

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOSÉ EDUARDO MACHADO BARROSO

**EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTO COMO FERRAMENTA DE UMA
SÓ SAÚDE: VIGILÂNCIA DO SARS-CoV-2 E DA RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA EM *Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae*.**

Uberlândia

2026

JOSÉ EDUARDO MACHADO BARROSO

**EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTO COMO FERRAMENTA DE UMA
SÓ SAÚDE: VIGILÂNCIA DO SARS-CoV-2 E DA RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA EM *Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae*.**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor
em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^a Dr^a. Daise Aparecida
Rossi

Uberlândia

2026

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B277 Barroso, José Eduardo Machado, 1985-
2026 EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTO COMO FERRAMENTA DE
UMA SÓ SAÚDE [recurso eletrônico] : VIGILÂNCIA DO SARS-CoV-2 E
DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM Escherichia coli E Klebsiella
pneumoniae / José Eduardo Machado Barroso. - 2026.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2026.686>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Rossi, Daise Aparecida, 1963-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências
Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias

Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 209 A e B - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP
38400-902

Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.fmvz.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico PPGCVET Nº 08/2026				
Data:	28 de agosto de 2026	Hora de início:	14h:00	Hora de encerramento:	16:40
Matrícula do Discente:	12113VET005				
Nome do Discente:	José Eduardo Machado Barroso				
Título do Trabalho:	EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTO COMO FERRAMENTA DE SAÚDE ÚNICA: VIGILÂNCIA DO SARS-COV-2 E DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM Escherichia coli E Klebsiella pneumoniae.				
Área de concentração:	Saúde Animal				
Linha de pesquisa:	Investigação Etiológica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Epidemiologia de Zoonoses				

Reuniu-se no, no formato híbrido, no Anfiteatro do Hospital Veterinário/UFU, Campus Umuarama e por videoconferência da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Camilla Andrade Silva Valença - (FMVZ/UFU); Fernanda Raghianti - (IFTM); Aline Diniz Cabral - (USCS); Jupyracyara Jandyra de Carvalho Barros - (UFCAT) e Daise Aparecida Rossi - (FMVZ/UFU), orientadora da candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Daise Aparecida Rossi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

Aprovado

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daise Aparecida Rossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/08/2026, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jupyracyara Jandyra de Carvalho Barros, Usuário Externo**, em 28/08/2026, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Raghianti, Usuário Externo**, em 28/08/2026, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CAMILLA ANDRADE SILVA VALENCA, Usuário Externo**, em 28/08/2026, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALINE DINIZ CABRAL, Usuário Externo**, em 28/08/2026, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **7575515** e o código CRC **5AFA6FA7**.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

José Eduardo Machado Barroso, filho de Antonio Sérgio Suzano Loques Barroso e Vera Lúcia Machado Barroso, nasceu em Brasília, Distrito Federal, em 11 de maio de 1985. É casado com Marcela Cabral Mendes Barroso e pai de Ester, Lia e João. Iniciou sua trajetória acadêmica com a graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV/UnB) em 2007, seguida pela pós-graduação *lato sensu* em Gestão em Saúde pela Universidade Estadual de Goiás (UEG), concluída em 2012. É Advogado, graduado como Bacharel em Direito pelo Centro de Ensino Superior de Catalão (Cesuc) em 2017. Obteve o título de Mestre em Gestão Organizacional pela Universidade Federal de Goiás (UFG) em 2020 e, atualmente, é Doutorando em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com ingresso em 2021.

Atualmente é Auditor de Atividades Urbanas do Distrito Federal e ocupa o cargo de Secretário Municipal de Meio Ambiente de Catalão, em Goiás. Com experiência nas áreas de gestão, clínica e cirurgia veterinária, bem como em saúde pública. Sua carreira inclui a atuação como Médico Veterinário do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2009 e como sócio-proprietário da Univet Clínica e Assistência Veterinária entre 2010 e 2013. Na gestão pública municipal foi Coordenador do Departamento de Vigilância Sanitária (2011–2013), Coordenador do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) da Secretaria Municipal de Meio Ambiente (2013–2015) e Coordenador Municipal de DST/AIDS e Hepatites Virais da Secretaria Municipal de Saúde (2015–2016). Entre 2017 e 2024 exerceu a função de Chefe do Departamento de Vigilância Sanitária de Catalão.

Foi professor do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade UNA/Catalão entre 2018 e 2022 e parecerista da disciplina de Vigilância Sanitária da Ânima Educação. Exerceu a preceptoría no Programa de Educação pelo Trabalho para a Saúde (PET-Saúde), com atuações nos períodos de 2019 a 2024. Editor Chefe da Editora ISC. Presidiu a Comissão de Direito Médico, Sanitário e Defesa da Saúde (2019–2021) da Ordem dos Advogados do Brasil (OAB), Subseção de Catalão, assumindo a vice-presidência da mesma em 2023. Entre 2018 e 2024 foi membro titular da Comissão de Farmácia e Terapêutica da Secretaria Municipal de Saúde, Presidente da Comissão de Aprovação de Projetos da SMS Catalão-GO e integrante do Comitê de Prevenção, Orientação e Enfrentamento ao Coronavírus (COVID-19) do Município de Catalão.

Dedico este trabalho à minha família,
pelo estímulo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por tudo: pela vida, pela saúde e pela força diária para trabalhar e estudar, permitindo-me viver este momento e concluir esta etapa.

À minha família e amigos, pelo apoio incondicional. Um agradecimento especial à minha esposa Marcela, pela compreensão, amor e companheirismo, caminhando junto comigo em todos os momentos, inclusive nesta jornada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi, expresse minha profunda gratidão. Obrigado por mostrar o caminho e por ter contribuído fundamentalmente para o meu amadurecimento pessoal e profissional durante todo este percurso.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia, pelos conhecimentos transmitidos e pelas lições aprendidas, essenciais para a minha formação, em especial à Professora Roberta Torres de Melo, Professor Richard Costa Polveiro e colegas de pós Carlyne Ferreira Dumont e Dayanne Maria da Silva Coimbra.

À Prefeitura de Catalão, aos gestores e colegas de trabalho, agradeço a oportunidade de capacitação continuada. É gratificante saber que os frutos deste esforço, enquanto servidor público, podem reverter-se em benefícios úteis aos munícipes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento e suporte financeiro, imprescindíveis para a viabilização e o desenvolvimento deste estudo científico.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta caminhada... que segue!

“O saber a gente aprende com os mestres
e os livros. A sabedoria se aprende é com
a vida e com os humildes.” (Cora
Coralina)

RESUMO

A Epidemiologia Baseada em Esgoto (EBE) consolidou-se como uma ferramenta estratégica de vigilância em saúde, permitindo o monitoramento não invasivo de patógenos e a avaliação da saúde comunitária sob a ótica da Uma Só Saúde (*One Health*). A presente tese teve como objetivo investigar a dinâmica de circulação do SARS-CoV-2 e caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em esgoto bruto no município de Uberlândia-MG. O estudo foi dividido em dois eixos de vigilância: virológica e bacteriana. No primeiro eixo, realizou-se, nas quatro estações de tratamento de esgoto de Uberlândia-MG, a quantificação da carga viral de SARS-CoV-2 por RT-qPCR e a identificação genômica de variantes por sequenciamento, ao longo dos períodos pandêmico e pós-pandêmico, correlacionando os dados ambientais com indicadores clínicos de notificação de casos e óbitos. Os resultados evidenciaram a eficácia da EBE como sistema de alerta precoce, demonstrando concordância entre a carga viral nos efluentes e as ondas epidemiológicas da COVID-19. No segundo eixo, seis isolados de *E. coli* e três de *K. pneumoniae* recuperados da Estação de Tratamento de Esgoto Uberabinha foram caracterizados quanto à suscetibilidade antimicrobiana e ao genoma completo, incluindo *sequence types*, genes e mutações de resistência, fatores de virulência e replicons plasmidiais; as mesmas amostras de esgoto foram submetidas à metagenômica direcionada por enriquecimento de alvos, ampliando a detecção de táxons do grupo ESKAPEE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli*) e de determinantes de resistência não recuperados pelo cultivo. As análises revelaram uma elevada prevalência de cepas multirresistentes (MDR), incluindo a detecção de mecanismos de resistência críticos (blaCTX-M, blaKPC-2, blaNDM, blaVIM), evidenciando complementaridade entre cultivo, sequenciamento genômico e metagenômica direcionada. Conclui-se que a vigilância integrada de esgoto bruto é essencial para a saúde pública, fornecendo dados robustos para a gestão de surtos virais e para o controle da disseminação da resistência bacteriana sob a perspectiva de Uma Só Saúde.

Palavras-chave: Vigilância Ambiental. SARS-CoV-2. *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Resistência Antimicrobiana. Metagenômica Direcionada. Sequenciamento do Genoma Completo.

ABSTRACT

Wastewater-Based Epidemiology (WBE) has established itself as a strategic tool for health surveillance, enabling non-invasive pathogen monitoring and community health assessment from a *One Health* perspective. This thesis aimed to investigate the circulation dynamics of SARS-CoV-2 and characterize the antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in raw sewage in the municipality of Uberlândia-MG, Brazil. The study was divided into two surveillance axes: virological and bacterial. In the first axis, SARS-CoV-2 viral load was quantified by RT-qPCR and variants were genomically identified by sequencing at the four wastewater treatment plants of Uberlândia-MG throughout the pandemic and post-pandemic periods, correlating environmental data with clinical indicators of reported cases and deaths. The results evidenced the effectiveness of WBE as an early warning system, demonstrating concordance between viral load in effluents and the epidemiological waves of COVID-19. In the second axis, six *E. coli* and three *K. pneumoniae* isolates recovered from the Uberabinha wastewater treatment plant were characterized for antimicrobial susceptibility and whole-genome sequence data, including *sequence types*, resistance genes and mutations, virulence factors and plasmid replicons; the same sewage samples were subjected to targeted enrichment metagenomics, expanding the detection of ESKAPEE taxa (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., and *Escherichia coli*) and resistance determinants not recovered by culture. The analyses revealed a high prevalence of multidrug-resistant (MDR) strains, including the detection of critical resistance mechanisms (blaCTX-M, blaKPC-2, blaNDM, blaVIM), evidencing complementarity between culture, genomic sequencing and targeted metagenomics. It is concluded that integrated raw sewage surveillance is essential for public health, providing robust data for managing viral outbreaks and controlling the spread of bacterial resistance from a *One Health* perspective.

Keywords: Environmental Surveillance. SARS-CoV-2. *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Resistance. Targeted Metagenomics. Whole-Genome Sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de vigilância da Epidemiologia Baseada em Esgoto (EBE).....25

Figura 2 – A Tríade da Uma Só Saúde e as rotas de disseminação da Resistência Antimicrobiana (RAM)42

Capítulo 2

Figura 1 – Mapa dos pontos de coleta em Uberlândia, MG, Brasil54

Figura 2 – Frequência de coletas positivas e quantificação de SARS-CoV-2 em quatro estações de tratamento de esgoto (ETEs) em Uberlândia, MG61

Figura 3 – Relação entre a carga viral de SARS-CoV-2 quantificada nas amostras de águas residuais (ETE Uberabinha) e casos e óbitos por semana epidemiológica62

Figura 4 – Relações filogenéticas, atribuições de linhagem (Pangolin) e diferenças nucleotídicas pareadas entre sequências de SARS-CoV-2 provenientes de esgoto de Uberlândia (árvore + heatmap combinados)70

Figura 5 – Posicionamento filogenético contextual de sequências de SARS-CoV-2 provenientes de esgoto na diversidade genômica humana de Minas Gerais72

Capítulo 3

Figura 1 – Suscetibilidade fenotípica aos antibióticos e perfis combinados de resistência em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*.....90

Figura 2 – Diversidade de sequence types e determinantes genômicos de resistência em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*.....93

Figura 3 – Distribuição de genes associados à virulência em isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	94
Figura 4 – Frequência dos grupos de replicons plasmidiais em isolados de <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	95
Figura 5 – Perfil taxonômico de táxons do grupo ESKAPEE recuperados por metagenômica direcionada em amostras de esgoto bruto da ETE-Uberabinha	96
Figura 6 – Resistoma recuperado por metagenômica direcionada em amostras de esgoto bruto da ETE-Uberabinha.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pangolin lineage assignment of SARS-CoV-2 consensus genome sequences recovered from wastewater treatment plants (WWTPs) in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil	67
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2 – *Angiotensin-Converting Enzyme 2* (Enzima Conversora de Angiotensina 2)

AMR – *Antimicrobial Resistance* (equivalente em inglês de RAM)

ARGs – *Antibiotic Resistance Genes* (Genes de Resistência a Antibióticos)

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CLV-BR – *Circo-like virus Brazil*

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019* (Doença do Coronavírus 2019)

CRE – *Carbapenem-Resistant Enterobacterales* (Enterobacterales Resistentes a Carbapenêmicos)

CTX-M – Cefotaximase-Munique (família de beta-lactamases de espectro estendido)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

dPCR – *Digital PCR* (PCR digital)

EBE – Epidemiologia Baseada em Esgoto

ESBL – *Extended Spectrum Beta-lactamases* (Beta-lactamases de Espectro Estendido)

ESKAPE – Grupo de patógenos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.

ESKAPEE – Grupo ESKAPE ampliado para incluir *Escherichia coli*

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FAO – *Food and Agriculture Organization* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)

GISAID – *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*

GLASS – *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

JCPyV – Poliomavírus JC

KPC – *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*

LPS – Lipopolissacarídeo

MAR – *Multiple Antibiotic Resistance* (Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos)

MDR – *Multidrug-resistant* (Multirresistente)

MERS-CoV – *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*

MLST – *Multilocus Sequence Typing*

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

NDM – *New Delhi Metallo-beta-lactamase*

NGS – *Next Generation Sequencing* (Sequenciamento de Nova Geração)

OEA – Oxidação Eletroquímica Avançada

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*

OIE – *World Organisation for Animal Health* (atual WOAH)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAN-BR – Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PEG – Polietilenoglicol

qPCR – *Quantitative PCR* (PCR quantitativa)

RAM – Resistência Antimicrobiana

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

THG – Transferência Horizontal de Genes

TTV – *Torque teno virus*

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UWWTD – *Urban Wastewater Treatment Directive*

VBNC – *Viable But Non-Culturable* (Viáveis mas não cultiváveis)

VCIA – *Veterinary Critically Important Antimicrobial Agents*

VG – Vigilância Genômica

VHIA – *Veterinary Highly Important Antimicrobial Agents*

VIA_s – *Veterinary Important Antimicrobial Agents*

VOC – *Variants of Concern* (Variantes de Preocupação)

VRE – *Vancomycin-Resistant Enterococcus*

WBE – *Wastewater-Based Epidemiology* (Epidemiologia Baseada em Águas Residuais)

WHO – *World Health Organization* (equivalente em inglês de OMS)

WOAH – *World Organisation for Animal Health*

WWTP – *Wastewater Treatment Plant* (equivalente em inglês de ETE)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1. EPIDEMIOLOGIA BASEADA NAS ÁGUAS RESIDUAIS - UM NOVO PARADIGMA NA AVALIAÇÃO DA SAÚDE PÚBLICA	24
3.1.1. Fundamentos e Evolução Histórica	24
3.1.2. EBE e Monitoramento Viral.....	26
3.1.2.1. SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS 2 (SARS- COV-2) 30	
3.1.2.1.1. Taxonomia e Características Moleculares	30
3.1.2.1.2. Epidemiologia, Origem Zoonótica e Dinâmica de Transmissão	30
3.1.2.1.3. Vigilância Genômica	31
3.1.2.1.4. Variantes Emergentes e o Cenário Epidemiológico Brasileiro	32
3.1.3. EBE e Monitoramento Bacteriano.....	32
3.1.3.1. PATÓGENOS PRIORITÁRIOS: <i>ESCHERICHIA COLI</i> E <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	37
3.1.3.1.1. Resistência Antimicrobiana em <i>Enterobacteriaceae</i>.....	37
3.1.3.1.2. Taxonomia, Fisiopatologia e Fatores de Virulência	38
3.1.3.1.3. Relevância Clínica e Epidemiologia das Infecções	39
3.1.3.1.4. Mecanismos Específicos de Resistência	39
3.1.3.1.5. Diretrizes Terapêuticas, Prognóstico e Vigilância Ambiental.....	40
3.2. RESISTÊNCIA BACTERIANA NA PERSPECTIVA <i>ONE HEALTH</i>: MECANISMOS, IMPACTOS ECOLÓGICOS E ESTRATÉGIAS DE VIGILÂNCIA.....	41
3.2.1. Vigilância, Governança e Estratégias de Controle.....	43
3.2.2. Escolha dos Bioindicadores na Vigilância Ambiental.....	45
3.2.3. Determinantes Ecológicos e Dinâmica de Disseminação da Resistência	

Antimicrobiana	46
CAPÍTULO 2- (ARTIGO) VIGILÂNCIA DA COVID-19 EM ÁGUAS RESIDUAIS EM UMA PERSPECTIVA PÓS-PANDÊMICA	49
CAPÍTULO 3- (ARTIGO) VIGILÂNCIA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ESGOTO BRUTO: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENÔMICA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> E <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> INTEGRADA À METAGENÔMICA DIRECIONADA	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
REFERÊNCIAS	117
ANEXOS 140	
ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO - ENVIRONMENT & HEALTH – CAPÍTULO 2	141

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A saúde pública contemporânea enfrenta o desafio imperativo de transpor a vigilância epidemiológica tradicional, historicamente focada no indivíduo, para uma abordagem sistêmica e integrada. Neste contexto, o conceito de "Uma Só Saúde" (*One Health*), preconizado por organismos internacionais, estabelece a indissociabilidade entre a saúde humana, a saúde animal e a integridade dos ecossistemas ambientais (FAO, UNEP, WHO, WOA, 2022). É sob esta ótica que a Epidemiologia Baseada em Esgoto (EBE) ou Wastewater-Based Epidemiology (WBE) se consolidou como uma ferramenta de monitoração ambiental não invasiva, capaz de fornecer um diagnóstico populacional em tempo real e mitigar os vieses de subnotificação clínica, como a escassez de testes ou a prevalência de assintomáticos (CABRAL *et al.*, 2024; DAUGHTON, 2001; MEDEMA *et al.*, 2020).

A EBE fundamenta-se na premissa de que as águas residuárias funcionam como um reservatório complexo de biomarcadores químicos e biológicos. O esgoto bruto, ao agregar excretas de toda uma comunidade, contém informações fidedignas sobre o consumo de fármacos, a exposição a poluentes e a circulação de agentes patogênicos (KITAJIMA *et al.*, 2020). A análise destas matrizes permite identificar tendências epidemiológicas antes mesmo da manifestação clínica em massa, uma vez que a excreção de patógenos frequentemente precede os sintomas ou ocorre em indivíduos que não procuram o sistema de saúde (WU *et al.*, 2020).

A natureza do problema abordado nesta investigação é dual, refletindo duas das maiores crises sanitárias do século XXI: a pandemia de COVID-19 e a emergência silenciosa da Resistência Antimicrobiana (RAM). No que tange à vigilância virológica, a pandemia causada pelo SARS-CoV-2 evidenciou a vulnerabilidade dos sistemas de saúde globais. Estudos corroboram a presença de RNA viral em fezes de pacientes infectados pouco tempo após a infecção, validando a excreção fecal como um fenômeno consistente. De modo geral, a excreção de partículas virais frequentemente precede os sintomas clínicos, característica que consolida o monitoramento via EBE como uma valiosa ferramenta preditiva para a antecipação de surtos e para a identificação precoce da circulação de novas variantes. Ademais, a dinâmica da carga viral e a sua correlação com a severidade da doença foram amplamente documentadas, sugerindo que o monitoramento ambiental pode refletir a gravidade clínica na população (ZHENG *et al.*, 2020; DENG *et al.*, 2022).

No cenário de transição para a endemicidade e no período pós-pandêmico, o escopo de aplicação da EBE reconfigurou-se de maneira substancial. Com o avanço expressivo da cobertura vacinal e a consequente redução da gravidade dos quadros clínicos, a notificação individual e a testagem em massa diminuíram drasticamente; contudo, o vírus mantém sua trajetória evolutiva contínua. Nesse contexto, o monitoramento ambiental consolida-se como uma estratégia crítica para o rastreamento genômico e a detecção precoce de sublinhagens e novas Variantes de Preocupação (VOCs), a exemplo da emergência e diversificação da variante Ômicron. A EBE permite, ainda, correlacionar a carga viral circulante nas águas residuais com indicadores de hospitalização e mortalidade, revelando "ondas silenciosas" de transmissão e preenchendo as lacunas de subnotificação deixadas pelo desmonte das redes de testagem clínica (CABRAL *et al.*, 2024; RAJPUT *et al.*, 2024).

Paralelamente, a resistência bacteriana representa um problema de natureza crônica e progressiva, frequentemente descrita como uma "pandemia silenciosa" (NEILL, 2016). O uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana e veterinária acelerou a seleção de estirpes resistentes. Neste âmbito, a Transferência Horizontal de Genes (THG), frequentemente mediada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons, desempenha um papel fundamental na disseminação e manutenção da resistência antimicrobiana em ambientes complexos. As Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) atuam como pontos críticos neste ciclo, recebendo efluentes carregados de resíduos de antibióticos metabolizados e não metabolizados, bem como bactérias provenientes de esgotos domésticos e hospitalares (YANG; WALSH, 2017).

Nesse sentido, as espécies *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, integrantes do grupo ESKAPE(E), assumem relevância devido à sua notável capacidade de adquirir resistência a múltiplas drogas (MDR) e sobreviver em ambientes hostis. A presença destas bactérias no esgoto extrapola o papel de mero indicador de contaminação, atuando como um reflexo fidedigno da pressão seletiva que ocorre na comunidade. O ambiente das estações de tratamento, rico em nutrientes e com alta densidade bacteriana, favorece a THG, permitindo que determinantes genéticos de resistência a carbapenêmicos e beta-lactâmicos, entre outros, circulem livremente entre bactérias ambientais e patógenos humanos e animais. Consequentemente, observa-se a amplificação do resistoma ambiental, ou seja, o reservatório total de genes de resistência presentes nesse ecossistema (KARKMAN; PÄRNÄNEN; LARSSON, 2019).

A escolha deste tema justifica-se pela necessidade urgente de validar e aprimorar ferramentas de vigilância que sejam custo-efetivas e sustentáveis a longo prazo, especialmente em cenários urbanos complexos. A investigação preenche uma lacuna vital de dados sobre a circulação do SARS-CoV-2 no período de transição entre a emergência pandêmica e a endemicidade, bem como a caracterização e disseminação da resistência aos antibióticos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em efluente comunitário.

