de los estudios sobre resistencia a antibióticos en EGMs provenientes de aguas residuales en pocos países de Europa y Asia. Esta tendencia quizá se explique por la disponibilidad que tienen dichos países de la infraestructura tecnológica para realizar estudios mediante técnicas de biología molecular de vanguardia, sumado al mayor apoyo económico a la investigación científica por parte de los gobiernos, evidenciando el interés por abarcar los diferentes tipos de enfoques para el estudio de esta problemática.

En relación con los métodos de detección es importante considerar que en muchos estudios de resistencia antibiótica se utilizan pruebas fenotípicas, mediante cultivo y posterior prueba de sensibilidad, las cuales no dan cuenta de los genes implicados, ni su relación con todos los elementos involucrados en la propagación de las bacterias resistentes a antibióticos en diferentes ambientes. En este sentido, la PCR y secuenciación resultan de gran utilidad para estudiar los mecanismos de propagación de genes de resistencia a antibióticos, mediante el uso de cebadores para genes conocidos [28-29], máxime al considerar su elevado uso en estudios previos, como se demostró en esta revisión.

En relación con el tipo de elemento genético móvil, Li et al. indican que el descubrimiento de varios genes en plásmidos son indicadores de que los mobilomas medioambientales siguen sin explotar en términos investigativos [30]. Con respecto al papel del integrón de clase 1 en el esparcimiento de genes de resistencia a antibióticos, Di Cesare et al., sugieren que estos juegan un papel principal en esta función, lo que se corresponde con la alta frecuencia de estudios incluidos en esta revisión que aluden este tópico [31].

Los estudios de Jungermann et al [32] y Rôças y Siqueira [33], refieren que una alta prevalencia de genes como "blaTEM" asociados a infecciones, lo que se correlaciona con el hecho que esta revisión reportó una mayor frecuencia de resistencia bacteriana a betalactámicos. En este orden de ideas, también merece destacarse la resistencia a metilina reportada en esta revisión, particularmente la atribuible al gen *mecA*, ubicado en el cassette cromosómico estafilocócico *mec(SCC-mec)*, el cual está relacionado con infecciones hospitalarias y adquiridas en la comunidad [34]. Por su parte, los carbapenémicos son un grupo de betalactámicos de gran interés clínico por haber probado ser efectivos contra un amplio espectro bacteriano y por tener mejor estabilidad contra enzimas betalactamasas comparados con otros betalactámicos [35]. También destaca el hecho de encontrar sólo un estudio que buscaba detectar el gen *mcr-1* en aguas residuales, lo que evidencia la importancia de incentivar más la investigación de los mecanismos de resistencia a colistina y su frecuencia en el medioambiente, dado que este es un antibiótico de última línea en el tratamiento de infecciones por bacterias multirresistente [36].

Conclusión

Los estudios sobre elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a antibióticos en aguas residuales es escaso, en comparación con la disponibilidad de estudios en otras matrices y ambientes, como el hospitalario. Esta revisión sistemática de

enfoque amplio y exploratoria, pone de manifiesto algunas las necesidades y oportunidades de investigación en este tema. Pese a su importancia, son pocos los países que concentran las publicaciones sobre el rol de los elementos genéticos móviles en la propagación de este problema a la salud ambiental, animal y humana.