Diante do exposto, delineiam-se a seguir os objetivos geral e específicos que nortearam esta investigação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Empregar a Epidemiologia Baseada em Esgoto (EBE) como ferramenta estratégica de vigilância em saúde para monitorar a circulação e evolução molecular do SARS-CoV-2, bem como integrar a caracterização da resistência aos antimicrobianos fenotípica e genômica de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* recuperados de esgoto bruto à análise metagenômica.

2.2 Objetivos Específicos

Para o cumprimento do objetivo geral, estabelecemos os seguintes objetivos específicos, divididos em eixos de monitoramento viral e bacteriano:

Eixo 1: Vigilância Viroológica (SARS-CoV-2)

- Quantificar a carga viral de SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais ao longo dos períodos pandêmico e pós-pandêmico, estabelecendo a prevalência do patógeno nos pontos de amostragem;
- Identificar as variantes genéticas circulantes e predominantes em função da temporalidade e localização geográfica, correlacionando-as com os registros filogenéticos oficiais;
- Correlacionar a concentração de RNA viral detectada nos efluentes com os indicadores epidemiológicos clínicos locais (número de casos notificados e óbitos), avaliando o valor preditivo da EBE como sistema de alerta precoce.

Eixo 2: Vigilância Bacteriana (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*)

- Isolar e identificar *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* provenientes de amostras de esgoto bruto coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto Uberabinha (ETE-Uberabinha) de Uberlândia-MG;
- Estabelecer a resistência fenotípica por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) a antimicrobianos de relevância clínica e veterinária de cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*;
- Caracterizar genomicamente os isolados por sequenciamento do genoma completo, determinando *sequence types* (MLST), genes e mutações relacionados à resistência e virulência, além da presença de replicons plasmidiais;

- Aplicar a metagenômica direcionada por enriquecimento de alvos nas amostras de esgoto para recuperar taxonomicamente representantes do grupo ESKAPEE, identificando determinantes de resistência (resistoma), comparando os achados com os obtidos no sequenciamento dos isolados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Epidemiologia Baseada nas Águas Residuais - Um Novo Paradigma na Avaliação da Saúde Pública

3.1.1. Fundamentos e Evolução Histórica

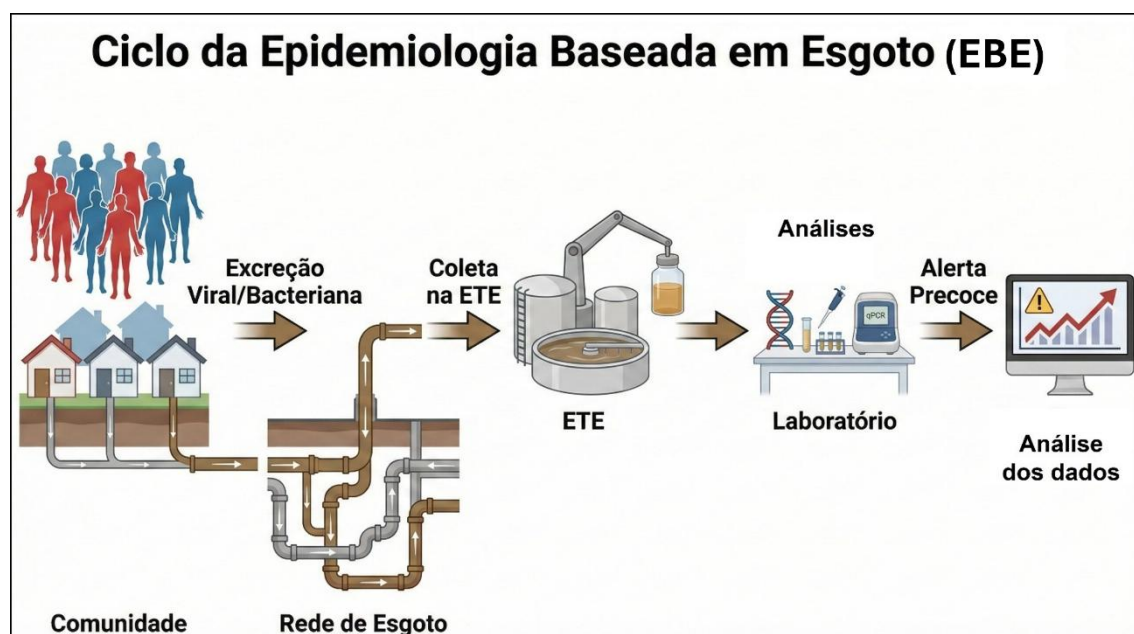
O avanço demográfico e a ocupação de novos territórios têm gerado impactos ambientais significativos, como o desmatamento e o uso intensivo do solo. Esse fenômeno promove um contato mais estreito entre populações humanas e animais, sejam eles selvagens ou domésticos (AUSTIN, 2021). Tal interação potencializa a transmissão de doenças interespecíes e o surgimento de patógenos, constituindo um grande desafio para a saúde pública contemporânea. Dados apontam que a maioria das novas doenças descobertas anualmente possui origem animal, causando um impacto severo na morbidade e mortalidade global (MARTINS, 2022).

O conceito *One Health* (Uma Só Saúde) confirma-se como uma estratégia vital, integrando de forma indissociável a saúde humana, a saúde animal e a integridade ecossistêmica para o monitoramento e a prevenção de epidemias (TRAN; REINHARD; GIN, 2018; FAO, 2022; CONFORTI et al., 2025). Recentemente, impulsionadas por emergências sanitárias globais, como a pandemia de COVID-19 e os surtos recorrentes de Influenza, novas metodologias de monitoramento ambiental ganharam notoriedade científica. A detecção e quantificação de patógenos virais em matrizes ambientais, notadamente em efluentes e corpos hídricos, transformaram-se em fontes inestimáveis de dados epidemiológicos. Essa abordagem viabiliza uma vigilância preditiva, ágil e fundamentada em evidências robustas, expandindo a capacidade de resposta dos órgãos de saúde pública (AGUIAR-OLIVEIRA et al., 2020; CABRAL et al., 2024; CAMILLO et al., 2025).

A Epidemiologia Baseada no Esgoto (EBE) consolidou-se de um projeto de pesquisa para uma ferramenta oficial e estratégica de saúde pública, fornecendo análises

epidemiológicas abrangentes e economicamente viáveis (MENDES *et al.*, 2022). Metodologicamente, trata-se de uma abordagem não invasiva baseada no monitoramento em tempo real de biomarcadores, que variam de compostos antropogênicos a patógenos, excretados nas bacias hidrográficas por populações inteiras (DAUGHTON, 2001; ZUCCATO *et al.*, 2005). Ao rastrear esses efluentes, a EBE supera as limitações da vigilância clínica individualizada, permitindo antecipar tendências de aumento de casos infecciosos antes mesmo de suas confirmações clínicas (YANG; WALSH, 2017; CHOI *et al.*, 2018; KITAJIMA *et al.*, 2020; LARSEN; WIGGINTON, 2020; CABRAL *et al.*, 2024). O fluxo metodológico que viabiliza essa abordagem, desde a excreção dos biomarcadores até a interpretação dos dados, é demonstrado na Figura 1.

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vigilância da Epidemiologia Baseada em Esgoto (EBE).



Legenda Figura 1: O esquema representa as etapas do monitoramento ambiental por EBE: (1) excreção viral e bacteriana pelos indivíduos da comunidade; (2) transporte dos biomarcadores pela rede coletora de esgoto; (3) coleta das amostras na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE); (4) processamento e análises laboratoriais, incluindo extração de ácidos nucleicos e quantificação por qPCR; e (5) análise dos dados gerados, possibilitando a emissão de alertas precoces à saúde pública. Fonte: elaborado pelo autor com auxílio da IA – Gemini.

Historicamente, a abordagem por EBE obteve notoriedade a partir da hipótese de Daughton (2001) sobre o rastreamento de resíduos farmacêuticos, sendo validada empiricamente por Zuccato et al. (2005), que quantificou cocaína em águas residuais. Desde então, seu escopo expandiu-se substancialmente para abranger uma vasta gama de biomarcadores endógenos e exógenos, incluindo álcool, tabaco, pesticidas, filtros UV, marcadores de estresse oxidativo, químicos industriais e patógenos virais, como os da Hepatite A e Pólio. Além da robustez técnica, o método destaca-se por contornar dilemas éticos ao utilizar dados populacionais agregados e anonimizados, o que facilita ou desobriga a aprovação por comitês de ética e permite respostas ágeis dos serviços de saúde pública (DAUGHTON, 2001; ZUCCATO et al., 2005; KASPRZYK-HORDERN, 2020).

A eficácia da EBE como sistema de alerta precoce é exemplificada pelo programa de monitoramento de Israel, ativo desde 1988. A robustez desse sistema ficou evidente em 2013, na cidade de Rahat, quando a análise de esgoto detectou a circulação do vírus da Pólio antes que casos clínicos fossem reportados. Essa detecção antecipada foi fundamental para que as autoridades de saúde mobilizassem campanhas de vacinação e medidas de contingência a tempo, consolidando a análise de esgotos como uma ferramenta vital de vigilância epidemiológica (MARTIN *et al.*, 2020).

Reconhecendo a robustez dessa metodologia, diversas nações passaram a institucionalizar a EBE em seus programas oficiais de vigilância: nos Estados Unidos, o CDC estabeleceu o *National Wastewater Surveillance System* (NWSS) como pilar permanente para o rastreamento do SARS-CoV-2, MonkeyPox e outros patógenos de notificação compulsória (CDC, 2024); na União Europeia, a reformulação da Diretiva de Tratamento de Águas Residuais Urbanas passou a exigir o monitoramento sistemático de vírus respiratórios e marcadores de RAM em médias e grandes aglomerações urbanas, consolidando a infraestrutura de saneamento como primeira linha de inteligência epidemiológica (HOCK et al., 2026).

3.1.2. EBE e Monitoramento Viral

A epidemiologia baseada em águas residuais constitui uma estratégia de vanguarda para o mapeamento comunitário de agentes virais infecciosos. Ao monitorar a disseminação viral na população ampliada, é possível obter previsões epidemiológicas indiretas fundamentais. A robustez e a eficácia preditiva dessa abordagem não são

inéditas, tendo sido amplamente validadas por experiências pregressas bem-sucedidas no rastreamento de surtos de poliovírus e dos vírus da Hepatite A e Norovírus (HELLMÉR et al., 2014; MANOR et al., 2014; SMITH; PADDY; SIMMONDS, 2016; LARSEN; WIGGINTON, 2020).

Antes mesmo da consolidação da vigilância do SARS-CoV-2, a EBE já demonstrava sua utilidade no monitoramento de vírus ubíquos usados como marcadores de contaminação antropogênica. Em uma ETE no Rio de Janeiro, o Poliomavírus JC (JCPyV) foi detectado em 96 % das amostras de esgoto bruto e em 43 % do esgoto tratado, com cargas de até $3,2 \times 10^5$ cópias genômicas, evidência de sua persistência mesmo após o tratamento, o que reforça seu potencial como indicador da eficiência das ETEs (FUMIAN et al., 2010).

Achados semelhantes foram relatados para outros vírus ambientais no Brasil: o *Torque teno virus* (TTV) e o Adenovírus foram identificados tanto em efluentes de ETEs quanto em 28,6 % das águas superficiais do Arroio Dilúvio, em Porto Alegre (VECCHIA et al., 2012); o *Circo-like virus Brazil* (CLV-BR), um agente emergente de patogenicidade ainda pouco definida, teve sua circulação contínua confirmada em esgoto da região metropolitana de São Paulo, ilustrando o potencial da EBE para a descoberta de novos agentes virais (CASTRIGNANO et al., 2017); em Goiás, a detecção de enterovírus (4,4 %) variou conforme a plataforma de PCR utilizada, evidenciando desafios de inibição por compostos orgânicos em matrizes ambientais (BORDONI et al., 2023); e em São José do Rio Preto (SP), a persistência de Enterovírus em 7,35 % do efluente mesmo após desinfecção, associada a picos sazonais de *Coxsackievirus* que precederam surtos de Doença Mão-Pé-Boca, reforçou o valor preditivo da vigilância ambiental independentemente da notificação clínica. Integrados, esses dados comprovam que a vigilância ambiental contínua rastreia a perpetuação do ciclo fecal-oral e viabiliza a antecipação de intervenções em saúde pública, atuando como um alerta precoce vital e independente da notificação clínica compulsória de casos leves (SOUZA, 2024).

Nesse esteio, a pandemia de COVID-19, ocasionada pelo SARS-CoV-2, catapultou a aplicação da EBE em escala global, consolidando-a como um pilar complementar essencial à testagem clínica (CABRAL et al., 2024; POLO et al., 2020). Ao quantificar biomarcadores virais no esgoto bruto, o monitoramento provou ser um método altamente sensível para rastrear a dinâmica de transmissão em comunidades inteiras, fornecendo estimativas de prevalência quase em tempo real e agilizando a

notificação às autoridades sanitárias (RIVA *et al.*, 2020). A robustez dessa abordagem é corroborada por uma correlação de 95 % entre a concentração viral nas águas residuais e os diagnósticos clínicos, conferindo-lhe um caráter preditivo capaz de antecipar surtos em até três semanas, o que é vital para o planejamento de intervenções preventivas (CAUSANILLES *et al.*, 2018).

A base fisiopatológica dessa aplicação está bem estabelecida: o RNA viral do SARS-CoV-2 é excretado nas fezes de indivíduos infectados, sintomáticos, oligossintomáticos ou assintomáticos, independentemente da gravidade do quadro clínico (PARASA *et al.*, 2020; ZHENG *et al.*, 2020). Embora a transmissão fecal-oral direta ainda careça de comprovação definitiva, essa excreção consistente de material genético viral foi o que fundamentou o desenvolvimento das estratégias de monitoramento ambiental para a COVID-19 (THOMPSON *et al.*, 2020).

A adoção dessa estratégia durante a pandemia foi expressiva: mais de 50 países, incluindo Austrália, Holanda e Estados Unidos, integraram a vigilância ambiental às suas rotinas de saúde pública (AGUIAR-OLIVEIRA *et al.*, 2020; DENG *et al.*, 2022). No Brasil, iniciativas pioneiras foram implementadas em Minas Gerais, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul; em Belo Horizonte e Contagem (MG), por exemplo, o monitoramento de bacias hidrográficas revelou uma progressão na detecção de RNA viral de 29 % para 100 % das amostras analisadas, acompanhando a curva epidemiológica local. A aplicação da EBE em países em desenvolvimento, contudo, enfrenta desafios específicos ligados à deficiência em saneamento básico: em regiões onde o acesso à rede de esgoto é limitado e o uso de fossas ou defecação a céu aberto é comum, rios poluídos assumem o papel de matrizes analíticas para a vigilância ambiental (DE FREITAS BUENO *et al.*, 2022).

A evolução das técnicas de biologia molecular permitiu que a EBE ultrapassasse a busca por patógenos isolados, avançando para a caracterização do viroma, que é o conjunto total de vírus excretados por uma população. A vigilância genômica ampla, impulsionada pelo Sequenciamento de Nova Geração (NGS), tornou-se imprescindível para a detecção precoce e emergência de variantes de vírus emergentes e reemergentes antes de seu estabelecimento clínico. No contexto brasileiro, estudos recentes demonstraram a viabilidade da aplicação de painéis de captura viral abrangentes em águas residuais. Essa abordagem tem permitido identificar simultaneamente uma vasta diversidade viral, englobando desde a circulação contínua do SARS-CoV-2 em períodos de baixa notificação clínica até patógenos entéricos e poliomavírus humanos, que atuam

como marcadores de contaminação antropogênica e indicadores de risco populacional (CLARO et al., 2021; CAMILLO et al., 2025).

Além do monitoramento urbano geral, a EBE aplica-se estrategicamente à vigilância de efluentes hospitalares, infraestruturas consideradas *hotspots* para a excreção concentrada e a disseminação de patógenos virulentos. No contexto da pandemia de COVID-19, a análise dessas matrizes demonstrou ser crucial. A quantificação molecular do SARS-CoV-2, realizada primariamente pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR), viabilizou o rastreamento preciso do RNA viral diretamente nos pontos de descarte das unidades de saúde. Estudos como os revisados por Marques *et al.* (2022) e Soares et al. (2025) evidenciam que a detecção do genoma viral no esgoto sanitário reflete a dinâmica de infecção na comunidade e atua como uma ferramenta complementar à vigilância clínica tradicional. Ademais, essas investigações alertam que cargas significativas de material genético podem remanescer no efluente hospitalar caso os processos de tratamento e desinfecção prévios ao descarte na rede pública sejam insuficientes. A elevada prevalência e persistência desses marcadores moleculares sublinham a necessidade imperativa de protocolos de inativação rigorosos e tratamentos avançados *in situ*, fundamentais para mitigar o impacto sanitário nos corpos hídricos receptores e prevenir a disseminação ambiental de agentes de alto risco nosocomial (MARQUES et al., 2022; SOARES et al., 2025).

No contexto pós-pandêmico, o monitoramento ambiental do SARS-CoV-2 por EBE mantém-se como uma estratégia de vigilância indispensável. Com o declínio da testagem clínica em massa e a transição para a endemidade, o esgoto permanece como uma das poucas matrizes capazes de fornecer dados populacionais contínuos sobre a circulação viral, independentemente da busca espontânea por atendimento médico. Estudos recentes têm confirmado a eficácia do RNA viral excretado como marcador sensível mesmo em períodos de baixa carga infecciosa, consolidando o esgoto como indicador confiável de circulação comunitária (CABRAL *et al.*, 2024; RAJPUT *et al.*, 2024). Paralelamente, a vigilância genômica via sequenciamento de nova geração em amostras de efluentes tornou-se essencial para a detecção precoce de novas sublinhagens e Variantes de Preocupação (VOCs). A identificação de variantes no esgoto antes de sua confirmação clínica em larga escala permite orientar a atualização de plataformas vacinais, fundamentar decisões sobre reforços imunológicos e antecipar estratégias de

resposta em saúde pública, configurando a EBE como um pilar permanente da vigilância epidemiológica global no período endêmico (DENG *et al.*, 2022; CLARO *et al.*, 2021).

3.1.2.1. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

3.1.2.1.1. Taxonomia e Características Moleculares

O SARS-CoV-2 pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, sendo um dos sete coronavírus conhecidos capazes de infectar humanos e um dos três associados a quadros respiratórios graves, junto ao SARS-CoV-1 e ao MERS-CoV (HUI; ZUMLA, 2019; WONG *et al.*, 2019; ALI *et al.*, 2020; MINIGULOV *et al.*, 2024). Trata-se de um vírus envelopado com genoma de RNA fita simples, notavelmente extenso para um vírus de RNA (26,4-31,7 kb), cuja estabilidade é sustentada por um complexo de replicação com capacidade de correção de erros (*proofreading*), um traço incomum entre vírus de RNA (HARTENIAN *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2020). A proteína Spike (S), responsável pela ligação ao receptor celular ACE2, é a região de maior plasticidade genômica do vírus: mutações como a E484K alteraram a afinidade de ligação e favoreceram o escape à neutralização por anticorpos, sustentando a emergência sucessiva de variantes de interesse epidemiológico (GORBALENYA *et al.*, 2020; HO *et al.*, 2021; MICHELON, 2021; WU *et al.*, 2020). Em contraste, a Nucleoproteína (gene N), responsável pelo empacotamento do RNA viral, apresenta maior estabilidade genética, o que a torna um alvo preferencial para diagnóstico molecular (CHAN, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

3.1.2.1.2. Epidemiologia, Origem Zoonótica e Dinâmica de Transmissão

As evidências atuais fundamentam a hipótese de uma origem zoonótica para o SARS-CoV-2, provavelmente remanescente de quirópteros. A linhagem RaTG13, isolada de morcegos *Rhinolophus affinis*, destaca-se como a mais próxima filogeneticamente, com similaridade superior a 90 % (ASHOUR *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2021). Acredita-se que o vírus ancestral tenha sofrido pressões evolutivas ao transitar por hospedeiros intermediários, como pangolins, serpentes ou civetas, viabilizando o salto interespecie para humanos (CUI; LI; SHI, 2019).

A emergência do patógeno foi identificada em Wuhan, China, em uma série de pacientes com pneumonia de etiologia desconhecida (LAMERS; HAAGMANS, 2022). Esse surto local disseminou-se rapidamente, levando a OMS a declarar a COVID-19

como pandemia em 12 de março de 2020. O impacto global foi devastador: registram-se mais de 760 milhões de infecções em todo o mundo, resultando em aproximadamente 7 milhões de óbitos. No cenário brasileiro, a severidade da pandemia refletiu-se em mais de 700.000 mortes registradas, gerando profundas instabilidades sociais e econômicas e o colapso pontual de sistemas de saúde (AGUIAR-OLIVEIRA *et al.*, 2020). A transmissão ocorre predominantemente por inalação de gotículas respiratórias e aerossóis. O ciclo replicativo inicia-se com a ligação da proteína S ao receptor ACE2, seguida pela fusão da membrana e liberação do genoma no citoplasma (KIM *et al.*, 2020; MEDEMA *et al.*, 2020; METSKY *et al.*, 2020).

Clinicamente, a infecção apresenta um espectro amplo, variando de quadros leves a fatais (HUI; ZUMLA, 2019). Nos estágios iniciais, a sintomatologia inclui febre, tosse, odinofagia, mialgia, cefaleia e fadiga. Entretanto, a evolução para a forma grave da COVID-19 caracteriza-se por pneumonia severa, dispneia e comprometimento pulmonar bilateral, evidenciado radiologicamente por opacidades em "vidro fosco" (ALI *et al.*, 2020; WONG *et al.*, 2019; YANG; GUI; XIONG, 2020). A incidência de sintomas gastrointestinais e o isolamento viral em fezes corroboram a hipótese de transmissão fecal-oral, reforçada pela capacidade do vírus de infectar organoides intestinais humanos *in vitro* (JIN *et al.*, 2020; JONES *et al.*, 2020; WAN *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2020).

3.1.2.1.3. Vigilância Genômica

A Vigilância Genômica (VG) vai além do diagnóstico clínico, consolidando-se como um pilar estratégico que utiliza informações moleculares para monitoramento e tomada de decisão em saúde pública (SINTCHENKO; IREDELL; GILBERT, 2007). Embora o sequenciamento tenha evoluído historicamente, o advento do Sequenciamento de Próxima Geração (Next-Generation Sequencing - NGS) revolucionou a área ao permitir a comparação massiva de ácidos nucleicos, viabilizando a identificação de patógenos em tempo real (DENG; DEN BAKKER; HENDRIKSEN, 2016).

No contexto do SARS-CoV-2, a integração entre dados genômicos e informações epidemiológicas (como localização geográfica e data de coleta) fundamentou o conceito de filodinâmica. Esta abordagem aplica análises estatísticas a populações virais intimamente relacionadas para inferir parâmetros demográficos e processos populacionais que não seriam perceptíveis apenas pela vigilância tradicional (YAMASOBA *et al.*, 2022). A análise dos padrões espaciais de dispersão viral permite

reconstruir as relações de ancestralidade e conectar epidemiologicamente os eventos de transmissão durante surtos, detalhando como o vírus se move geograficamente ao longo do tempo (VOLZ; KOELLE; BEDFORD, 2013).

A VG permite reconstruir a árvore filogenética das linhagens virais, identificando e conectando epidemiologicamente pacientes durante surtos ou eventos de transmissão. Para padronizar a classificação dessa vasta diversidade genética, a comunidade científica adotou o sistema de nomenclatura dinâmica *Pango*. Segundo este sistema, uma nova linhagem é designada quando há evidência filogenética de ancestralidade comum e evidências de ganho evolutivo, permitindo o rastreamento preciso da disseminação viral em escala global (RAMBAUT et al., 2021).

3.1.2.1.4. Variantes Emergentes e o Cenário Epidemiológico Brasileiro

No Brasil, a disseminação do SARS-CoV-2 ocorreu de forma heterogênea, com grandes centros urbanos e rodovias federais atuando como principais vetores de dispersão inter-regional. São Paulo, por exemplo, respondeu por mais de 85 % da transmissão inicial no país (CANDIDO *et al.*, 2020; NICOLELIS *et al.*, 2021).

O cenário nacional foi marcado pela substituição sucessiva de linhagens dominantes: a variante Gamma (P.1), emergida em Manaus com mutações críticas na Spike (K417T, E484K, N501Y), aumentou significativamente a transmissibilidade e a capacidade de reinfeção (COUTINHO *et al.*, 2021; FARIA *et al.*, 2021). Já a variante Zeta (P.2), identificada no Rio de Janeiro, surgiu de forma independente da Gamma, mas desenvolveu a mesma mutação E484K por evolução convergente, ou seja, as duas variantes adquiriram separadamente a mutação, sem que uma tenha derivado da outra (MICHELON, 2021); e a introdução da Delta, seguida pela Ômicron e subvariantes (BA.1, BA.2, BQ.1), consolidou um padrão contínuo de substituição de linhagens dominantes ao longo da pandemia (SHUAI *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2022; YAMASOBA *et al.*, 2022).

3.1.3. EBE e Monitoramento Bacteriano

A aplicação da EBE no monitoramento da Resistência Antimicrobiana (RAM) representa um avanço crítico na vigilância em saúde pública, alinhando-se diretamente às diretrizes estratégicas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e ao escopo do Plano de Ação Conjunto *One Health* (FAO, 2022). Visto que as Estações de Tratamento de Esgoto

(ETEs) recebem efluentes de diversas fontes, residenciais, hospitalares e industriais, elas atuam como grandes reservatórios e pontos de convergência de genes de resistência a antibióticos (ARGs). A análise dessas matrizes permite estimar a carga real de resíduos de antimicrobianos no ambiente e identificar a circulação comunitária de patógenos resistentes de forma mais representativa e menos enviesada do que a vigilância clínica tradicional, a qual frequentemente se restringe aos quadros infecciosos graves hospitalizados (PRUDEN *et al.*, 2021; CONFORTI *et al.*, 2025).

Essa limitação da vigilância clínica tradicional, marcada pela subnotificação, pelo viés de seleção de pacientes graves e por ambiguidades no diagnóstico fenotípico, reforça por que a EBE se consolida como ferramenta vital, não invasiva e custo-efetiva para o rastreamento da resistência bacteriana (DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019; DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2013). Ao contrário da vigilância hospitalar, que captura apenas a "ponta do iceberg", o esgoto funciona como um reservatório que reflete o "microbioma coletivo": a análise de matrizes de esgoto bruto permite capturar microrganismos excretados por toda a população, sintomática ou assintomática, oferecendo uma visão geral realista da carga de resistência circulante (PRUDEN *et al.*, 2021). Estudar esses patógenos sob essa ótica suplanta o monitoramento ambiental clássico, configurando-se como estratégia robusta de *One Health* para antecipar e mitigar a resistência bacteriana (HENDRIKSEN *et al.*, 2019).

A literatura converge ao apontar as ETEs não apenas como pontos de coleta, mas como reatores biológicos ativos onde ocorre pressão seletiva. Essas infraestruturas abrigam comunidades bacterianas densas expostas a níveis subinibitórios de antibióticos, desinfetantes e metais pesados, configurando-se como *hotspots* ideais para a THG. Distinguir a origem dessa pressão, se proveniente de esgotos hospitalares, da comunidade ou gerada dentro do próprio tratamento, é fundamental para mitigar os riscos. O ambiente desempenha uma função subestimada na evolução da RAM, servindo tanto de reservatório quanto de vetor de retorno de bactérias resistentes para a população humana por meio do reuso de água ou contaminação de corpos hídricos (HUIJBERS; LARSSON; FLACH, 2020; LARSSON; FLACH, 2022).

A persistência ambiental de genes de resistência é ativamente sustentada por elementos genéticos móveis: plasmídeos conjugativos de alto peso molecular, como os dos grupos de incompatibilidade IncF e IncC, carregam genes como *bla*~OXA-48~ e *bla*~NDM~ com sistemas de estabilidade que garantem sua manutenção mesmo na

ausência de pressão seletiva direta, permitindo que persistam e transformem novas bactérias ambientais (PULJKO et al., 2024).

A intersecção entre eventos climáticos extremos e a disseminação da RAM foi recentemente ilustrada pelas inundações históricas no Rio Grande do Sul em 2024, cujas águas de enchente carregaram *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* portadoras de genes de carbapenemases (*bla*~KPC~ e *bla*~NDM~), transformando o transbordamento sanitário em vetor de disseminação em larga escala para a população e equipes de resgate. Esse cenário reforça que mudanças climáticas atuam como catalisadores biológicos da RAM, exigindo que a vigilância ambiental seja integrada aos planos de resposta a desastres (CARDOSO et al., 2025).

Estudos têm evidenciado a utilidade da Epidemiologia Baseada em Esgoto (EBE) no monitoramento bacteriano, transcendendo a vigilância genérica ao oferecer a precisão necessária para o rastreamento de mecanismos de resistência específicos em patógenos críticos. A detecção direta de genes como *bla*KPC, *bla*NDM e *bla*OXA-48 no esgoto permite mapear a circulação silenciosa de clones produtores de carbapenemases na comunidade, e a persistência destes determinantes genéticos em matrizes ambientais pode indicar falhas nos protocolos de tratamento de efluentes. Isso sugere a não eliminação de células viáveis ou a liberação de DNA livre capaz de transformar outras bactérias no ecossistema (ZHANG et al., 2021). Consequentemente, essa abordagem molecular transforma o esgoto em uma matriz de rastreamento epidemiológico abrangente da malha urbana, antecipando tendências que só seriam detectadas no ambiente hospitalar semanas ou meses depois (MAO et al., 2020).

Essa estratégia de direcionar o foco para alvos de alta relevância clínica, como *Enterobacterales* produtores de carbapenemases, em detrimento de marcadores genéricos, consolida-se na literatura contemporânea como o meio ideal para fortalecer as políticas de vigilância. Essa conduta metodológica fornece dados mais estratégicos e aplicáveis à tomada de decisão por parte dos gestores em saúde, viabilizando a identificação precoce do aumento da circulação comunitária ou de falhas nas intervenções de controle sanitário antes da eclosão de crises hospitalares (CONFORTI et al., 2025).

Alinhada a essa necessidade, a interpretação quantitativa da contaminação ambiental por bactérias multirresistentes requer métricas refinadas que transcendam a simples detecção absoluta. Para tal, destaca-se a utilização da razão entre *Enterobacterales* Resistentes a Carbapenêmicos (CRE) e a contagem total de *Enterobacterales* como um

indicador normalizado de prevalência. Em seu estudo, URASE; GOTO; SATO (2022) observaram que, embora as concentrações absolutas de CRE fossem significativamente maiores em efluentes hospitalares, a razão de resistência (CRE/Total de Enterobacterales) em efluentes domésticos tratados ainda refletia uma circulação comunitária preocupante. Essa abordagem diferencia picos de contaminação orgânica geral de aumentos específicos na circulação de genes de resistência, permitindo uma avaliação de risco mais precisa sobre a disseminação de determinantes genéticos, como *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, na comunidade.

A complexidade da dinâmica de resistência foi evidenciada durante a pandemia de COVID-19, onde o uso massivo de antibióticos como a azitromicina em pacientes virais pode ter exacerbado a pressão seletiva. Em um estudo de caso na região metropolitana de Belo Horizonte investigou-se a correlação entre a carga viral de SARS-CoV-2 e a presença de bactérias resistentes a antibióticos (BRAs) no esgoto. Os resultados demonstraram correlações significativas entre a concentração do vírus e a abundância de bactérias resistentes à azitromicina em duas das três ETEs monitoradas, sugerindo que o tratamento da pandemia viral teve efeitos colaterais diretos no resistoma bacteriano urbano. Curiosamente, o estudo não encontrou diferenças estatísticas significativas na concentração de BRAs entre bacias de esgotamento com diferentes perfis socioeconômicos, exceto para bactérias resistentes ao meropenem (antibiótico de uso restrito hospitalar), reforçando que a resistência é um problema disseminado, mas com nuances locais importantes (SANTOS, 2024).

A transição das técnicas dependentes de cultivo para métodos moleculares avançados incrementou substancialmente a sensibilidade analítica da EBE. Enquanto os ensaios fenotípicos tradicionais apresentam limitações intrínsecas, notadamente a incapacidade de detectar células no estado viável, mas não cultivável (VBNC), as abordagens moleculares superam tal barreira metodológica. Nesse cenário, a PCR quantitativa (qPCR) e a PCR digital (dPCR) consolidaram-se como métodos de referência para a quantificação precisa de alvos genéticos em matrizes ambientais complexas e ricas em inibidores, como os efluentes sanitários. Por sua vez, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e a metagenômica viabilizaram a caracterização abrangente do resistoma, possibilitando o rastreamento simultâneo de múltiplos determinantes de resistência e virulência de forma independente da pré-seleção de alvos. Contudo, os elevados custos operacionais e a exigência de infraestrutura avançada em bioinformática ainda restringem a

incorporação rotineira destas tecnologias na vigilância ambiental de países em desenvolvimento (LI *et al.*, 2020; MAO *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços, a interpretação dos dados epidemiológicos enfrenta desafios metodológicos, particularmente a influência de variáveis ambientais. Estudos indicam correlações significativas entre a sazonalidade e a carga de ARGs, observando picos no outono e inverno que coincidem com o aumento de infecções respiratórias e prescrições de antibióticos. Para que a EBE possa subsidiar efetivamente políticas públicas, é necessário integrar dados de monitoramento químico (resíduos de antibióticos), microbiológico e variáveis climáticas, consolidando uma vigilância verdadeiramente *One Health* (CLARKE *et al.*, 2024; HILL *et al.*, 2024)

Nesse cenário, a busca por uma padronização metodológica ganha contornos práticos e normativos em escala internacional. Como resposta a essa necessidade, a União Europeia avançou com a reformulação da Diretiva de Tratamento de Águas Residuais Urbanas (*Urban Wastewater Treatment Directive* – UWWTD). A implementação do Artigo 17 desta diretiva estabelece a obrigatoriedade do monitoramento da Resistência Antimicrobiana (RAM) em aglomerações urbanas com população superior a 100.000 habitantes, instituindo um sistema harmonizado de indicadores que prioriza alvos específicos, como *Escherichia coli* produtora de ESBL e carbapenemases. Esse movimento regulatório não apenas sinaliza uma tendência irreversível para a incorporação da EBE nas políticas globais de saneamento, mas também serve como referencial estratégico para a futura estruturação de legislações em países em desenvolvimento, como o Brasil. Diante dessa vanguarda normativa, torna-se ainda mais importante o alinhamento com as estratégias globais de monitoramento estabelecidas pela OMS (HOCK *et al.*, 2026).

Diante da vulnerabilidade climática emergente e do alinhamento com as estratégias globais de monitoramento, a OMS, por meio do Sistema Global de Vigilância da Resistência e Uso de Antimicrobianos (GLASS) e da Lista de Patógenos Bacterianos Prioritários (BPPL 2024), eleva ao nível crítico os *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração, categoria que inclui *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* e que integra, junto com os demais membros do ESKAPEE (composto por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e

Escherichia coli), uma diretriz central para antecipar e mitigar futuras crises sanitárias e climáticas (OYENUGA et al., 2024; WHO, 2025; ELBEHIRY et al., 2026).

3.1.3.1. PATÓGENOS PRIORITÁRIOS: *ESCHERICHIA COLI* E *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

3.1.3.1.1. Resistência Antimicrobiana em *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* constitui um dos grupos de patógenos mais prevalentes e clinicamente significativos na medicina humana moderna. Estes microrganismos, que variam desde comensais inócuos da microbiota intestinal até patógenos virulentos capazes de causar infecções sistêmicas graves, representam um desafio contínuo para as instituições de saúde globais. Nas últimas décadas, o cenário epidemiológico destas infecções sofreu uma transformação caracterizada pela emergência e disseminação acelerada de cepas multirresistentes (MDR). O manejo clínico tornou-se progressivamente complexo, uma vez que a resistência aos antimicrobianos convencionais compromete a eficácia das terapias empíricas iniciais, fator diretamente associado ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade hospitalar (DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2013).

Dois gêneros concentram a maior relevância clínica e regulatória dentro desse cenário: *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Ambos integram o grupo ESKAPE(E) de patógenos multirresistentes prioritários, acrônimo posteriormente estendido para incluir *E. coli* diante de sua ampla disseminação global de fenótipos multirresistentes (RIZI; GHAZVINI; FARSIANI, 2019). Essa priorização foi reafirmada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que, na atualização de 2024 da Bacterial Priority Pathogens List, classificou *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos como o patógeno de maior pontuação de risco entre todos os avaliados (84 %), com *E. coli* resistente a cefalosporinas de terceira geração também no grupo de prioridade crítica (WHO, 2024).

A crise da resistência nesses gêneros é um processo evolutivo contínuo impulsionado pela pressão seletiva. Inicialmente, o foco das preocupações epidemiológicas centrava-se na disseminação de plasmídeos codificadores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), sobretudo as variantes da família CTX-M, hoje dominantes globalmente, com mais de 220 subtipos descritos, e responsáveis por deslocar as antigas famílias TEM e SHV como principal determinante de resistência a oximiinocefalosporinas em *E. coli* e *K. pneumoniae* (NASROLLAHIAN; GRAHAM; HALAJI, 2024). Essas enzimas hidrolisam a maioria das penicilinas e cefalosporinas, o que forçou

a comunidade médica a adotar os carbapenêmicos, fármacos de amplo espectro e alta estabilidade, como terapia padrão (*gold standard*) para infecções graves por Gram-negativos (DELGADO-VALVERDE et al., 2013).

No entanto, o uso intensivo desta "última linha" de defesa catalisou uma nova e alarmante fase epidemiológica: a proliferação de enterobactérias produtoras de carbapenemases (CRE). A disseminação de genes codificadores de carbapenemases, como KPC (originalmente descrita em isolados de *K. pneumoniae*, mas hoje amplamente disseminada também em *E. coli*), das metalo-beta-lactamases (VIM, IMP e NDM) e da OXA-48, representam um ponto de inflexão: em muitos cenários, essas enzimas emergem em cepas que já carregam ESBLs como a família CTX-M, acumulando mecanismos de resistência e inativando praticamente todos os beta-lactâmicos disponíveis, restringindo drasticamente o arsenal terapêutico e obrigando o uso de antibióticos antigos e tóxicos (como as polimixinas) ou de farmacocinética complexa (como a fosfomicina), frequentemente em regimes combinados (RIZI; GHAZVINI; FARSIANI, 2019; DANTAS et al., 2022).

3.1.3.1.2. Taxonomia, Fisiopatologia e Fatores de Virulência

A plasticidade taxonômica observada em Enterobacteriaceae de forma mais ampla, incluindo reclassificações de espécie e complexos polifiléticos de difícil diferenciação por métodos bioquímicos convencionais, cuja identificação genérica em nível de gênero ou complexo acaba mascarando a epidemiologia real de clones de alto risco, ilustra a dinâmica evolutiva do grupo e reforça a importância de métodos moleculares (CHAVDA et al., 2016; TINDALL; SUTTON; GARRITY, 2017; WU; FENG; ZONG, 2018; DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019; NIMMANA BK, 2026)

E. coli é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo e tipicamente móvel por flagelos peritríquios. Embora a maior parte de suas linhagens componha de forma inócua a microbiota intestinal, sua notável plasticidade genômica permitiu a emergência de patotipos patogênicos distintos intestinais (ETEC, EPEC, EHEC, entre outros) e extraintestinais (ExPEC), destacando-se a *E. coli* uropatogênica (UPEC), principal agente etiológico de infecções do trato urinário comunitárias e hospitalares (NASROLLAHIAN; GRAHAM; HALAJI, 2024).

K. pneumoniae, por sua vez, é um bacilo Gram-negativo imóvel cuja cápsula polissacarídica espessa, responsável pelo aspecto mucoide de suas colônias, constitui seu principal fator de virulência, protegendo a bactéria da fagocitose e da ação bactericida do soro. Descreveu-se também um patotipo hipervirulento (hvKp), inicialmente restrito à Ásia-Pacífico e associado a infecções invasivas em indivíduos saudáveis da comunidade, distinto da *K. pneumoniae* clássica (cKp), tipicamente oportunista e hospitalar. De particular preocupação é a convergência recente entre os fenótipos hipervirulento e resistente a carbapenêmicos em clones de alto risco, reunindo elevada patogenicidade e reduzidas opções terapêuticas na mesma linhagem (MENDES *et al.*, 2023).

3.1.3.1.3. Relevância Clínica e Epidemiologia das Infecções

No ecossistema das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), *E. coli* e *K. pneumoniae* ocupam posição de destaque entre os agentes mais frequentes, respondendo por parcela substancial das infecções do trato urinário associadas a cateter, bacteremias primárias e secundárias, pneumonias nosocomiais ou associadas à ventilação mecânica, e infecções de sítio cirúrgico. A transmissão ocorre predominantemente de forma exógena no ambiente hospitalar, tendo as mãos dos profissionais de saúde e reservatórios ambientais inanimados como principais vetores, e a suscetibilidade é exacerbada por hospitalização prolongada em UTI, imunossupressão e invasão por dispositivos médicos (GHAZVINI; FARSIANI, 2019; NIMMANA BK, 2026).

Os dois gêneros diferem, contudo, quanto ao peso relativo de cada cenário epidemiológico. *K. pneumoniae* é reconhecida como patógeno oportunista clássico, sendo a disseminação de linhagens produtoras de KPC um dos fatores que mais compromete a eficácia terapêutica em UTIs. Já *E. coli*, embora também relevante no ambiente hospitalar, tem maior impacto na comunidade, funcionando como o principal indicador da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos na população geral (MENDES *et al.*, 2023; NASROLLAHIAN; GRAHAM; HALAJI, 2024).

3.1.3.1.4. Mecanismos Específicos de Resistência

Em *E. coli* e *K. pneumoniae*, o mecanismo predominante é a aquisição plasmidial de ESBL do tipo CTX-M. Em ambos os gêneros, o cenário tem sido agravado pela disseminação da resistência adquirida aos carbapenêmicos, mediada por interações complexas que incluem β -lactamases de classe A (como KPC, codificadas em

plasmídeos), metalo- β -lactamases de classe B (como IMP-6 e NDM) e oxacilinas de classe D (como OXA-48-like) (AURILIO *et al.*, 2022; LIVORSI *et al.*, 2018). Paralelamente, mecanismos não enzimáticos, como a perda de porinas (OmpC/OmpF) ou a superexpressão de bombas de efluxo, reduzem substancialmente a suscetibilidade, permitindo a disseminação global de clones de difícil tratamento, a exemplo do clone pandêmico ST131 de *E. coli*, frequentemente associado à coexistência de múltiplas carbapenemases no mesmo isolado (SARANGI *et al.*, 2021; WHO, 2024).

3.1.3.1.5. Diretrizes Terapêuticas, Prognóstico e Vigilância Ambiental

O manejo de infecções invasivas por estes dois gêneros exige extrema cautela entre a leitura da suscetibilidade *in vitro* e a eficácia *in vivo*. Os carbapenêmicos permanecem, de modo geral, a terapia padrão-ouro para infecções invasivas por produtores de ESBL, demonstrando menores taxas de mortalidade em estudos observacionais (DELGADO-VALVERDE *et al.*, 2013; NIMMANA BK, 2026).

Para isolados produtores de carbapenemases, as opções tornam-se escassas em ambos os gêneros. Antibióticos de resgate, como as polimixinas (colistina), exigem otimização farmacocinética rigorosa devido à toxicidade, enquanto a tigeciclina é desaconselhada em monoterapia para bacteremias. Novas combinações de β -lactâmico e inibidor ceftazidima-avibactam, meropenem-vaborbactam e imipenem-cilastatina-relebactam, além do cefiderocol, devem ser consideradas com base em testes de sensibilidade, mas a diretriz mais recente da *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) recomenda reservá-las preferencialmente para organismos com resistência confirmada a carbapenêmicos, de modo a preservar sua eficácia futura (RIZI; GHAZVINI; FARSIANI, 2019; TAMMA *et al.*, 2024). A complexidade imposta pela multirresistência consolidou a terapia combinada como estratégia preferencial para infecções invasivas, frequentemente associando um carbapenêmico a outro agente ativo, visando reduzir a mortalidade que, em bacteremias graves, pode superar 30 % (DANTAS *et al.*, 2022).

Como discutido anteriormente, a EBE oferece uma alternativa robusta às limitações da vigilância clínica tradicional para os dois gêneros, permitindo detectar precocemente genes de resistência como *blaKPC* e *blaNDM* antes do estabelecimento de surtos nosocomiais. Estudos conduzidos na Finlândia identificaram, em amostras de esgoto comunitário, clones de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase

geneticamente relacionados a linhagens de relevância clínica já circulantes na população, incluindo *E. coli* ST410 portadora de *blaKPC-2* e *K. pneumoniae* ST512 portadora de *blaKPC-3*, reforçando o potencial da vigilância ambiental como sistema de alerta precoce e corroborando propostas de integração da EBE aos sistemas globais de monitoramento, como o GLASS (BALCÁZAR, 2025; HELJANKO *et al.*, 2024).