Referencias

- 1 World Health Organization (1996) The world health report. Geneva, Switzerland.
- 2 Smith RD, Coast J, Millar MR, Wilton P, Karcher AM (2001) Interventions against antimicrobial resistance: A review of the literature and exploration of modeling cost-effectiveness. Global Forum for Health Research Geneva, Switzerland.
- 3 Acar J, Davies J, Buckley M (2018) Antibiotic resistance: An ecological perspective on an old problem. ASM.
- 4 Hawkey P, Jones A (2009) The changing epidemiology of resistance. J Antimicrob Chemother 64: i3-i10.
- 5 World Health Organization (1998) World health assembly (fifty-first). Emerging and other communicable diseases: Antimicrobial resistance.
- 6 Barkay T (1995) Conjugal transfer at natural population densities in a microcosm simulating an estuarine environment. FEMS Microbiology Ecology 16: 43-53.
- 7 Muela A, Pocino M, Arana I, Justo JJ, Iriberry J, et al. (1994) Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. Applied and Environ Microbiol 60: 4273-4278.
- 8 Tafur J, Torres J, Villegas MV (2008) Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. Infectio 12: 217-226.
- 9 Poole K (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol 2.
- 10 El Salabi A, Walsh TR, Chouchani C (2013) Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. Crit Rev Microbiol 39: 113-122.
- 11 Heuer H, Schmitt H, Smalla K (2011) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. Curr Opin Microbiol 14: 236-243.
- 12 Canton R (2009) Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. Clin Microbiol Infect 1: 20-25.
- 13 Murray BE (1992) Problems and dilemmas of antimicrobial resistance. Pharmacother 1992 12: 865-935.
- 14 Muniesa M, García A, Miro E, Mirelis B, Prats G, et al. (2004) Bacteriophages and diffusion of β -lactamase genes. Emerg Infect Dis 10: 1134-1137.
- 15 UBrabban AD, Hite E, Callaway TR (2005) Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer. Foodborne Pathog Dis 2: 287-303.
- 16 Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M (2011) Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. PLoS one 6: e17549.
- 17 Ferreira da Silva M, Tiago I, Verissimo A, Boaventura RAR, Nunes OC, et al. (2006) Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban waste water treatment plant. FEMS Microbiol Ecol 55: 322-329.
- 18 Figueira V, Serra E, Manaia CM (2011) Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. Sci Total Environ 409: 1017-1023.
- 19 Lupo A, Coyne S, Berendonk T (2012) Origin and evolution of antibiotic resistance: The common mechanism of emergence and spread in water bodies. Front Microbiol 3: 18.
- 20 Auerbach EA, Seyfried EE, McMahon KD (2007) Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. Water Res 41: 1143-1151.
- 21 Kümmerer K (2009) Antibiotics in the aquatic environment: A review - part II. Chemosphere 75: 435-441.
- 22 Sogge OO, Meschke JS, No DB (2009) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. J Antimicrob Chemother 64: 1148-1155.
- 23 Araújo C, Torres C, Silva N, Carneiro C, Gonçalves A, et al. (2010) Vancomycin-resistant enterococci from Portuguese waste water treatment plants. J Basic Microbiol 50: 605-609.
- 24 Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, et al. (2012) The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. Euro Surveill 17: 20316.
- 25 Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, et al. (2003) Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). Clin Microbiol Infect 9: 467-474.
- 26 Guo J, Li J, Chen H, Bond PL, Yuan Z (2017) Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. Water Res 123: 468-478.
- 27 Wang H, Yuan X, Wu Y, Huang H, Peng X, et al. (2013) Graphene-based materials: Fabrication, characterization and application for the decontamination of wastewater and wastegas and hydrogen storage/generation. Adv Colloid Interface Sci 195: 19-40.
- 28 Marti E, Jofre J, Balcazar JL (2013) Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. PLoS One 8: e78906.
- 29 Schmieder R, Edwards R (2012) Insights into antibiotic resistance through meta-genomic approaches. Future Microbiol 7: 73-89.
- 30 Li LL, Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ (2012) Metamobilomics—expanding our knowledge on the pool of plasmid encoded traits

- in natural environments using high-throughput sequencing. *Clin Microbiol Infect* 18: 5-7.
- 31 Di Cesare A, Eckert EM, D'Urso S, Bertoni R, Gillan DC et al. (2016) Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Res* 94: 208-214.
- 32 Madinier I, Fosse T, Giudicelli J, Labia R (2001) Cloning and biochemical characterization of a class A β -lactamase from *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2386-2389.
- 33 Hecht DW, Citron DM, Cox M (2007) Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard. Clin Labor Standards Institute.
- 34 Jacobs J, García C (2015) Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. *Quimioterapia* 28: 98-100.
- 35 El-Gamal M, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, et al. (2017) Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem* 131: 185-195.
- 36 Vásquez AM, Montero N, Laughlin M, Dancy E, Melmed R, et al. (2016) Investigation of *Escherichia coli* harboring the mcr-1 resistance gene - Connecticut, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65: 979-980.