3.2. Resistência Bacteriana na Perspectiva *One Health*: Mecanismos, Impactos Ecológicos e Estratégias de Vigilância

A introdução dos antimicrobianos representou um marco transformador na medicina moderna. Contudo, a intensa pressão seletiva exercida pela ampla e, frequentemente inadequada utilização, impulsionou a evolução e a rápida disseminação de microrganismos resistentes (DA COSTA; SILVA JUNIOR, 2017). Conforme estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência aos antimicrobianos (RAM) consolida-se quando modificações genéticas neutralizam a eficácia do fármaco. Os desdobramentos clínicos e socioeconômicos dessa dinâmica são severos, englobando a redução drástica das alternativas terapêuticas viáveis, o incremento nas taxas de mortalidade e estimativas de perdas financeiras trilionárias no Produto Interno Bruto (PIB) global até o ano de 2030 (OLIVEIRA *et al.*, 2021; BERTHE; BALI; BATMANIAN, 2022; OECD, 2022).

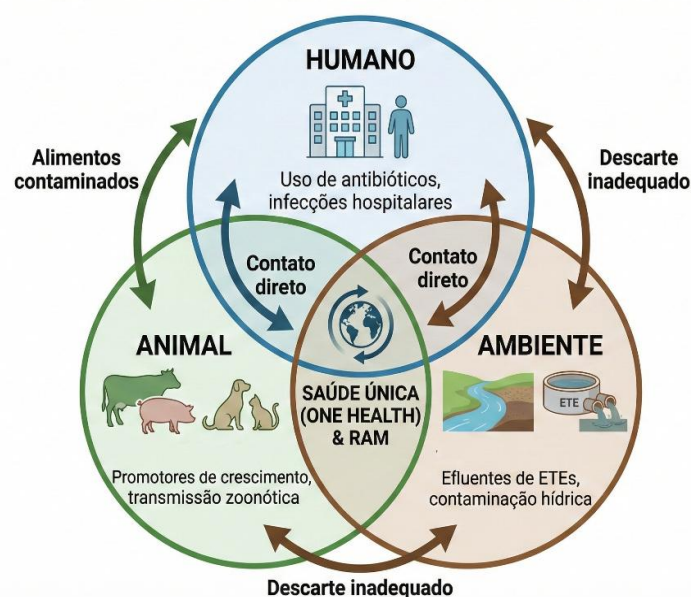
Embora exacerbada pela ação antrópica, a resistência é fundamentada em um processo evolutivo natural e milenar, documentado mesmo na era pré-antibiótica em função da competição microbiana por recursos (DA COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; DARBY *et al.*, 2023). A exposição contemporânea aos fármacos atua como um catalisador, favorecendo a sobrevivência de linhagens portadoras de genes de resistência aos antibióticos (ARGs) (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020). Classicamente, a resistência manifesta-se de forma intrínseca, induzida (mutações) ou adquirida, sendo a Transferência Horizontal de Genes (THG), via transformação, transdução ou conjugação, o principal motor de disseminação de ARGs entre diferentes espécies, frequentemente mediada por elementos móveis como plasmídeos, transposons e integrons de classe 1 (SOUCY; HUANG; GOGARTEN, 2015; PARTRIDGE *et al.*, 2018; DARBY *et al.*, 2023).

Uma vez assimilada a informação genética, a expressão fenotípica da resistência ocorre por meio de mecanismos bioquímicos específicos. Destacam-se a inativação enzimática (como a produção de ESBLs e carbapenemases, a exemplo da KPC em *K. pneumoniae*, que hidrolisam fármacos de última linha); a modificação do sítio alvo (como mutações no gene *mecA* em *S. aureus*); os sistemas de bombas de efluxo; e as barreiras de permeabilidade e formação de biofilmes. A disseminação desses ARGs segue um processo em etapas sucessivas que culmina na conectividade ecológica, ou seja, na transferência física da bactéria para a microbiota humana ou animal (DŽIDIĆ, 2008; PARTRIDGE *et al.*, 2018; RAZAVI *et al.*, 2020).

Como as bactérias e os genes atravessam frequentemente as fronteiras entre espécies e compartimentos ambientais, é fundamental reconhecer as interconexões da RAM sob o conceito de *One Health* (LARSSON; FLACH, 2022). O descarte inadequado de fármacos e a contaminação hídrica reafirmam a RAM como uma questão eminentemente ambiental, extrapolando o ambiente clínico (SILVA, 2019). A dinâmica de transmissão entre as microbiotas humana, animal e ambiental está representada esquematicamente na Figura 2.

Figura 2. A Tríade da Uma Só Saúde e as rotas de disseminação da Resistência Antimicrobiana (RAM).

A Tríade da Saúde Única e a Resistência Antimicrobiana (RAM)



Legenda Figura 2: A Tríade da Uma Só Saúde e as rotas de disseminação da Resistência Antimicrobiana (RAM). O esquema representa a interconexão entre os três domínios do

conceito *One Health* (Humano, Animal e Ambiente) e o eixo central de convergência (Uma Só Saúde & RAM), onde os determinantes de cada domínio se sobrepõem e potencializam a disseminação da resistência antimicrobiana. As setas indicam as principais vias de transmissão entre os domínios: "*Alimentos contaminados*" representa a transferência de micro-organismos resistentes do domínio animal para o humano via cadeia alimentar; "*Contato direto*" indica a exposição por contato físico entre humanos, animais e o ambiente; e "*Descarte inadequado*" representa a via de disseminação por efluentes e resíduos não tratados (humanos e animais) para o ambiente, incluindo corpos hídricos e estações de tratamento de esgoto (ETEs). Fonte: elaborado pelo autor com auxílio da IA – Gemini.

Diante do desafio biológico, da estagnação no desenvolvimento de novos fármacos e das disputas regulatórias entre a necessidade de produção agropecuária e a prevenção em saúde pública, a vigilância sistemática da RAM tornou-se imperativa (SILVA et al., 2020; ALMEIDA et al., 2023). A literatura reforça que o monitoramento clínico isolado é insuficiente (SIMS; KASPRZYK-HORDERN, 2020). Neste cenário, a infraestrutura global montada para o rastreamento do SARS-CoV-2 criou um *tipping point* (ponto de virada) para redirecionar a vigilância de esgoto para o monitoramento da RAM. A integração de dados ambientais em tempo real com registros clínicos preenche as lacunas da vigilância tradicional, permitindo identificar *hotspots* de evolução bacteriana de forma ágil e robusta (PRUDEN et al., 2021).

3.2.1. Vigilância, Governança e Estratégias de Controle

Organismos multilaterais enfatizam a urgência de vigilância contínua (WHO, 2021). A OMS estabeleceu o Plano de Ação Global e o sistema GLASS para reforçar a base de dados mundial. No Brasil, essas diretrizes são operacionalizadas através do PAN-BR (Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Uma Só Saúde) e do PAN-BR Agro (Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária). Entretanto, pesquisas da tríade OMS/FAO/WOAH (Organização Mundial da Saúde/Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura/Organização Mundial de Saúde Animal) indicam um desequilíbrio, com

ações concentradas na saúde humana e negligência nos setores animal e ambiental (BRASIL, 2018; SIMS; KASPRZYK-HORDERN, 2020).

A vigilância epidemiológica constitui um pilar basilar para a proteção da saúde pública global ao operar mediante sistemas integrados dedicados ao rastreamento de patógenos de notificação compulsória. Exemplificam essa dinâmica o controle da *Legionella* nos Estados Unidos, União Europeia e Austrália e a vigilância ativa do vírus Ebola em nações como República Democrática do Congo, Guiné e Uganda. Esse monitoramento africano atua em constante sinergia com as redes de alerta da própria União Europeia e do CDC estadunidense. No escopo da resistência aos antimicrobianos (RAM), os esforços históricos concentram-se nos setores clínico e agroalimentar. Tais iniciativas priorizam sistematicamente a análise de indicadores fecais e de bactérias do grupo ESKAPE. Programas notórios englobam o Sistema Nacional de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana (NARMS) nos Estados Unidos e a recém-implementada rede europeia EARS-vet. O NARMS atua comparando isolados entéricos da cadeia de alimentos com cepas clínicas ao passo que a plataforma EARS-vet (Rede Europeia de Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos em Medicina Veterinária) investiga a transmissão de resistência entre animais e humanos por vias não alimentares. Contudo, persiste uma lacuna estrutural expressiva quanto à implementação de um monitoramento ambiental equivalente e capaz de materializar integralmente a abordagem *One Health* (PRUDEN et al., 2021).

Para orientar a prescrição racional na medicina veterinária, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE/WOAH) estabeleceu uma classificação rigorosa dos antimicrobianos, dividindo-os em três categorias: Agentes Antimicrobianos Veterinários Criticamente Importantes (VCIAs), Altamente Importantes (VHIAs) e Importantes (VIAs). Os VCIAs, que incluem as fluoroquinolonas e cefalosporinas de terceira e quarta geração, são fundamentais para o tratamento de infecções graves e devem ser utilizados apenas como último recurso, após confirmação por antibiograma, sendo estritamente proibido o seu uso como promotores de crescimento devido ao alto risco de indução de resistência cruzada com a medicina humana (GOMES et al., 2024).

Para além da vigilância, a mitigação da RAM na produção animal exige práticas de manejo como o sistema *all-in all-out*, que reduz a carga microbiana ambiental pela desinfecção completa entre lotes, e o uso de alternativas terapêuticas e preventivas, como probióticos e seleção genética de linhagens mais resistentes a infecções (LOPES, 2022).

No ambiente clínico veterinário, contudo, essa gestão enfrenta desafios estruturais: diferentemente da medicina humana, onde Comissões de Controle de Infecção Hospitalar padronizam protocolos, muitos hospitais e clínicas veterinárias ainda carecem de regulamentação formal para o controle de infecções nosocomiais, favorecendo a disseminação de patógenos multirresistentes em ambientes de cuidados intensivos animais (GOMES *et al.*, 2024).

A crise da resistência é agravada por uma lógica de mercado que desestimula a inovação farmacêutica. O desenvolvimento de novos antibióticos apresenta um retorno financeiro desfavorável para a indústria quando comparado a medicamentos de uso crônico: o tratamento de infecções bacterianas é geralmente de curta duração (sete a dez dias) e as novas moléculas, quando aprovadas, são frequentemente mantidas como 'reservas estratégicas' para bactérias multirresistentes, limitando o volume de vendas. Este cenário econômico resultou num hiato na descoberta de novas classes de antimicrobianos desde a década de 1960, deixando os sistemas de saúde vulneráveis à evolução bacteriana (LIMA *et al.*, 2017).

3.2.2. Escolha dos Bioindicadores na Vigilância Ambiental

A seleção de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* como alvos biológicos primários para a vigilância ambiental neste estudo constitui uma decisão estratégica, alicerçada tanto nas diretrizes internacionais de monitoramento quanto na necessidade de integrar dados ambientais às políticas de saúde pública. Esta escolha fundamenta-se na convergência de três pilares críticos, a relevância clínica, o papel de sentinela genética e a persistência ambiental no contexto *One Health*, avaliados de forma complementar entre os dois patógenos, e não isoladamente em um único organismo (CONFORTI *et al.*, 2025; PRUDEN *et al.*, 2021).

A importância deste painel é inquestionável diante da inclusão de ambos os gêneros no acrônimo ESKAPE(E), reforçada pela classificação da OMS na *Bacterial Priority Pathogens List* de 2024. Cada organismo, contudo, contribui com uma dimensão distinta ao conjunto. *K. pneumoniae* representa o patógeno oportunista clássico de maior peso em unidades de terapia intensiva, com disseminação preocupante de linhagens produtoras de KPC. *E. coli*, por sua ubiquidade na microbiota intestinal humana e animal, funciona como o principal indicador da pressão seletiva exercida pelo uso comunitário de antimicrobianos, ampliando a representatividade populacional da amostragem. Monitorar

simultaneamente os dois gêneros representa, portanto, uma medida mais abrangente de vigilância sobre a ameaça atual à saúde pública do que a observação isolada de qualquer um deles (VIANA-CARDENAS et al., 2026).

Para além do impacto clínico individual, os dois microrganismos desempenham um papel ecológico como sentinelas da resistência antimicrobiana. Sua notável plasticidade genética, expressa na aquisição plasmidial de ESBL e carbapenemases compartilhada por ambos os gêneros, permite que atuem como reservatórios ambientais, capazes de captar e disseminar horizontalmente elementos genéticos móveis. Consequentemente, a detecção destes dois gêneros multirresistentes nas águas residuais transcende a identificação do patógeno por si, servindo como um alerta precoce e multifacetado para a circulação comunitária de determinantes genéticos de resistência (NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, 2024).

Metodologicamente, o painel formado pelos dois gêneros revelou-se um conjunto de bioindicadores para a análise comparativa entre diferentes matrizes de esgoto. Por serem comensais ubíquos do trato gastrointestinal humano e altamente responsivos à pressão seletiva, a variação em seus perfis de suscetibilidade reflete, em conjunto, a intensidade do uso de antimicrobianos em cada cenário com maior sensibilidade do que um único organismo isoladamente permitiria. Estudos recentes reforçam que a vigilância baseada em esgoto deve priorizar múltiplos alvos que permitam essa integração de dados para informar políticas de *One Health* (DAVIN-REGLI; LAVIGNE; PAGÈS, 2019; HOCK et al., 2026).

3.2.3. Determinantes Ecológicos e Dinâmica de Disseminação da Resistência

Antimicrobiana

Na produção animal, a administração de antimicrobianos para profilaxia, metafilaxia e como promotores de crescimento catalisa a emergência de cepas resistentes. No Brasil, esse quadro é agravado pela fragmentação de dados entre as etapas da cadeia agroindustrial, fator que dificulta o rastreamento da transmissão de patógenos (DA COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; BRASIL, 2018). Esse padrão de consumo evidencia uma expressiva assimetria regulatória em escala global. Enquanto a União Europeia banuiu a utilização de promotores de crescimento antimicrobianos desde 2006, nações agroexportadoras como o Brasil ainda permitem a prática. Tal discrepância motivou o Grupo de Coordenação Interinstitucional da Organização das Nações Unidas (ONU) a

recomendar a eliminação progressiva dos antibióticos considerados criticamente importantes para a saúde humana (SILVA *et al.*, 2020). Em paralelo, a metafilaxia, que consiste no tratamento profilático simultâneo de animais clinicamente afetados e contactantes sob risco de surto, demonstra eficácia no controle de enfermidades respiratórias em confinamentos. Contudo, sua aplicação contínua em subdoses intensifica a pressão seletiva para a resistência e apresenta o risco inerente de mascarar falhas estruturais de biossegurança (LOPES, 2022).

A cadeia de alimentos atua como vetor direto de disseminação zoonótica: há correlação entre o uso de fluoroquinolonas na avicultura e o aumento de *Campylobacter* spp. resistentes em isolados humanos, e cepas de *Salmonella* spp. resistentes podem persistir mesmo após sanitização e refrigeração industrial, transferindo determinantes de resistência pela ingestão (SILVA, 2019). Animais de companhia também são reservatórios relevantes, dada a proximidade com os tutores: microrganismos como MRSA, *E. coli* produtora de ESBL e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE) circulam nesse cenário, e a hospitalização veterinária prolongada aumenta o risco de infecções nosocomiais multirresistentes, reforçando a necessidade de protocolos de biossegurança compatíveis aos da medicina humana (GOMES *et al.*, 2024; LOPES, 2022).

Como reservatório ambiental, água e solo favorecem a troca de genes de resistência entre bactérias ambientais e aquelas adaptadas ao trato intestinal, processo intensificado pela disseminação global de material fecal, que já contaminou por ARGs praticamente todo o planeta, incluindo sistemas de água doce e regiões árticas (GILLINGS; PAULSEN; TETU, 2017; KARKMAN; PÄRNÄNEN; LARSSON, 2019). A maioria dos ARGs de origem recente está associada a espécies ligadas a infecções humanas e animais, reforçando a hipótese de que esses hospedeiros são os principais ambientes de evolução da resistência sob pressão seletiva (EBMEYER; KRISTIANSSEN; LARSSON, 2021), sendo a detecção precoce de ARGs emergentes em patógenos do grupo ESKAPE especialmente crítica (CHE *et al.*, 2019; SOMMER, MUNCK, 2017).

Os efluentes urbanos e as ETEs constituem elos centrais entre o ambiente e a disseminação da resistência. Antibióticos chegam às ETEs por excreções humanas e animais, descarte incorreto e efluentes farmacêuticos, e os biofilmes bacterianos formados nesses ambientes, sobretudo na interface ar-líquido, funcionam como *hotspots* de transferência de ARGs mediada por plasmídeos (HUIJBERS; LARSSON; FLACH,

2020; TRAN; REINHARD; GIN, 2018). A eficácia de remoção varia conforme a tecnologia empregada: processos de membrana costumam superar tratamentos convencionais (HILLER *et al.*, 2019); tratamentos químicos de oxidação avançada podem retardar a transferência gênica, embora doses elevadas de cloro gerem subprodutos tóxicos ou selecionem estirpes tolerantes; e a digestão anaeróbia termofílica (50–60 °C) reduz significativamente ARGs de tetraciclina. Ainda assim, parte considerável dos ARGs permanece nos efluentes tratados e retorna ao ambiente, podendo ser adquirida por novas bactérias a jusante em eventos de conjugação (NGUYEN *et al.*, 2021).

O monitoramento de águas residuais brutas mostra-se particularmente promissor: por agrupar bactérias fecais de grandes populações, permite análises de tendência de resistência de forma custo-efetiva e com menor dilema ético, abordagem já validada na vigilância de poliovírus e do SARS-CoV-2 e com potencial de alerta precoce para ARGs emergentes, inclusive permitindo prever padrões regionais de resistência a partir da microbiota ambiental. A ausência de padronização de alvos de monitoramento, no entanto, ainda dificulta a avaliação quantitativa de riscos nesse tipo de vigilância (AGRAWAL; ORSCHLER; LACKNER, 2021; HENDRIKSEN *et al.*, 2019; HUIJBERS; LARSSON; FLACH, 2020; MEDEMA *et al.*, 2020).

**CAPÍTULO 2- (ARTIGO) VIGILÂNCIA DA COVID-19 EM ÁGUAS RESIDUAIS EM UMA
PERSPECTIVA PÓS-PANDÊMICA**

Artigo submetido no periódico Environment & Health

COVID-19 surveillance in wastewater in a post-pandemic perspective

José Eduardo Machado Barroso a*, Ana Beatriz Garcez Buiatte a, Carlyne Ferreira Dumont a, Letícia Roberta Martins Costa a, Roberta Torres de Melo a*, Livia de Moraes Bomediano Camillo b, Rodrigo de Freitas Bueno b, Richard Costa Polveiro a, Aline Diniz Cabral c, Pedro Moura Álvares a, Dayanne Maria da Silva Coimbra a, Larissa Silva Soares a, Daise Aparecida Rossi a

a Laboratory of Molecular Epidemiology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, 38402-018, Minas Gerais, Brazil.

b Center for Engineering, Modeling and Applied Social Sciences, Federal University of ABC, Santo André, 09210-580, São Paulo, Brazil.

c Department of Pathological Sciences, Faculty of Medical Sciences, Santa Casa de São Paulo, 01221-020, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author

E-mail address: jose.barroso@ufu.br

ABSTRACT:

The spread of SARS-CoV-2 was one of the greatest global public health challenges, and wastewater-based epidemiology (WBE) became widely used as a complementary surveillance strategy. However, studies comparing WBE performance during pandemic and post-pandemic periods remain limited. This study monitored SARS-CoV-2 circulation in wastewater from four treatment plants in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, during the pandemic (November 2022–April 2023) and post-pandemic (May 2023–November 2023) periods. Overall positivity was 36/99 (36.36 %), with no significant differences among plants or months. At the main plant, viral loads did not differ between periods, but their association with reported cases weakened after the pandemic declaration, likely reflecting reduced testing and underreporting. In contrast, viral loads remained significantly correlated with deaths in both periods, suggesting mortality as a more stable epidemiological correlate post-pandemic. Genomic analysis assigned most consensus sequences to lineage B, with additional detection of B.1.1 and B.1.1.529, the parental Omicron lineage. Pairwise and phylogenetic analyses showed high genomic similarity, with limited divergence in a subset of samples, and placed wastewater sequences within the regional diversity of human SARS-CoV-2 genomes from Minas

Gerais. These findings reinforce WBE as a valuable complementary tool for monitoring viral circulation, lineage diversity and public health decision-making when clinical surveillance is reduced.

Keywords: SARS-CoV-2; wastewater-based epidemiology; effluents; phylogenetics; pandemic; Brazil

1. Introduction

At the end of 2019, a zoonotic species of Coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the etiological agent of acute respiratory syndrome, was identified in Wuhan, China, in a series of patients with pneumonia [1]. The rapid spread of the virus resulted in the greatest global public health challenge since the Spanish influenza pandemic of 1918 [2]. The initial outbreak spread rapidly and caused thousands of deaths, leading the World Health Organization (WHO) to declare COVID-19 a pandemic on March 12, 2020. Since then, more than 760 million people have been infected worldwide, with approximately seven million deaths, of which more than 700,000 occurred in Brazil [3].

The pandemic state and the danger of emerging pathogens have led researchers and health authorities to seek effective, lower-cost surveillance methods. In this context, Wastewater-Based Epidemiology (WBE) has been recognized as a valuable approach for monitoring communities, with a history of effectiveness in the surveillance of hepatitis E in the United Kingdom [4], hepatitis A in Sweden [5], and poliomyelitis in Israel [6]. WBE for COVID-19 has been adopted by 50 countries, either institutionally or by researchers [7]. Furthermore, the sequencing of genomes from wastewater has proved to be an excellent tool for identifying the emergence of new strains such as B.1.234 [8].

WBE studies have shown that SARS-CoV-2 positivity and viral loads in wastewater can reflect local viral circulation, since the virus may be excreted in feces and urine by symptomatic, oligosymptomatic and asymptomatic infected individuals. In several settings, increases in SARS-CoV-2 RNA in wastewater have preceded rises in reported clinical cases by one to three weeks, supporting its use as an early-warning surveillance tool. However, interpretation of wastewater data is influenced by factors such as variation in viral shedding over the course of infection, differences in fecal and respiratory contributions to sewage, RNA degradation in complex wastewater matrices, and the lack of fully harmonized protocols for sampling, concentration and molecular analysis. Even

with these limitations, WBE provides a population-level signal that is not restricted to clinically tested individuals and can therefore complement conventional epidemiological surveillance, particularly when asymptomatic infections or underreporting reduce the representativeness of official case data [8-10].

WBE has been included as a national strategy for monitoring the spread of SARS-CoV-2 in several countries, including Finland, Hungary, Luxembourg, the Netherlands, Spain, and Turkey, among others. Other countries such as the United States, Canada, Australia, France, Switzerland, and the United Kingdom have also adopted WBE, albeit primarily for large-scale regional monitoring programs. In Brazil, independent research has demonstrated the importance and suitability of WBE for monitoring SARS-CoV-2 [9-13].

Despite the WHO declaring the end of the pandemic on May 5, 2023, and the reduction in cases due to preventive measures such as vaccination, sporadic outbreaks still occur, with epidemiological data pointing to a transition to COVID-19 endemicity. Between the end of the pandemic declaration and December 7, 2024, 1,538,888 cases and 12,545 deaths from COVID-19 have been reported in Brazil [14]. This data reinforces the need for continued monitoring, especially to guide vaccine boosters and to detect the presence of new variants, which allows for the adoption of preventive measures, including updating vaccines [15].

Our aim was to monitor SARS-CoV-2 using WBE in pandemic and post-pandemic periods, quantifying viral loads, identifying circulating variants, relating the results to official epidemiological records, and verifying their predictive value for cases and deaths in different epidemiological situations.

2. Materials and methods

2.1 Collection and sampling sites

The collections took place in the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, at the four wastewater treatment plants (WWTPs – Estações de Tratamento de Esgoto): Uberabinha (18.88° S, 48.3285239° W), Aclimação (18.8752995° S, 48.2362601° W), Ipanema (18.8616817° S, 48.2134606° W), and Vila Marielza (18.910017° S, 48.1987518° W) (Fig. 1). The Uberabinha WWTP is the main plant in the municipality and is responsible for treating 95% of the sewage collected in the city, serving approximately 806,400

inhabitants [18]. At these four WWTPs, 500mL of grab samples of raw sewage were collected in 34 epidemiological weeks, between November 2022 and November 2023, comprising the pandemic and post-pandemic periods, to determine the viral load and variants of SARS-CoV-2. The time of collection was standardized, the flow rate recorded to calculate the number of viral particles, and the samples transported to the laboratory under refrigeration [16]. The determination of epidemiological weeks followed the equivalence established in the Brazilian epidemiological calendar of the Notifiable Diseases Information System (SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação) [17].

The collections took place in the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, at the four wastewater treatment plants (WWTPs – Estações de Tratamento de Esgoto): Uberabinha (18.88° S, 48.3285239° W), Aclimação (18.8752995° S, 48.2362601° W), Ipanema (18.8616817° S, 48.2134606° W), and Vila Marielza (18.910017° S, 48.1987518° W) (Fig. 1). The Uberabinha WWTP is the main plant in the municipality and is responsible for treating 95 % of the sewage collected in the city, serving approximately 806,400 inhabitants [18].

Uberlândia is a Brazilian city located in the western portion of the state of Minas Gerais, in the Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba region, which has several characteristics that make it a significant location for research into SARS-CoV-2 in wastewater. It is a medium-sized city, with a population of approximately 900,000 inhabitants, a population density of 173.31 inhabitants per km², and more than 96 % of the population living in urban areas. The city has an efficient sewage collection and treatment system, which facilitates the analysis of wastewater in treatment plants, since 100 % of the city's urban area is covered by sewage collection and treatment [18, 19].

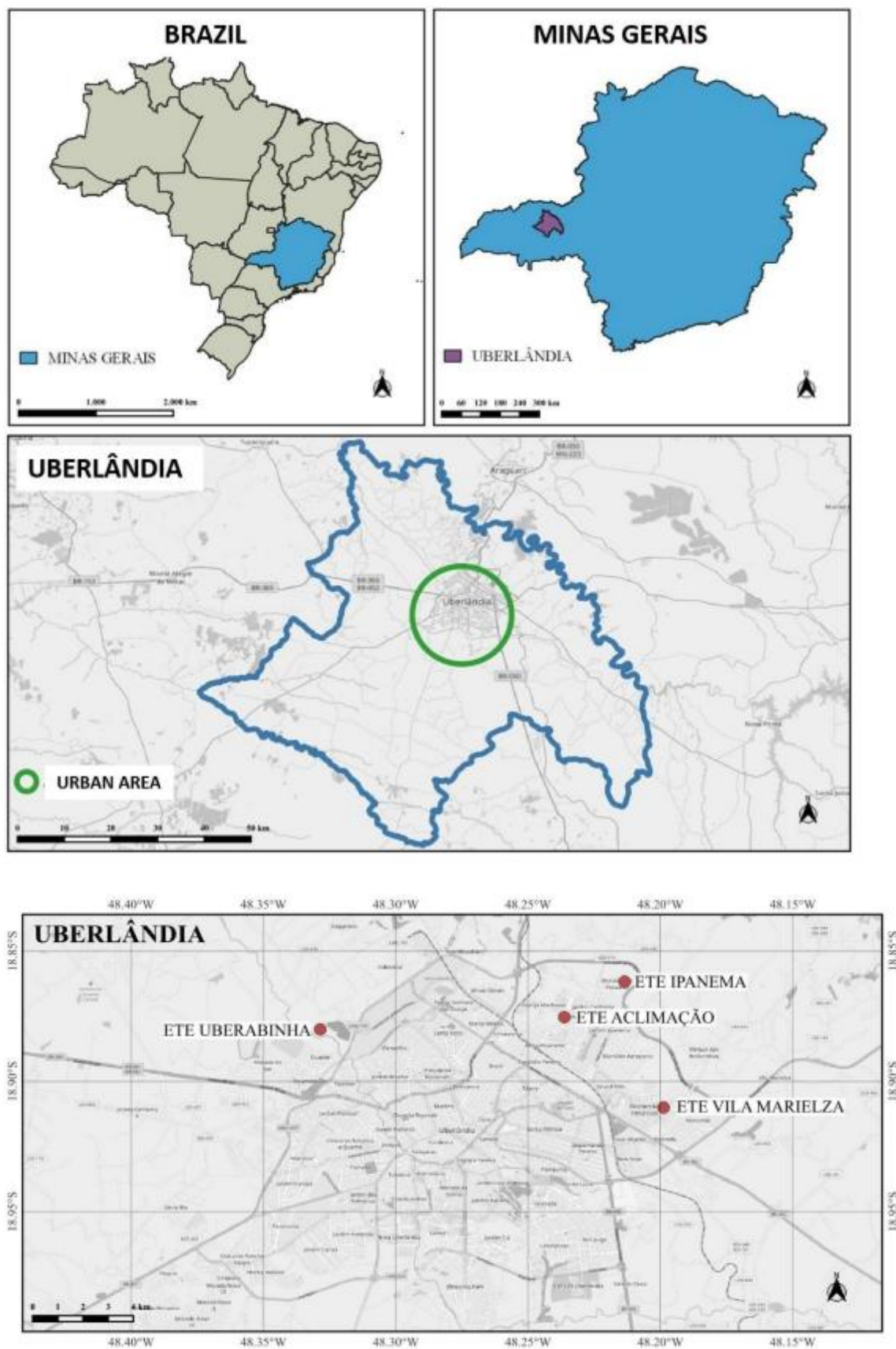


Fig. 1 - Map of the sampling sites in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil [19, 20].

2.2 Concentration of viral particles, extraction, purification and quantification of RNA

Immediately upon arrival at the laboratory, the samples were homogenized and a 40 mL aliquot precipitated in 4.0g of polyethylene glycol (PEG 8000, 8 % w/v, Sigma) and 0.9g of sodium chloride (Merck), followed by centrifugation (60min/12,000xg/4°C) to concentrate the genetic material [23]. To the pellet formed, 1mL of acid phenol (Merck) and 0.4mL of phosphate buffered saline (PBS pH 7.2) were added, followed by vigorous homogenization and centrifugation (12,000xg/10min) in a 2.0mL microtube [21]. For the extraction and purification of SARS-CoV-2 RNA, the aqueous phase was subjected to solid phase extraction using the PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. As a limitation of this study, viral recovery controls were not assessed during the concentration process, which should be considered when interpreting absolute loads.

Quantification of SARS-CoV-2 RNA was carried out by reverse transcription followed by real-time PCR using the 2019-nCoV TaqMan kit (Norgen®, cat. TM67120) on a 7500 Fast Real-Time PCR System thermocycler, according to protocols developed by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). The N1 and N2 gene targets were analyzed simultaneously in a single multiplex reaction, and a sample was considered positive when at least one target was detected at $C_t < 40$. To construct the analytical curve, serial dilutions ranging from 1.0 to 1.0×10^5 copies μL^{-1} were prepared from a dsDNA fragment supplied by the kit manufacturer (Norgen®, cat. TM67120), containing both targets at known concentration. Efficiency and R^2 values for standard curves were within accepted quality thresholds ($>90\%$ and >0.98 , respectively), and duplicate reactions were carried out for each standard concentration. The amplification program consisted of one cycle of 45°C for 15 minutes for reverse transcription, one cycle of 95°C for 2 minutes for initial denaturation, 50 cycles of 95°C for 3 seconds and 55°C for 30 seconds. While 50 cycles were executed to capture low concentrations, a strict $C_t < 40$ cutoff was applied to define positive samples and avoid false positives [22, 23]. Quantification in viral copies for each sample was carried out using the equation of the line provided by the analytical curve and converted to number of RNA copies per liter (C_{RNA}). SARS-CoV-2 viral loads were converted to genomic copies per day by multiplying the RNA concentration in wastewater (copies/L) by the daily influent flow recorded at each WWTP at the time of sampling (L/day). As continuous flow data were not available, the calculation was based

on a single flow-rate measurement for each sampling event, which should be considered when interpreting absolute viral load estimates.

Raw wastewater samples, containing potentially infectious SARS-CoV-2 RNA and other pathogens, were processed in strict accordance with standard biosafety precautions. This protocol necessitated the use of appropriate personal protective equipment (PPE), biological safety cabinets for all sample manipulations, and rigorous decontamination procedures for biological waste disposal.

This study analyzed community-level wastewater samples and did not involve the collection of biological material from individual human or animal subjects; therefore, approval by a research ethics committee was not required.

2.3 Whole Genome Sequencing

Samples with Ct values <30 were selected for sequencing using the Midnight RT Expansion kit on a nanopore sequencing device (MinION) from Oxford Nanopore Technologies (ONT). The bioinformatics pipeline included a quality analysis, where the reads were filtered based on a Phred Score > 10. The Nanoplot and Porechop tools were used for quality analysis and removal of adapters, alongside trimming criteria to ensure high-quality reads [24].

Consensus sequences were generated using Medaka software and aligned with the SARS-CoV-2 reference sequence to identify variants. Consensus calling followed strict rules (minimum 30x coverage) and identified dominant variants, though complex wastewater matrices may contain multiple sub-variants not fully captured by bulk sequencing. The lineages of the SARS-CoV-2 consensus genome sequences were assigned according to the Pango nomenclature system [55] using Pangolin v4.4 (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages) [25, 26, 27]. Pangolin was run on the wastewater-derived consensus FASTA files using the installed Pango designation version PANGO-v1.38, with Scorpio v0.3.19 and Constellation v0.1.12, as reported in the Pangolin output. These assignments were used for the lineage classification presented in Table 1 and were compared with complementary Nextclade classifications and quality-control metrics [65].

2.4 Genome quality assessment

Consensus-genome quality of wastewater-derived SARS-CoV-2 sequences was assessed using Nextclade v3.21.2 [65]. FASTA headers were standardized according to sample

identifiers before analysis with the SARS-CoV-2 reference dataset. The evaluated metrics included overall QC status, QC score, clade assignment, Nextclade-assigned Pango lineage, genome coverage/completeness, missing bases, non-ACGTN characters, substitutions, deletions, insertions, frameshifts and stop codons. These metrics were used as consensus-level quality indicators and as complementary information for downstream phylogenetic analyses.

2.5 Alignment and construction of phylogenies

R-based analyses were performed using R version 4.6.0 (R Core Team, 2026) in RStudio. Phylogenetic trees and associated metadata were annotated and visualized using iTOL [33].

2.5.1 Construction of SARS-CoV-2 phylogenies in sewage samples from Uberlândia

Two distinct phylogenetic analyses were performed. First, for the wastewater-only dataset, the 15 SARS-CoV-2 consensus sequences obtained from wastewater treatment plants in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, and the reference genome NC_045512.2/Wuhan-Hu-1 were aligned with MAFFT v7.526 [28] using the --auto parameter. No post-alignment trimming was applied to this dataset, in order to preserve the full-genome alignment and avoid loss of informative sites in a low-divergence dataset. Phylogenetic inference was performed using IQ-TREE v3.1.2 [66]. The ModelFinder Plus (MFP) tool was used to test nucleotide substitution models and select the model best suited to the data [31]. The TPM3u+F model was selected and applied in the final phylogenetic reconstruction. Branch support was assessed using 10,000 ultrafast bootstrap replicates with the -bnni option and 10,000 SH-aLRT replicates. The SARS-CoV-2 reference genome NC_045512.2/Wuhan-Hu-1 was included as an outgroup.

Second, for the broader contextual phylogenetic analysis, which included wastewater-derived sequences and a larger set of human SARS-CoV-2 genomes, sequences were aligned with MAFFT v7.526 [28] and trimmed with ClipKIT [29] using the Smart-gap function to remove poorly aligned or gap-rich sites. This trimming step was restricted to the contextual dataset and was not applied to the wastewater-only dataset. The resulting tree was used to evaluate the placement of wastewater-derived sequences within the broader SARS-CoV-2 genomic background.

2.5.2 Pairwise nucleotide-difference analysis of the wastewater-only dataset

Consensus-level genetic divergence among wastewater-derived SARS-CoV-2 sequences was quantified using a pairwise nucleotide-difference matrix generated from the same full-genome multiple sequence alignment used for IQ-TREE phylogenetic inference [30]. Analyses were performed in R using ape [34] and tidyverse-associated packages for data handling, matrix organization and file formatting [67].

Aligned FASTA sequences and the IQ-TREE maximum-likelihood phylogeny were imported into R. For each pair of sequences, nucleotide differences were counted across comparable alignment positions, considering only valid nucleotide characters (A, C, G and T). Positions containing gaps, ambiguous bases or missing characters in either sequence were excluded from the corresponding pairwise comparison. This approach generated direct counts of nucleotide differences between consensus genomes, rather than model-based evolutionary distances.

The pairwise nucleotide-difference matrix was ordered according to the tip order of the IQ-TREE phylogeny and exported as an iTOL-compatible heatmap dataset for combined tree visualization in iTOL [33]. Pangolin lineage assignments and Nextclade mutation-related outputs were added as program-derived annotation layers. Branch support values below 70 % were omitted from the displayed tree to improve readability.

2.5.3 Construction and visualization of the phylogenetic tree of SARS-CoV-2 sequences from Minas Gerais larger dataset

A total of 2,104 SARS-CoV-2 genome sequences from human cases were obtained from the GISAID database [57] using the following criteria: Minas Gerais, Brazil; collection between November 2022 and December 2023; human host; and high genomic coverage. These sequences were analyzed together with the 15 wastewater-derived consensus sequences from wastewater treatment plants in Uberlândia and the reference genome NC_045512.2/Wuhan-Hu-1.

Multiple sequence alignment was performed with MAFFT v7.526 [28] using the --auto parameter. For the larger contextual dataset, the alignment was trimmed with ClipKIT [29] in Smart-gap mode to remove poorly aligned or gap-rich sites and reduce alignment noise. This trimming step was applied only to the larger contextual dataset, not to the wastewater-only dataset.

The evolutionary model was evaluated using IQ-TREE v3.1.2 and ModelFinder Plus (MFP) [31, 66]. The GTR+Gamma model was selected based on the Akaike information criterion (AIC) and used for subsequent analyses. The phylogenetic tree was built with VeryFastTree v4.0.4 [64] under the GTR+Gamma model, using subtree pruning and regrafting optimization (-spr 30), nucleotide mode (-nt), multithreaded execution, and double-precision calculations.

Because the full tree contained a large number of tips, a reduced contextual subset was generated in R using ape [34] and tidyverse-associated packages to improve figure readability. All wastewater-derived sequences were retained. Human sequences were selected based on two complementary criteria: phylogenetic proximity to wastewater-derived sequences, using cophenetic distances from the full tree, and temporal-lineage representation, with up to four human background sequences retained per month-lineage group. The reference sequence was retained when present. The final subset was extracted from the full tree using `ape::keep.tip`.

Before visualization, metadata were curated and standardized in R to ensure consistency between sequence names, collection dates, lineage annotations, sample source and tree tip labels. Wastewater collection dates were checked using dates encoded in sequence names, and SARS-CoV-2 lineages were grouped into broader categories, including B, B.1.1, B.1.1.529, BA.5-related, BA.5*, BQ.1*, XBB*, and other low-frequency or recombinant groups. The reduced contextual tree and iTOL-compatible annotation files were generated to display tree context, sample source, collection year, lineage group, and highlighted wastewater samples. This reduced tree was used only for visualization and contextual interpretation of wastewater-derived sequences within the broader SARS-CoV-2 genomic background.

2.6 Statistical Analysis

Differences in SARS-CoV-2 viral loads were evaluated among wastewater treatment plants and collection months. For the Uberabinha WWTP, viral loads, reported COVID-19 cases and reported deaths were compared between the pandemic and post-pandemic periods. Viral loads were $\log_{10}$ -transformed before statistical analysis, and data distribution was assessed for normality. When normality assumptions were met, comparisons were performed using one-way ANOVA or Student's t-test. When assumptions were not met, Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests were used. Spearman

rank correlation was applied to assess the association between wastewater viral loads and epidemiological variables, including reported cases and deaths, considering the full study period and each period separately. A 95 % confidence level was adopted for all analyses. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.1 [63].

3. Results and discussion

During the pandemic period, WBE has been used extensively by several countries and researchers as a predictive and early warning tool for the emergency in the increase in the number of cases and epidemic outbreaks of COVID-19. The results of different studies have demonstrated the predictive value of the tool in communities, usually with an increase in viral concentration one or two weeks before outbreaks, allowing alerts to the health system and other preventive measures in specific communities [7, 10, 39, 40]. However, it is not yet known whether, in endemic periods, Wastewater-Based Epidemiology (WBE) retains its predictive value for new cases, even though it remains a valuable tool for the early identification of the circulation of new variants and making it possible to correlate these variants with more serious clinical conditions or with the need to update vaccine production.

3.1 Quantification of SARS-CoV-2

Viral load quantification was carried out on 99 sewage samples collected from the city's four treatment plants between November 2022 and November 2023, six months during the pandemic and six months post-pandemic, in 34 different epidemiological weeks.

Samples that presented $Ct < 40$ were considered positive [22]. The overall positivity was 36/99 (36.36 %) for SARS-CoV-2, with no significant difference between WWTPs ($p=0.1098$) or months ($p=0.1014$) by the Kruskal-Wallis test (Fig.2). The average viral RNA load ($\log_{10}$ genomic copies/day $\pm$ SD) among positive samples was 10.05 ± 0.40 at Marielza, 13.90 ± 1.33 at Ipanema, 14.16 ± 1.67 at Aclimação, and 15.53 ± 1.58 at Uberabinha WWTP.

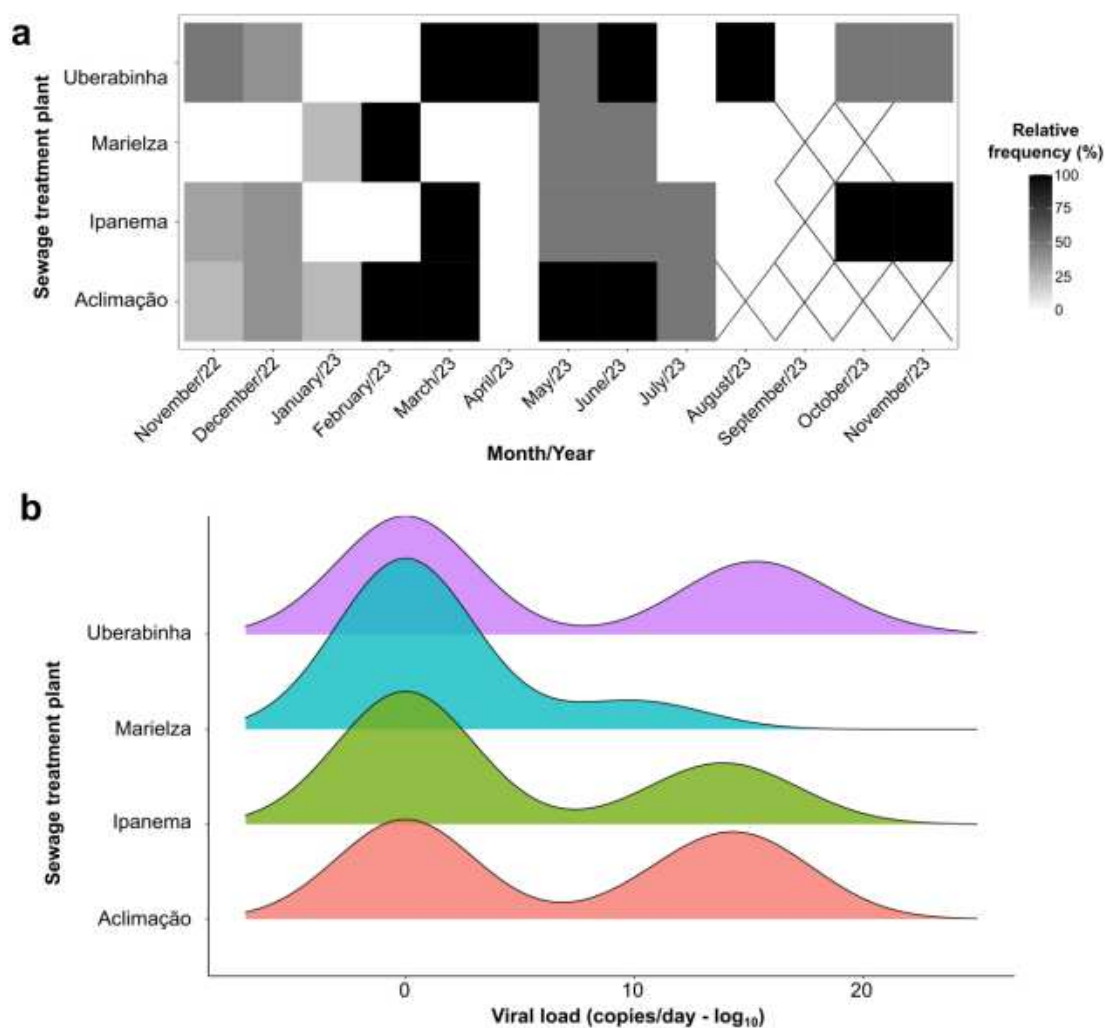


Fig.2 - Frequency of positive collections and quantification of SARS-CoV-2 in four wastewater treatment plants (WWTP) in Uberlândia, MG. (a) Relative frequency of positive collections for SARS-CoV-2 according to the month of collection ($p=0.1014$ -Kruskal- Wallis). Months marked with an X represent months in which there was no collection for that specific treatment station. (b) Variation in viral load at each treatment station during all collections ($p=0.1098$ - Kruskal-Wallis). Viral count results were transformed into log₁₀ scale.

A significant difference in viral loads was observed among WWTPs ($p=0.0007$, one-way ANOVA), driven primarily by the absence of a second wave at the Marielza WWTP and differences in the timing of waves across sites. This finding reflects local epidemiological dynamics rather than being solely attributable to population size served by each plant. Studies show that the reliability of the results will be greater in WWTPs serving large population areas than in smaller areas [41].

Comparisons between viral load and epidemiological data in the pre- and post-pandemic periods were focused on Uberabinha WWTP, the main plant responsible for treating approximately 95 % of the city's collected sewage (Fig. 3). Two main arguments justified the analysis of only the most representative WWTP, which were: i) the lack of epidemiological data on cases and deaths differentiated for the representative population for the different WWTPs; and ii) the danger of bias in the analysis of the predictive value considering the low representativeness of the other WWTPs in relation to the total population reported in the official epidemiological data [18].

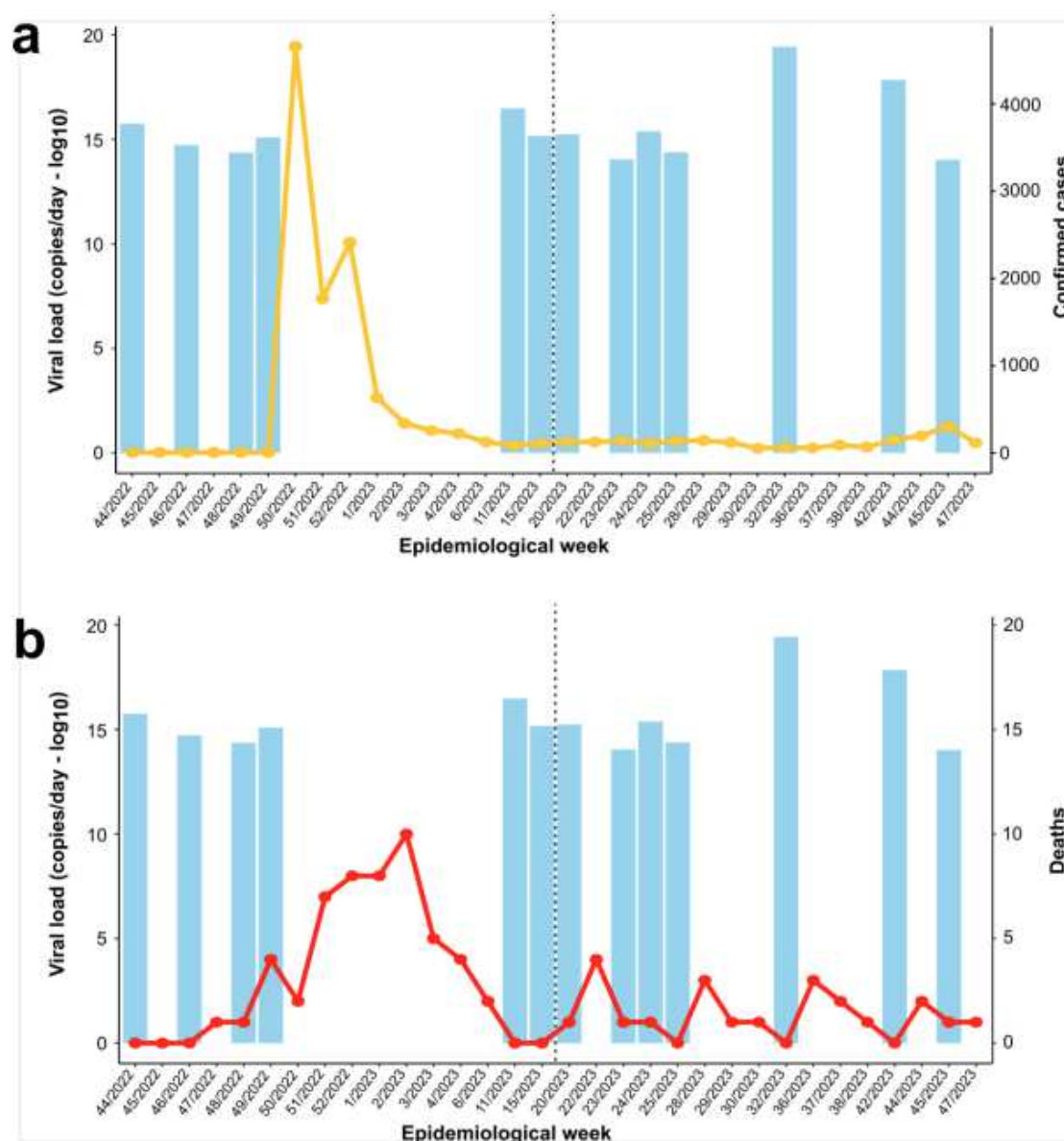


Fig. 3 - Relationship between SARS-CoV-2 viral load quantified in wastewater samples (WWTP Uberabinha) in the city of Uberlândia, MG, Brazil, and cases and deaths per epidemiological week. The yellow line (a) represents the number of cases, and the red line (b), the number of deaths. The dotted line divides the epidemiological weeks into the pandemic period (week 44/2022 to 15/2023) and the post-pandemic period (20/2023 to 47/2023).

At the Uberabinha WWTP, 32 samples were collected, with a positivity rate of 41 %. The average viral loads at the Uberabinha WWTP were $15.26 \pm 0.76 \log_{10}$ genomic copies/day in the pandemic period and $15.76 \pm 2.09 \log_{10}$ genomic copies/day in the post-pandemic period, with no statistically significant difference between periods ($p=0.5901$). There was also no difference between the two periods when negative results were included ($p = 0.7548$ - Mann Whitney test).

Visual analysis shows that the number of cases and deaths from COVID-19 are preceded by an increase in viral load in sewage, which confirms other studies carried out in Brazil and around the world [42, 43]. Spearman rank correlation was performed to assess the relationship between viral loads and epidemiological data at the Uberabinha WWTP. When analyzing the full study period ($n=32$), viral loads showed a significant moderate negative correlation with reported deaths ($\rho = -0.660$, $p < 0.0001$), but a non-significant weak correlation with clinical cases ($\rho = -0.321$, $p = 0.073$).

When analyzed separately by period, the pandemic phase ($n=16$) showed significant negative correlations between viral loads and both reported deaths ($\rho = -0.649$, $p = 0.007$) and clinical cases ($\rho = -0.573$, $p = 0.020$), suggesting a stronger predictive value of WBE during active pandemic surveillance, when systematic testing was still widely available. Notably, epidemiological weeks 45 to 48 of 2022 were followed by peaks in the number of cases within the next three weeks and a sustained increase in deaths extending to the first epidemiological week of 2023, reinforcing the early-warning role of environmental monitoring.

In the post-pandemic period ($n=16$), the correlation between viral loads and deaths remained significant and strengthened ($\rho = -0.731$, $p = 0.001$), while the correlation with clinical cases became negligible and non-significant ($\rho = 0.194$, $p = 0.471$). This divergence is consistent with the reduction in systematic COVID-19 testing and increased underreporting of asymptomatic infections following the end of the pandemic declaration,

which decoupled official case viral load from true viral circulation. Additionally, the sampling schedule did not capture the major clinical peak in early 2023, which further limited the correlation with case data and represents a significant methodological constraint of the longitudinal analysis.

These findings are in line with previous studies that have reported correlations between SARS-CoV-2 RNA concentrations in wastewater and COVID-19 case viral load within communities [44, 45], although the strength and direction of such correlations have varied considerably across different epidemiological settings, surveillance periods, and outcome metrics, including active cases, new daily cases, and projected future cases. However, comparatively few studies have examined the correlation between wastewater viral loads and COVID-19 mortality, and the present results suggest that deaths may represent a more stable and reliable epidemiological correlate of WBE data, particularly in endemic periods with reduced clinical testing. This raises an important question for the field: among the available epidemiological parameters, which most reliably reflects true viral circulation and thus best supports retrospective or prospective estimates using the WBE approach [46]

It was not possible to accurately determine the exact period of days between peaks in virus viral load compared to cases and deaths, since in many situations, cases accumulated and date records were not completely reliable, and a case or death could occur in one epidemiological week and only be recorded in subsequent weeks, which prevented statistical calculation. Reporting bias and the inability to track asymptomatic carriers of the disease are some of the limitations of using clinical data for disease surveillance and tracking [46, 47].

These findings are consistent, as transmission of SARS-CoV-2 normally occurs two to three weeks before a positive test is reported [43]. This period is associated with an incubation phase that ranges from 2 to 14 days, followed by clinical examinations that take place approximately one week after the onset of symptoms. Previous studies have also reported similar results as SARS-CoV-2 peaks in wastewater samples from a treatment plant in Sweden, which were recorded three to four weeks before clinical notification and Ahmed et al. [42] identified SARS-CoV-2 in wastewater samples from three treatment plants in Australia up to three weeks before the first documented clinical case. Peccia et al., 2020 [43] in the USA identified that cases appeared approximately one

week after peak viral load, however, the sample analyzed was primary sludge from a treatment station.

Despite numerous reports that wastewater surveillance can be effectively used as an early warning system for new cases of COVID-19 and other diseases [4-6] our results show that in the pandemic period, the peak viral load associated with the increase in case registrations are more evident than in the post-pandemic period. In the months following the end of the pandemic, the association is practically no longer observed, and this behavior continues throughout the post-pandemic period. It is likely that the already massive vaccine protection in this period resulted in asymptomatic cases or cases with milder clinical symptoms and led to less demand on the health system, compromising the predictive value for the real number of infections, since they do not result in official records [46, 48]. High vaccination coverage also likely led to more asymptomatic cases not recorded in official data.

On the other hand, the number of deaths in relation to the viral load follows a similar pattern in the pandemic and endemic periods, and confirms the predictive value of WBE. Despite the good association, the number of deaths in viral peaks is lower in the post-pandemic period, which allows us to infer that unvaccinated infected individuals have better clinical resolution, require less intensive treatment and have greater protection against death. After mass vaccination against COVID-19, unvaccinated individuals, especially those with comorbidities, are the most likely to have complications and die [48,49].

All our results indicate that although WBE remains a good warning system for an increase in the number of deaths, it has relative value for indicating an increase in the number of cases in endemic periods and with a high rate of vaccination coverage. On the other hand, high viral load with a low number of cases probably indicates many asymptomatic cases [46], and sequencing should continue to gain early knowledge of the introduction of new variants and their importance for public health. In addition, count results should always take into account that inhibitors contained in sewage can accelerate the degradation of SARS-CoV-2 RNA [12], and that there are discrepancies related to the spread of the virus among humans and the viral load excreted by infected people [43,44], and viral load should always be considered as estimates [9, 50]. Also, when comparing official epidemiological data, the accuracy of the records must be considered, which can lead to errors in the temporal association between cases and viral load [51]. Added to this is the

fact that SARS-CoV-2 remains on average 22 days in feces when compared to serum and respiratory samples, which are 18 and 16 days respectively, which may indicate that an infected individual can continue to shed the virus even when they are no longer considered an active case [52]. These facts indicate that WBE should be carried out in a complementary manner and in conjunction with traditional clinical epidemiology [9].

3.2 Viral genome sequencing and strain classification

Genomic surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater complements quantitative monitoring by providing information on circulating lineages and viral diversity at the population level, which is particularly relevant in the post-pandemic context, when clinical sequencing and systematic testing may be reduced. Out of 36 SARS-CoV-2-positive wastewater samples, 16 were selected for sequencing, and 15 consensus genomes were retained for downstream genomic analyses. The recovery of viral genomes from sewage remains technically challenging because wastewater contains inhibitors, organic matter and chemical compounds that may degrade viral RNA and reduce genome completeness [12]. Even so, wastewater sequencing is valuable because it can capture viral material shed by symptomatic, oligosymptomatic and asymptomatic individuals, providing a broader community-level representation than clinical sampling alone.

During infection and transmission, SARS-CoV-2 accumulates mutations that may affect viral fitness, transmissibility, immune escape and, in some cases, public health impact [53]. Viral evolution therefore occurs both within infected individuals and at the population level, where successful lineages expand through transmission chains [54]. This evolutionary process has been central to the emergence of SARS-CoV-2 variants and lineages throughout the pandemic, including the successive replacement of previously circulating variants by Omicron and its sublineages after late 2021 [54,58,59]. Pangolin lineage assignment showed that most wastewater-derived consensus sequences from the city of Uberlândia belonged to lineage B (12/15), whereas two sequences were assigned to B.1.1 and one sequence was assigned to B.1.1.529, the parental Omicron lineage (Table 1). These classifications followed the Pango nomenclature system [55] and should be interpreted as lineage assignments from wastewater-derived consensus genomes. Lineages A and B are located near the base of the SARS-CoV-2 phylogeny, and Wuhan-Hu-1 is one of the earliest representatives of lineage B. Therefore, the predominance of lineage B in the wastewater consensus genomes is consistent with the

high overall genetic similarity observed among most sequences in the wastewater-only dataset. At the same time, the detection of B.1.1 and B.1.1.529 indicates that wastewater sequencing captured additional lineage diversity during the study period.

Sample ID	WWTP code	Collection date	Pangolin lineage	Assignment method
ETE_P1_06_01_2023	P1	06/01/2023	B	Pango designation hash
ETE_P1_14_02_2023	P1	14/02/2023	B	USHER placement
ETE_P2_01_12_2022	P2	01/12/2022	B.1.1	USHER placement
ETE_P2_06_12_2022	P2	06/12/2022	B.1.1	USHER placement
ETE_P2_15_03_2023	P2	15/03/2023	B	Pango designation hash
ETE_P2_17_11_2022	P2	17/11/2022	B	Pango designation hash
ETE_P3_06_12_2022	P3	06/12/2022	B	Pango designation hash
ETE_P3_15_03_2023	P3	15/03/2023	B	USHER placement
ETE_P3_17_11_2022	P3	17/11/2022	B	Pango designation hash
ETE_P4_01_12_2022	P4	01/12/2022	B.1.1.529	USHER placement
ETE_P4_04_11_2022	P4	04/11/2022	B	Pango designation hash
ETE_P4_06_01_2023	P4	06/01/2023	B	USHER placement
ETE_P4_06_12_2022	P4	06/12/2022	B	USHER placement
ETE_P4_15_03_2023	P4	15/03/2023	B	Pango designation hash
ETE_P4_17_11_2022	P4	17/11/2022	B	USHER placement

Table 1. Pangolin lineage assignment of SARS-CoV-2 consensus genome sequences recovered from wastewater treatment plants (WWTPs) in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. WWTP codes P1–P4 correspond to the four wastewater treatment plants sampled in this study (see Section 2.1 for site details). Lineage assignment was performed with Pangolin v4.4 (pangolin_version 4.4; scorprio v0.3.19; constellations v0.1.12), using either the Pango designation hash or USHER placement, as indicated. The Wuhan-Hu-1 reference genome (NC_045512.2) was assigned to lineage B and used as an outgroup/reference; it was not treated as a new submission.

The detection of B.1.1.529 is epidemiologically relevant because this lineage corresponds to the parental Omicron lineage, which was first reported in late 2021 and subsequently

gave rise to multiple Omicron sublineages that dominated SARS-CoV-2 circulation worldwide [54,58,59]. Omicron lineages are characterized by extensive genetic diversification, particularly in the spike region, and by epidemiological features such as increased transmissibility and immune escape, which contributed to their rapid global spread [56,58,59]. In this context, detection of B.1.1.529 in wastewater supports the usefulness of environmental genomic surveillance for identifying lineage diversity even when clinical sequencing is reduced.

The B.1.1 lineage detected in two wastewater-derived consensus genomes should be interpreted within the Pango nomenclature framework. B.1.1 represents a broad lineage background from which several sublineages emerged, including B.1.1.7, the Alpha variant; however, B.1.1 itself should not be treated as synonymous with Alpha [60,61]. Thus, the results indicate the detection of three Pango lineages in the wastewater-derived consensus genomes, B, B.1.1 and B.1.1.529, rather than the definitive identification of multiple variants of concern. This distinction is particularly important for wastewater sequencing, because consensus genomes may represent pooled viral material from multiple infected individuals, including symptomatic, asymptomatic and underreported cases, and may therefore have lower sublineage resolution than high-coverage clinical genomes.

In this context, the predominance of lineage B by Pangolin, the detection of B.1.1 and B.1.1.529, the Nextclade-derived mutation profiles, and the contextual placement of wastewater-derived sequences among human SARS-CoV-2 genomes from Minas Gerais collectively suggest that wastewater sequencing captured a composite signal of circulating viral diversity in the city of Uberlândia. Rather than indicating individual infection events, these findings support the interpretation of wastewater genomic surveillance as a population-level approach for detecting lineage diversity and environmental SARS-CoV-2 genetic variation. This interpretation is consistent with previous studies showing that wastewater sequencing can complement clinical genomic surveillance by detecting variants, cryptic diversity and viral circulation patterns that may be missed when clinical testing and sequencing are reduced [68, 69, 70].

According to the lineage assignments reported in Table 1, most wastewater-derived SARS-CoV-2 consensus sequences from the city of Uberlândia were classified as lineage B (12/15), whereas two sequences were assigned to B.1.1 and one to B.1.1.529, the parental Omicron lineage. This pattern indicates predominance of genetically similar

SARS-CoV-2 consensus genomes in the wastewater samples, but also demonstrates that lineage-level diversity was still detectable in the sewage system during the study period. The detection of B.1.1.529 is particularly relevant because Omicron and its derived sublineages dominated global SARS-CoV-2 circulation after late 2021 and were associated with increased transmissibility and immune escape [54,58,59]. Therefore, even though most genomes were assigned to lineage B, the identification of B.1.1 and B.1.1.529 indicates that wastewater sequencing captured additional viral diversity circulating in the population of the city of Uberlândia.

Figure 4 provides a detailed view of the genomic pattern observed among wastewater-derived SARS-CoV-2 consensus genomes from the city of Uberlândia by combining lineage classification, phylogenetic relationships, branch support, pairwise nucleotide differences, collection year, wastewater treatment plant of origin and mutation-related annotations. The pairwise nucleotide-difference matrix showed that divergence among the 15 wastewater-derived consensus genomes ranged from 0 to 113 nucleotide differences, with a median of 24 and a mean of approximately 31 differences. Of the 105 pairwise comparisons, 21 showed no nucleotide differences, 43 showed ≤ 10 differences, and 52 showed ≤ 20 differences, indicating that most consensus genomes were highly similar. Greater divergence was concentrated in a subset of samples, particularly ETE_P1_14_02_2023, ETE_P3_15_03_2023, ETE_P4_01_12_2022 and ETE_P4_17_11_2022. The highest pairwise values were observed for ETE_P1_14_02_2023 versus ETE_P3_15_03_2023 (113 differences), ETE_P1_14_02_2023 versus ETE_P4_01_12_2022 (109 differences), and ETE_P3_15_03_2023 versus ETE_P4_01_12_2022 (106 differences). These more divergent profiles were consistent with higher Nextclade-derived substitution categories in the annotation strip of Figure 4, supporting the presence of limited but measurable consensus-level genetic heterogeneity among wastewater-derived SARS-CoV-2 genomes.

Together, Table 1, Supplementary Table 1 and Figure 4 show that SARS-CoV-2 genomes recovered from wastewater in the city of Uberlândia reflected both a dominant genetic background and additional lineage-level variation. This pattern is compatible with the expected nature of wastewater samples, which represent pooled viral material shed by multiple infected individuals rather than genomes from single clinical cases. In the post-pandemic context, this becomes particularly relevant because clinical testing and genomic

sequencing tend to decrease, while asymptomatic or mildly symptomatic infections may continue to contribute viral RNA to sewage. Thus, the genomic results reinforce the role of wastewater surveillance as a population-level strategy for monitoring SARS-CoV-2 circulation, detecting lineage diversity and identifying genetic changes that may not be fully represented in official clinical surveillance data.

The detection of B, B.1.1 and B.1.1.529 in wastewater-derived consensus genomes from the city of Uberlândia should also be interpreted in the broader context of genomic surveillance in Brazil and South America. During and after the pandemic period, SARS-CoV-2 genomic surveillance in the region documented successive lineage replacements, including the expansion and diversification of Omicron-derived lineages, while clinical testing and sequencing capacity varied substantially among countries and over time. In this scenario, wastewater sequencing provides an important population-level complement because it can capture viral diversity shed by symptomatic, oligosymptomatic and asymptomatic individuals, including infections that may not be represented in clinical databases. Similar studies in Brazil and South America have shown that environmental genomic surveillance can reveal SARS-CoV-2 diversity in wastewater and support the detection of variant introduction and spread at the community level. Therefore, the lineage diversity and consensus-level heterogeneity observed in the city of Uberlândia are consistent with the role of WBE as an integrated surveillance approach for monitoring regional viral circulation when clinical genomic surveillance becomes sparse or uneven [13, 70, 71].

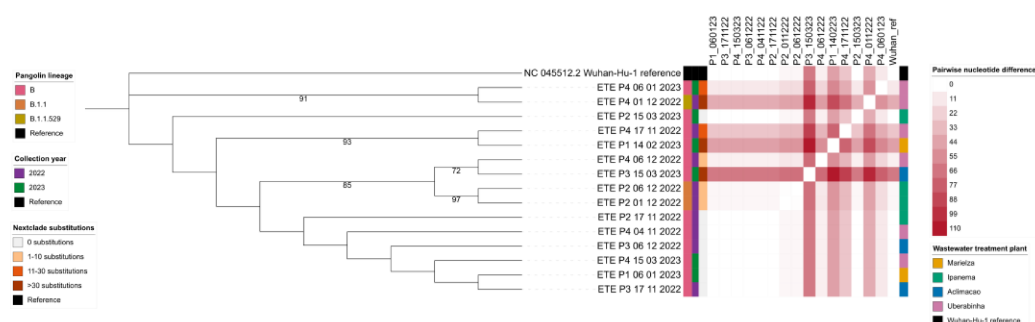


Figure 4. Phylogenetic relationships, Pangolin lineage assignments, and pairwise nucleotide differences among wastewater-derived SARS-CoV-2 consensus sequences from the city of Uberlândia.

Maximum-likelihood tree of the 15 wastewater-derived SARS-CoV-2 consensus sequences and the Wuhan-Hu-1 reference genome (NC_045512.2), displayed together

with a heatmap of pairwise nucleotide differences calculated from the full-genome multiple sequence alignment. Ambiguous bases and gaps were excluded on a pairwise basis. Branch support was assessed using 10,000 ultrafast bootstrap replicates and 10,000 SH-aLRT replicates; only support values $\geq 70\%$ are shown. Annotation strips indicate Pangolin lineage assignment, collection year, Nextclade-derived nucleotide substitution categories, and wastewater treatment plant of origin. Darker red in the heatmap indicates higher pairwise nucleotide differences. The figure highlights the high overall similarity among wastewater-derived consensus genomes, while identifying samples with higher consensus-level nucleotide differences. The figure was constructed and annotated using iTOL [33].

The contextual phylogenetic analysis expanded the interpretation of the wastewater-only dataset by placing the wastewater-derived SARS-CoV-2 sequences from the city of Uberlândia within the broader genomic diversity of human SARS-CoV-2 sequences from Minas Gerais (Figure 5). Rather than forming an isolated wastewater-specific cluster, the highlighted wastewater-derived sequences were positioned among or near branches representing different lineage groups detected in human cases during the same general period. This pattern indicates that wastewater genomic surveillance captured a composite community-level signal of viral diversity, including sequences located in regions of transition between lineage groups observed from late 2022 to early 2023.

This finding is consistent with previous genomic surveillance studies showing that wastewater sequencing can reveal SARS-CoV-2 diversity that may not be fully captured by clinical testing alone. Karthikeyan et al. showed that wastewater sequencing can detect emerging variants before clinical genomic surveillance and identify cryptic transmission patterns. In Brazil, environmental genomic surveillance in Rio de Janeiro demonstrated that wastewater monitoring can reveal SARS-CoV-2 genetic diversity and geographic distribution at the community level. In South America, wastewater sequencing in French Guiana also supported the detection of variant introduction, spread and cryptic circulation, reinforcing the value of environmental surveillance in regions where clinical sequencing may be uneven or reduced. Therefore, the placement of wastewater-derived sequences from the city of Uberlândia among human genomic background sequences is compatible with the role of WBE as an integrated surveillance strategy for monitoring regional viral circulation [13, 68].

This phylogenetic placement is particularly relevant because wastewater samples represent pooled viral material shed by multiple infected individuals, including symptomatic, oligosymptomatic and asymptomatic cases. Therefore, the distribution of wastewater-derived sequences across different regions of the tree supports their use as environmental indicators of circulating SARS-CoV-2 diversity in the population. The proximity between wastewater-derived sequences and human genomic background sequences indicates concordance between environmental detection and regional viral circulation in Minas Gerais. However, the contextual tree should be interpreted as evidence of genetic similarity and population-level viral circulation, not as direct epidemiological linkage between specific human cases and wastewater treatment plants.

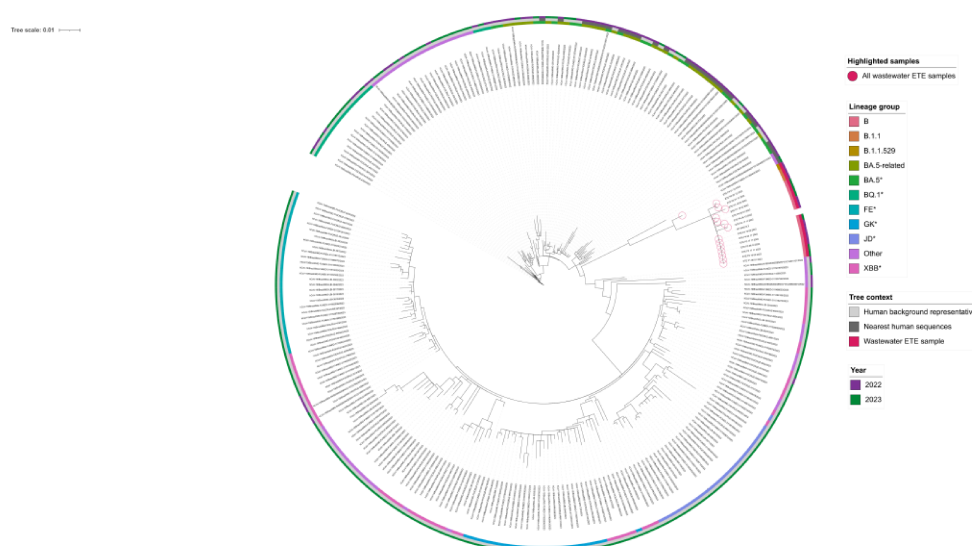


Figure 5. Contextual phylogenetic placement of wastewater-derived SARS-CoV-2 sequences within human genomic diversity from Minas Gerais, Brazil.

Circular phylogenetic tree showing the placement of wastewater-derived SARS-CoV-2 sequences from the city of Uberlândia within a reduced contextual dataset of human SARS-CoV-2 genomes from Minas Gerais. Wastewater-derived sequences are highlighted with magenta circles. Human sequences include the nearest phylogenetic neighbors of each wastewater-derived sequence and representative background sequences selected by month and lineage group. Outer annotation rings indicate lineage group, tree context and collection year. The figure was generated to improve visualization of the phylogenetic position of wastewater-derived sequences within the broader human genomic background and should be interpreted as contextual genomic placement rather than evidence of direct transmission.

Together, Table 1, Supplementary Table 1, Figure 4 and Figure 5 indicate that wastewater genomic surveillance in the city of Uberlândia captured both predominant lineage patterns and measurable consensus-level genetic variation. These results reinforce the value of wastewater sequencing as a complementary population-level approach for monitoring SARS-CoV-2 diversity, particularly in post-pandemic settings where reduced clinical testing, underreporting and decreased genomic sequencing may limit the representativeness of official surveillance data. This is especially relevant in South America, where genomic surveillance has shown heterogeneous sequencing capacity and dynamic variant replacement across countries and periods [70, 71] .

4. Conclusion

This study evaluated wastewater-based epidemiology as a complementary tool for monitoring SARS-CoV-2 circulation in the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, across pandemic and post-pandemic periods. SARS-CoV-2 RNA was detected in wastewater throughout the study period, with no significant difference in viral loads between pandemic and post-pandemic phases, indicating continued viral circulation after the end of the public health emergency. Although the association between wastewater viral loads and reported clinical cases weakened in the post-pandemic period, likely due to reduced testing, underreporting and a higher frequency of mild or asymptomatic infections, wastewater viral loads remained informative in relation to mortality trends. These findings suggest that WBE may provide a useful population-level signal of viral circulation when official case counts become less representative.

Genomic analyses expanded this interpretation by showing that wastewater-derived SARS-CoV-2 consensus genomes captured both predominant lineage patterns and measurable genetic heterogeneity. Pangolin lineage assignment identified a predominance of lineage B, with additional detection of B.1.1 and B.1.1.529, the parental Omicron lineage. Pairwise nucleotide-difference and phylogenetic analyses showed high overall similarity among wastewater-derived consensus genomes, while the broader contextual phylogeny placed these sequences within the regional diversity of human SARS-CoV-2 genomes from Minas Gerais. Together, the quantitative and genomic results reinforce wastewater surveillance as a valuable complement to clinical, epidemiological and genomic surveillance, particularly in post-pandemic settings where reduced testing and sequencing may limit the detection of circulating viral diversity.

Continued integration of wastewater monitoring into public health surveillance can support early detection of viral circulation, lineage diversity and preparedness for future SARS-CoV-2 waves or emerging variants.

Acknowledgment

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. We also thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for research funding (grant no. 400284/2022-7).

Conflict of Interest

The authors declare no competing financial interest.

Data Availability Statement

Ten of the 15 SARS-CoV-2 wastewater-derived consensus genome sequences generated in this study have been deposited in GenBank under accession numbers PZ672899–PZ672908. The remaining five genomes (samples ETE_P1_14_02_2023, ETE_P3_15_03_2023, ETE_P4_01_12_2022, ETE_P4_06_01_2023 and ETE_P4_17_11_2022) exhibited frameshift patterns in the ORF1ab/ORF1a and spike coding regions consistent with population-level genomic heterogeneity typical of wastewater samples, which precluded the automated gene annotation required for GenBank deposition; these five sequences remain available from the corresponding author upon reasonable request. Raw epidemiological data (viral loads, reported cases and deaths) supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- [1] Lamers, M. M.; Haagmans, B. L. SARS-CoV-2 Pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research May 1, 2022, pp 270–284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>.
- [2] Silva, S. J. R. da; Pena, L. Collapse of the Public Health System and the Emergence of New Variants during the Second Wave of the COVID-19 Pandemic in Brazil. *One Health*, 2021, 13, 100287. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2021.100287>.
- [3] Organização Mundial da Saúde (WHO). COVID-19 Dashboard. <https://data.who.int/dashboards/covid19/> (accessed Nov 4, 2024).

- [4] Smith, D. B.; Paddy, J. O.; Simmonds, P. The Use of Human Sewage Screening for Community Surveillance of Hepatitis E Virus in the UK. *J Med Virol*, 2016, 88 (5), 915–918. <https://doi.org/10.1002/jmv.24403>.
- [5] Hellmér, M.; Paxéus, N.; Magnius, L.; Enache, L.; Arnholm, B.; Johansson, A.; Bergström, T.; Norder, H. Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80 (21), 6771–6781. <https://doi.org/10.1128/AEM.01981-14>.
- [6] Manor, Y.; Shulman, L. M.; Kaliner, E.; Hindiye, M.; Ram, D.; Sofer, D.; Moran-Gilad, J.; Lev, B.; Grotto, I.; Gamzu, R.; et al. Intensified Environmental Surveillance Supporting the Response to Wild Poliovirus Type 1 Silent Circulation in Israel, 2013. *Eurosurveillance*, 2014, 19 (7). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.7.20708>.
- [7] Deng, Y.; Xu, X.; Zheng, X.; Ding, J.; Li, S.; Chui, H. kwong; Wong, T. kin; Poon, L. L. M.; Zhang, T. Use of Sewage Surveillance for COVID-19 to Guide Public Health Response: A Case Study in Hong Kong. *Science of The Total Environment*, 2022, 821, 153250. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.153250>.
- [8] Shafer, M. M.; Bobholz, M. J.; Vuyk, W. C.; Gregory, D. A.; Roguet, A.; Haddock Soto, L. A.; Rushford, C.; Janssen, K. H.; Emmen, I. E.; Ries, H. J.; et al. Tracing the Origin of SARS-CoV-2 Omicron-like Spike Sequences Detected in an Urban Sewershed: A Targeted, Longitudinal Surveillance Study of a Cryptic Wastewater Lineage. *Lancet Microbe*, 2024, 5 (4), e335–e344. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00372-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00372-5).
- [9] Claro, I. C. M.; Cabral, A. D.; Augusto, M. R.; Duran, A. F. A.; Graciosa, M. C. P.; Fonseca, F. L. A.; Speranca, M. A.; Bueno, R. de F. Long-Term Monitoring of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater in Brazil: A More Responsive and Economical Approach. *Water Res*, 2021, 203. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117534>.
- [10] Aguiar-Oliveira, M. de L.; Campos, A.; Matos, A. R.; Rigotto, C.; Sotero-Martins, A.; Teixeira, P. F. P.; Siqueira, M. M. Wastewater-Based Epidemiology (Wbe) and Viral Detection in Polluted Surface Water: A Valuable Tool for Covid-19 Surveillance, a Brief Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG December 2, 2020, pp 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249251>.
- [11] Barbosa, M. R. F.; Garcia, S. C.; Bruni, A. de C.; Machado, F. S.; de Oliveira, R. X.; Dropa, M.; da Costa, A. C.; Leal, E.; Brandão, C. J.; da Silva, R. L. O.; et al. One-Year Surveillance of SARS-CoV-2 in Wastewater from Vulnerable Urban Communities in Metropolitan São Paulo, Brazil. *J. Water Health* 2022, 20 (2), 471–490. <https://doi.org/10.2166/wh.2022.210>.
- [12] de Melo Mendes, G.; Estrela, P. F. N.; de Souza, M. N.; de Brito, N. N.; Arruda, A. F.; Augusto, M. R.; Claro, I. C. M.; Duran, A. F. A.; Cabral, A. D.; de Freitas Bueno, R.; et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Goiânia Wastewater: Wastewater-Based Epidemiology for a COVID-19 Early Warning System. *COVID-19. Quim Nova*, 2022, 45 (10), 1197–1204. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170933>.
- [13] Gonçalves-Brito, A. S.; Magaldi, M.; Farias, B. O.; Nascimento, A. P. A.; Flores, C.; Montenegro, K. S.; Lopes-Carvalho, M.; Gimenez, A.; Costa, V. S. C.; Assunção, V. C.; et al. Environmental Genomic Surveillance of SARS-CoV-2 in Wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health*, 2023, 21 (5), 653–662. <https://doi.org/10.2166/wh.2023.034>.

- [14] Departamento de Monitoramento e Avaliação de (DEMAS); Secretaria de Informação e Saúde Digital (SEIDIGI). Ministério da Saúde - COVID-19 no Brasil. https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html (accessed Nov 23, 2024).
- [15] Ministério da Saúde, G. do B. Informe Semana Epidemiológica 43 - 2024 Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/covid19/publicacoes-tecnicas/informes/informe-se-43-de-2024.pdf> (accessed Nov 4, 2024).
- [16] World Health Organization. Environmental Surveillance for SARS-CoV-2 to Complement Other Public Health Surveillance; Geneva, 2023.
- [17] Ministério da Saúde -. Calendário Epidemiológico. - SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação <https://portalsinan.saude.gov.br/calendario-epidemiologico> (accessed Nov 11, 2024).
- [18] DMAE - Departamento Municipal de Água e Esgoto - Prefeitura Municipal de Uberlândia. Tratamento de esgoto em Uberlândia <https://www.uberlandia.mg.gov.br/prefeitura/orgaosmunicipais/dmae/tratamento-de-esgoto/> (accessed Nov 4, 2024).
- [19] IBGE. Censo Demográfico 2022 <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/trabalho/22827-censo-demografico-2022.html> (accessed Nov 12, 2024).
- [20] OpenStreetMap <https://www.openstreetmap.org/#map=4/-15.13/-53.19> (accessed Nov 19, 2024).
- [21] Chomczynski, P.; Sacchi, N. The Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction: Twenty-Something Years On. *Nat Protoc*, 2006, 1 (2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>.
- [22] Medema, G.; Heijnen, L.; Elsinga, G.; Italiaander, R.; Brouwer, A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands. *Environ Sci Technol Lett*, 2020, 7 (7), 511–516. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>.
- [23] Wu, F.; Zhang, J.; Xiao, A.; Gu, X.; Lee, W. L.; Armas, F.; Kauffman, K.; Hanage, W.; Matus, M.; Ghaeli, N.; et al. SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases. *mSystems*, 2020, 5 (4). <https://doi.org/10.1128/msystems.00614-20>.
- [24] Wick, R. Porechop - In GitHub repository <https://github.com/rrwick/Porechop> (accessed Nov 12, 2024).
- [25] De Moraes, L.; Camillo, B.; Feliciano, A.; Duran, A.; Carolina, I.; Claro, M.; Augusto, R.; Cabral, A. D.; Barros De Lima, G.; Tavares, D. A.; et al. First Detection of SARS-CoV-2 Omicron Variant Using Nanopore Sequencing in Wastewater of Foz Do Iguaçu-Brazil; 2022. <https://doi.org/DOI:10.2139/ssrn.4084666>.
- [26] Cingolani, P.; Platts, A.; Wang, L. L.; Coon, M.; Nguyen, T.; Wang, L.; Land, S. J.; Lu, X.; Ruden, D. M. A Program for Annotating and Predicting the Effects of Single Nucleotide Polymorphisms, SnpEff: SNPs in the Genome of *Drosophila Melanogaster* Strain W1118; Iso-2; Iso3. *Fly (Austin)*, 2012, 6 (2), 80–92. <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.

- [27] O'Toole, Á.; Scher, E.; Underwood, A.; Jackson, B.; Hill, V.; McCrone, J. T.; Colquhoun, R.; Ruis, C.; Abu-Dahab, K.; Taylor, B.; et al. Assignment of Epidemiological Lineages in an Emerging Pandemic Using the Pangolin Tool. *Virus Evol*, 2021, 7 (2). <https://doi.org/10.1093/ve/veab064>.
- [28] Katoh, K.; Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol*, 2013, 30 (4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- [29] Steenwyk, J. L.; Buida, T. J.; Li, Y.; Shen, X. X.; Rokas, A. ClipKIT: A Multiple Sequence Alignment Trimming Software for Accurate Phylogenomic Inference. *PLoS Biol*, 2020, 18 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001007>.
- [30] Minh, B. Q.; Schmidt, H. A.; Chernomor, O.; Schrempf, D.; Woodhams, M. D.; Von Haeseler, A.; Lanfear, R.; Teeling, E. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol*, 2020, 37 (5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
- [31] Kalyaanamoorthy, S.; Minh, B. Q.; Wong, T. K. F.; Von Haeseler, A.; Jermini, L. S. ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nat Methods*, 2017, 14 (6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
- [32] De Maio, N.; Kalaghatgi, P.; Turakhia, Y.; Corbett-Detig, R.; Minh, B. Q.; Goldman, N. Maximum Likelihood Pandemic-Scale Phylogenetics. *Nat Genet*, 2023, 55 (5), 746–752. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01368-0>.
- [33] Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life (ITOL) v6: Recent Updates to the Phylogenetic Tree Display and Annotation Tool. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52 (W1), W78–W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>.
- [34] Paradis, E.; Schliep, K. Ape 5.0: An Environment for Modern Phylogenetics and Evolutionary Analyses in R. *Bioinformatics*, 2019, 35 (3), 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>.
- [35] Schliep, K. P. Phangorn: Phylogenetic Analysis in R. *Bioinformatics*, 2011, 27 (4), 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>.
- [36] Wickham, H. Reshaping Data with the Reshape Package. *J Stat Softw*, 2007, 21(12), 1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.18637/jss.v021.i12>.
- [37] Hadley Wickham. Ggplot2 - Elegant Graphics for Data Analysis. Use R!.; Springer Cham, 2016; p 260. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>.
- [38] Sanderson, T. Taxonium, a Web-Based Tool for Exploring Large Phylogenetic Trees. *Elife*, 2022. <https://doi.org/https://doi.org/10.7554/eLife.82392>.
- [39] Marques, P. R. C.; Dolabella, S. S.; Jain, S.; Barbosa, A. A. T. CONTRIBUIÇÕES DA EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ÁGUAS RESIDUAIS PARA VIGILÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 2022, 1–13. <https://doi.org/10.51161/rem/3487>.
- [40] Sodré, F. F.; Brandão, C. C. S.; Vizzotto, C. S.; Maldaner, e. A. O. WASTEWATER-BASED EPIDEMIOLOGY AS A STRATEGY for COMMUNITY MONITORING, MAPPING of HOTSPOTS and EARLY WARNING SYSTEMS of COVID-19. *Quim Nova*, 2020, 43 (4), 515–519. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170545>.

- [41] Nauta, M.; McManus, O.; Træholt Franck, K.; Lindberg Marving, E.; Dam Rasmussen, L.; Raith Richter, S.; Ethelberg, S. Early Detection of Local SARS-CoV-2 Outbreaks by Wastewater Surveillance: A Feasibility Study. *Epidemiol Infect*, 2023, 151. <https://doi.org/10.1017/S0950268823000146>.
- [42] Ahmed, W.; Angel, N.; Edson, J.; Bibby, K.; Bivins, A.; O'Brien, J. W.; Choi, P. M.; Kitajima, M.; Simpson, S. L.; Li, J.; et al. First Confirmed Detection of SARS-CoV-2 in Untreated Wastewater in Australia: A Proof of Concept for the Wastewater Surveillance of COVID-19 in the Community. *Science of the Total Environment*, 2020, 728. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138764>.
- [43] Peccia, J.; Zulli, A.; Brackney, D. E.; Grubaugh, N. D.; Kaplan, E. H.; Casanovas-Massana, A.; Ko, A. I.; Malik, A. A.; Wang, D.; Wang, M.; et al. Measurement of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Tracks Community Infection Dynamics. *Nat Biotechnol*, 2020, 38 (10), 1164–1167. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0684-z>.
- [44] Nemudryi, A.; Nemudraia, A.; Wiegand, T.; Surya, K.; Buyukyoruk, M.; Cicha, C.; Vanderwood, K. K.; Wilkinson, R.; Wiedenheft, B. Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. *Cell Rep Med*, 2020, 1 (6), 100098. <https://doi.org/10.1016/J.XCRM.2020.100098>.
- [45] Wu, F.; Xiao, A.; Zhang, J.; Moniz, K.; Endo, N.; Armas, F.; Bonneau, R.; Brown, M. A.; Bushman, M.; Chai, P. R.; et al. SARS-CoV-2 RNA Concentrations in Wastewater Foreshadow Dynamics and Clinical Presentation of New COVID-19 Cases. *Science of The Total Environment*, 2022, 805, 150121. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.150121>.
- [46] Li, X.; Zhang, S.; Sherchan, S.; Orive, G.; Lertxundi, U.; Haramoto, E.; Honda, R.; Kumar, M.; Arora, S.; Kitajima, M.; et al. Correlation between SARS-CoV-2 RNA Concentration in Wastewater and COVID-19 Cases in Community: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V. January 5, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129848>.
- [47] Thompson, J. R.; Nancharaiah, Y. V.; Gu, X.; Lee, W. L.; Rajal, V. B.; Haines, M. B.; Girones, R.; Ng, L. C.; Alm, E. J.; Wuertz, S. Making Waves: Wastewater Surveillance of SARS-CoV-2 for Population-Based Health Management. *Water Res*, 2020, 184, 116181. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2020.116181>.
- [48] Quintana De Medeiros, G.; Neves De Barros, V.; Martins Guesser³, V.; Mary De Paiva⁴, K.; Haas⁵, P. Efetividade Das Vacinas Da COVID-19 e Disseminação Do Vírus: Revisão Sistemática Efficacy of COVID-19 Vaccines and Virus Shedding: Systematic Review Efectividad de Las Vacunas COVID-19 y Propagación Del Virus: Revisión Sistemática. *Revista Neurociências*, v. 31, p. 1-23, 2023.
- [49] Costa, G. J.; Junior, J. R. da S.; da Silva, C. C. A.; de Lima, T. P. F.; Costa, M. M.; Sousa, M. H. O.; Costa, G. C. D. S.; Júnior, J. I. C.; Sales, M. J. T. Risk Factors for Death and Illness Severity in Vaccinated versus Unvaccinated COVID-2019 Inpatients: A Retrospective Cohort Study. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2023, 49 (4). <https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20230145>.
- [50] CDC. COVID-19 - Centers for Disease Control and Prevention – CDC <https://www.cdc.gov/covid/php/variants/index.html> (accessed Nov 12, 2024).
- [51] Ferraz, V. C. de A. B.; Ferezin, V. V.; Knoch, M.; Durovni, B.; Saraceni, V.; Lahdo, V.; Santos, M. L. de M. dos; De-Carli, A. D. Epidemiological Data Monitoring

Dashboards as a Surveillance and Healthcare Management Strategy. *Ciencia e Saude Coletiva*, 2024, 29 (11). <https://doi.org/10.1590/1413-812320242911.04142024>.

[52] Zheng, S.; Fan, J.; Yu, F.; Feng, B.; Lou, B.; Zou, Q.; Xie, G.; Lin, S.; Wang, R.; Yang, X.; et al. Viral Load Dynamics and Disease Severity in Patients Infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang Province, China, January-March 2020: Retrospective Cohort Study. *The BMJ*, 2020, 369. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1443>.

[53] Volz, E.; Hill, V.; McCrone, J. T.; Price, A.; Jorgensen, D.; O'Toole, Á.; Southgate, J.; Johnson, R.; Jackson, B.; Nascimento, F. F.; et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell*, 2021, 184 (1), 64-75.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.020>.

[54] Markov, P. V.; Ghafari, M.; Beer, M.; Lythgoe, K.; Simmonds, P.; Stilianakis, N. I.; Katzourakis, A. The Evolution of SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*. *Nature Research* June 1, 2023, pp 361–379. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00878-2>.

[55] Rambaut, A.; Holmes, E. C.; O'Toole, Á.; Hill, V.; McCrone, J. T.; Ruis, C.; du Plessis, L.; Pybus, O. G. Addendum: A Dynamic Nomenclature Proposal for SARS-CoV-2 Lineages to Assist Genomic Epidemiology. *Nature microbiology*. NLM (Medline) March 1, 2021, p 415. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00872-5>.

[56] Custódio, A. F.; Benito, L. A. O. Registros de Casos Acumulados e Novos de Variantes de Preocupação Do COVID-19, Brasil, 2021-2022: Ômicron, Gamma e Delta. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*, 2022, 548–564. <https://doi.org/10.36239/revisa.v11.n4.p548a564>.

[57] GISAID: Global Initiative on Sharing All Influenza Data <https://gisaid.org/hcov19-variants/> (accessed Nov 12, 2024).

[58] Dhawan, M.; Saied, A. R. A.; Mitra, S.; Alhumaydhi, F. A.; Emran, T. Bin; Wilairatana, P. Omicron Variant (B.1.1.529) and Its Sublineages: What Do We Know so Far amid the Emergence of Recombinant Variants of SARS-CoV-2? *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l. October 1, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113522>.

[59] Shuai, H.; Chan, J. F. W.; Hu, B.; Chai, Y.; Yuen, T. T. T.; Yin, F.; Huang, X.; Yoon, C.; Hu, J. C.; Liu, H.; et al. Attenuated Replication and Pathogenicity of SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron. *Nature*, 2022, 603 (7902), 693–699. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04442-5>.

[60] Rambaut, A.; Holmes, E. C.; O'Toole, Á.; Hill, V.; McCrone, J. T.; Ruis, C.; du Plessis, L.; Pybus, O. G. A Dynamic Nomenclature Proposal for SARS-CoV-2 Lineages to Assist Genomic Epidemiology. *Nat Microbiol*, 2020, 5 (11), 1403–1407. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>.

[61] Harvey, W. T.; Carabelli, A. M.; Jackson, B.; Gupta, R. K.; Thomson, E. C.; Harrison, E. M.; Ludden, C.; Reeve, R.; Rambaut, A.; Peacock, S. J.; et al. SARS-CoV-2 Variants, Spike Mutations and Immune Escape. *Nature Reviews Microbiology*. *Nature Research* July 1, 2021, pp 409–424. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>.

[62] Giovanetti, M.; Slavov, S. N.; Fonseca, V.; Wilkinson, E.; Tegally, H.; Patané, J. S. L.; Viala, V. L.; San, E. J.; Rodrigues, E. S.; Santos, E. V.; et al. Genomic

Epidemiology of the SARS-CoV-2 Epidemic in Brazil. *Nat Microbiol*, 2022, 7 (9), 1490–1500. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01191-z>.

[63] GraphPad Prism version 8.0.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

[64] Piñeiro, C.; Pichel, J. C. Efficient Phylogenetic Tree Inference for Massive Taxonomic Datasets: Harnessing the Power of a Server to Analyze 1 Million Taxa. *GigaScience*, 2024, 13, 1–12. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giae055>.

[65] Aksamentov, I.; Roemer, C.; Hodcroft, E. B.; Neher, R. A. Nextclade: Clade Assignment, Mutation Calling and Quality Control for Viral Genomes. *J. Open Source Softw.* 2021, 6 (67), 3773. <https://doi.org/10.21105/joss.03773>.

[66] Wong, T. K. F.; Ly-Trong, N.; Ren, H.; et al. IQ-TREE 3: Phylogenomic Inference Software Using Complex Evolutionary Models. *Mol. Biol. Evol.* 2026. <https://doi.org/10.1093/molbev/msag117>.

[67] Wickham, H.; Averick, M.; Bryan, J.; Chang, W.; McGowan, L. D.; François, R.; Grolemund, G.; Hayes, A.; Henry, L.; Hester, J.; et al. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* 2019, 4 (43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>.

[68] Karthikeyan, S.; Levy, J. I.; De Hoff, P.; Humphrey, G. W.; Birmingham, A.; Jepsen, K.; Farmer, S.; Tyson, G. W.; Petrov, D. A.; Hadden, W. A.; et al. Wastewater Sequencing Reveals Early Cryptic SARS-CoV-2 Variant Transmission. *Nature* 2022, 609 (7925), 101–108. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05049-6>.

[69] Ellmen, I.; Huisman, J. S.; et al. Reconstructing SARS-CoV-2 Lineages from Mixed Wastewater Sequencing Data. *Sci. Rep.* 2024, 14, 20008. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-70416-4>.

[70] Combe, M.; et al. Wastewater Sequencing as a Powerful Tool to Reveal SARS-CoV-2 Variant Introduction and Spread in French Guiana, South America. *Sci. Total Environ.* 2024, 930, 172589. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171645>.

[71] Dias, M. F. R.; et al. Genomic Surveillance and Sequencing of SARS-CoV-2 across South America. *Rev. Panam. Salud Publica* 2023, 47, e21. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.21>.

**CAPÍTULO 3- (ARTIGO) VIGILÂNCIA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ESGOTO
BRUTO: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENÔMICA DE *ESCHERICHIA COLI* E
KLEBSIELLA PNEUMONIAE INTEGRADA À METAGENÔMICA DIRECIONADA**

Artigo a ser publicado no periódico International Journal of Hygiene and Environmental
Health

Vigilância da resistência antimicrobiana em esgoto bruto: caracterização fenotípica e genômica de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* integrada à metagenômica direcionada

José Eduardo Machado Barroso^{a*}, Dayanne Maria da Silva Coimbra^a, Letícia Roberta Martins Costa^a, Ana Beatriz Garcez Buiatte^b, Fernanda Raghianti^a, Elayne Cristina Machado^c, Caroline Rebouças Damasceno^d, Cleber Furtado Aksenén^d, César Rossas Mota Filho^d, Cheryl Marie Palacay Andam^b, Roberta Torres de Melo^a, Daise Aparecida Rossi^a

^a Laboratory of Applied Animal Biotechnology, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

^b University at Albany, ALBANY, Estados Unidos.

^c Department of Sanitary and Environmental, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Engineering (DESA), Belo Horizonte, MG, Brazil.

^d Department of Biotechnology, Oswaldo Cruz Foundation - Ceará, Brazil.

*Autor correspondente: José Eduardo Machado Barroso, jose.barroso@ufu.br

Resumo

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é um desafio global no qual as águas residuárias assumem papel central como matriz de vigilância. Este estudo integrou a caracterização fenotípica e genômica de isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* recuperados de esgoto bruto à metagenômica direcionada nas mesmas amostras. Três amostras compostas de 24 h foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgoto Uberabinha (Uberlândia, MG, Brasil). Seis isolados de *E. coli* e três de *K. pneumoniae* foram submetidos a teste de suscetibilidade antimicrobiana, sequenciamento do genoma completo e análises de *sequence types*, genes de resistência, virulência e replicons plasmidiais. As mesmas amostras foram submetidas a painéis de metagenômica direcionada voltados a patógenos respiratórios e urinários. Os nove isolados foram classificados como multirresistentes, com núcleo comum de resistência a amoxicilina/ácido clavulânico, aztreonam, cefuroxima axetil, ceftriaxona e ciprofloxacina; *bla*CTX-M foi detectado em todos os isolados de *E. coli* e *bla*KPC-2 em todos os de *K. pneumoniae*. A metagenômica direcionada recuperou oito táxons ESKAPEE (grupo de patógenos prioritários) nas três amostras e identificou sinais de *bla*NDM e *bla*VIM diretamente na matriz de esgoto, ausentes nos genomas cultivados, evidenciando complementaridade entre as abordagens. Os replicons IncF e do tipo Col predominaram em ambas as espécies. Os resultados reforçam o esgoto bruto como matriz sensível para a vigilância integrada da RAM sob a perspectiva de Uma Só Saúde,

destacando a importância de combinar cultivo, sequenciamento genômico e metagenômica direcionada para captar determinantes de resistência não detectados por métodos isolados.

Palavras-chave (Keywords)

Antimicrobial resistance; Wastewater-based surveillance; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; Whole-genome sequencing; Targeted metagenomics; *One Health*

Antimicrobial resistance (AMR) is a global challenge in which wastewater plays a central role as a surveillance matrix. This study integrated phenotypic and genomic characterization of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered from raw sewage with targeted, hybridization-based metagenomics on the same samples. Three 24-h composite samples were collected at the Uberabinha Sewage Treatment Plant (Uberlândia, MG, Brazil). Six *E. coli* and three *K. pneumoniae* isolates underwent antimicrobial susceptibility testing, whole-genome sequencing, and bioinformatic analyses of *sequence types*, resistance genes, virulence factors, and plasmid replicons. The same samples were subjected to targeted metagenomics using respiratory- and urinary-pathogen panels. All nine isolates were multidrug-resistant, sharing a common resistance core to amoxicillin/clavulanic acid, aztreonam, cefuroxime axetil, ceftriaxone, and ciprofloxacin; *bla*CTX-M was detected in all *E. coli* isolates and *bla*KPC-2 in all *K. pneumoniae* isolates. Targeted metagenomics recovered eight ESKAPEE taxa (a priority group of multidrug-resistant pathogens) in all three samples and identified *bla*NDM and *bla*VIM signals directly in the sewage matrix that were absent from the cultured genomes, demonstrating complementarity between approaches. IncF and Col-type replicons predominated in both species. These findings reinforce raw sewage as a sensitive matrix for integrated AMR surveillance under the *One Health* perspective, highlighting the value of combining culture, genomic sequencing, and targeted metagenomics to capture resistance determinants missed by isolated methods.

Destaques (Highlights)

1. Esgoto bruto revelou núcleo comum de resistência em *E. coli* e *K. pneumoniae*.
2. Metagenômica direcionada detectou *bla*NDM e *bla*VIM ausentes nos isolados cultivados.
3. Replicons IncF e Col predominaram nos isolados multirresistentes avaliados.
4. Cultivo, genômica e metagenômica direcionada mostraram-se complementares na EBE.

5. Achados reforçam a vigilância de RAM em esgoto sob a perspectiva de Uma Só Saúde.

1. Introdução

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é a capacidade de microrganismos sobreviverem e se multiplicarem na presença de antimicrobianos previamente eficazes, tornando infecções comuns difíceis de tratar, e elevando o risco de complicações e mortalidade (WHO, 2025a). Embora comumente abordada sob uma perspectiva clínica, sua emergência e disseminação são influenciadas pelas interações entre saúde humana, saúde animal e meio ambiente, caracterizando um desafio sob a perspectiva de Uma Só Saúde (UNEP, 2023; WHO, 2025b).

Nesse contexto, as águas residuárias e as Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) apresentam relevância particular, pois recebem bactérias resistentes, genes de resistência e resíduos de antimicrobianos provenientes de diferentes fontes (Punch et al., 2025; WHO, 2024a). Paradoxalmente, o esgoto bruto representa simultaneamente um ponto de convergência da RAM e uma fonte valiosa de informação epidemiológica (Conforti et al., 2025; Hock et al., 2026). Por reunir contribuições da população atendida pela rede coletora, essa matriz fornece um sinal agregado da comunidade, possibilitando investigar a circulação de microrganismos e determinantes de resistência em escala populacional por meio da Epidemiologia Baseada em Esgoto (EBE) (Hock et al., 2026; Pruden et al., 2021).

Considerando a ampla diversidade microbiana detectável pela EBE, a vigilância da RAM tende a priorizar patógenos de maior relevância clínica e epidemiológica (Conforti et al., 2025; WHO, 2024a). Nesse contexto, destaca-se o grupo ESKAPEE, composto por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli* (Li et al., 2025a). Esses microrganismos estão associados a infecções graves e apresentam elevada capacidade de adquirir e disseminar determinantes de resistência, frequentemente limitando as opções terapêuticas disponíveis (Miller; Arias, 2024).

Entre eles, *E. coli* e *K. pneumoniae* assumem particular relevância no contexto de Uma Só Saúde por atuarem como reservatórios e disseminadores de β -lactamases de espectro estendido e carbapenemases (Ramatla et al., 2023; Zagui et al., 2025). A importância de seu monitoramento é reforçada pela classificação de Enterobacterales

resistentes às cefalosporinas de terceira geração e aos carbapenêmicos como patógenos de prioridade crítica pela Organização Mundial da Saúde (Sati et al., 2025; WHO, 2024c).

Apesar do potencial das águas residuais para a vigilância da RAM, nenhuma abordagem isolada é capaz de representar toda a complexidade presente nessa matriz. Os métodos baseados em cultivo permitem recuperar bactérias viáveis e avaliar seus perfis fenotípicos, enquanto o sequenciamento do genoma completo possibilita caracterizar linhagens, genes e mutações associados à resistência, fatores de virulência e replicons plasmidiais (Ballén et al., 2025). A metagenômica, por sua vez, amplia a investigação para microrganismos e determinantes que podem não ser recuperados pelo cultivo, e estratégias de enriquecimento direcionado podem aumentar a detecção de alvos pouco representados (Acosta et al., 2025; Mao; Shisler; Nguyen, 2025). Assim, a integração dessas abordagens permite relacionar características de isolados cultiváveis ao reservatório mais amplo de resistência presente no esgoto.

O objetivo deste estudo foi integrar a caracterização fenotípica e genômica de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* recuperados de esgoto bruto com a análise metagenômica direcionada das mesmas amostras, baseada no enriquecimento por hibridização de alvos associados a patógenos e à resistência aos antimicrobianos, visando ampliar a compreensão da disseminação de genes de resistência em ambientes urbanos. Foram investigados os perfis de suscetibilidade, os *sequence types*, os genes e mutações associados à resistência, os fatores de virulência e os replicons plasmidiais dos isolados. Paralelamente, buscou-se detectar táxons ESKAPEE e categorias de resistência diretamente nas amostras de esgoto por metagenômica direcionada. Essa abordagem permitiu avaliar a complementaridade entre os dados obtidos por cultivo e sequenciamento genômico e aqueles revelados pela análise metagenômica da matriz ambiental.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta das amostras

O estudo foi realizado em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, município com aproximadamente 800 mil habitantes, no qual todo o esgoto coletado é submetido a tratamento (DMAE, 2025; IBGE, 2025). Três amostras de esgoto bruto foram coletadas na etapa preliminar da Estação de Tratamento de Esgoto Uberabinha (ETE-Uberabinha;

18,88° S, 48,3285239° W), responsável pelo tratamento de aproximadamente 95 % do esgoto municipal (DMAE, 2025). As coletas ocorreram em 1º de dezembro de 2024, 8 de janeiro de 2025 e 2 de fevereiro de 2025, correspondendo às amostras 1, 2 e 3, respectivamente.

Em cada coleta, foi obtida uma amostra composta de 24 h, com volume final de 5 L, utilizando amostrador automático refrigerado a 4–8 °C (Étsus 2000, Brasil). O equipamento foi programado para coletar alíquotas a cada 20 min, com volumes ajustados proporcionalmente à vazão com base nos registros do mês anterior. Após homogeneização, as amostras foram mantidas sob refrigeração durante o transporte e processadas em até 6 h após o término da coleta (Baird, 2017).

2.2 Isolamento e identificação bacteriana

As amostras foram submetidas a diluições seriadas em solução salina a 0,9 %, e alíquotas de 10 mL das diluições selecionadas foram filtradas em membranas com porosidade de 0,45 µm, conforme princípios estabelecidos para análises microbiológicas de águas residuais (Baird et al., 2017). As membranas foram transferidas para ESBL ChromoSelect Agar Base suplementado com ESBL Supplement e KPC ChromoSelect Agar Base suplementado com KPC Supplement (Millipore) e incubadas a 37 °C por 18–24 h.

Colônias roxas, presuntivas de *E. coli*, foram selecionadas no meio ESBL suplementado, enquanto colônias azuladas ou verde-azuladas, presuntivas de *Klebsiella* spp., foram selecionadas no meio KPC suplementado. A identificação bacteriana foi realizada no sistema automatizado VITEK® 2, utilizando o cartão VITEK® 2 GN (bioMérieux). Para as análises fenotípicas e genômicas, foram selecionados seis isolados de *E. coli* e três de *K. pneumoniae*. ECO01, ECO02 e KLEB02 foram obtidos da amostra 1; ECO03, ECO04 e KLEB03, da amostra 2; e ECO05, ECO06 e KLEB01, da amostra 3.

2.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado no sistema automatizado VITEK® 2 (bioMérieux), utilizando o cartão AST-N409 para determinação da concentração inibitória mínima. O painel incluiu amicacina (AMI), gentamicina (GEN), amoxicilina/ácido clavulânico (AMX/ACC), piperacilina/tazobactam (PIP/TAZ),

aztreonam (AZT), cefuroxima axetil (CEX), ceftazidima (CFZ), ceftazidima/avibactam (CFZ/AVI), ceftriaxona (CEF), cefepima (CFP), ceftolozana/tazobactam (CZT/TAZ), ciprofloxacina (CIP), ertapenem (ERT), meropenem (MER) e tigeciclina (TIG). A interpretação dos resultados foi realizada conforme os pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST, versão 2024.

Os isolados foram classificados como multirresistentes quando não apresentaram suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais classes de antibióticos, conforme os critérios propostos por Magiorakos et al., 2012. Para essa classificação, os resultados resistentes e intermediários foram considerados não suscetíveis, mantendo-se as categorias individuais na apresentação dos resultados fenotípicos.

2.4 Sequenciamento do genoma completo e análises bioinformáticas

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do DNA foi determinada em fluorômetro Qubit (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). O sequenciamento genômico completo foi conduzido pela SeqCoast Genomics, Portsmouth, New Hampshire, EUA.

As bibliotecas genômicas foram preparadas utilizando o Illumina DNA Prep Tagmentation Kit, com índices duais exclusivos. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina NextSeq 2000, utilizando um kit de fluxo de 300 ciclos, para a obtenção de leituras pareadas de 2×150 pb. Um controle PhiX na proporção de 1–2 % foi adicionado à corrida para otimizar a chamada de bases. A demultiplexação, o trimming das leituras e as análises iniciais da corrida foram realizados com o software DRAGEN v.3.10.12, instalado no próprio equipamento.

As leituras pareadas foram montadas de novo utilizando o Shovill v.1.1.0 (<https://github.com/tseemann/shovill>), com a opção --trim para a remoção de adaptadores. O Shovill realizou a subamostragem das leituras até uma profundidade máxima de $150\times$, seguida pela correção de erros e pela montagem baseada no SPAdes (Bankevich et al., 2012). A qualidade das montagens genômicas foi avaliada utilizando o QUAST v.5.0.2 (Gurevich et al., 2013) e o CheckM v.1.2.2 (Parks et al., 2015). Foram considerados como critérios mínimos de qualidade montagens com pelo menos 90 % de completude, no máximo 5 % de contaminação, até 200 contigs e valor de N50 igual ou superior a 40.000 pb.

A identidade taxonômica dos isolados foi confirmada por meio do cálculo da identidade média de nucleotídeos (*average nucleotide identity* - ANI), utilizando o FastANI v.1.32 (Jain et al., 2018). Para a delimitação das espécies, foi adotado o limiar de ANI ≥ 95 %. Os nove genomas sequenciados foram comparados aos genomas de referência de *E. coli* K-12 substr. MG1655 (NCBI, ASM584v2) e *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* (GenBank: GCA_000240185.2).

A determinação dos *sequence types* (STs) foi baseada nos esquemas clássicos de *multilocus sequence typing* (MLST) descritos para cada espécie. Para *E. coli*, foram avaliados os genes *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA* (Wirth et al., 2006), enquanto, para *K. pneumoniae*, foram utilizados os genes *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *tonB* (Diancourt et al., 2005).

A identificação dos genes de virulência foi realizada com base no *Virulence Factor Database* (VFDB) (Liu et al., 2022). A triagem de genes associados à resistência aos antimicrobianos foi conduzida utilizando o AMRFinderPlus (Feldgarden et al., 2021), considerando-se todas as categorias de resistência antimicrobiana e adotando-se critérios mínimos de ≥ 80 % de identidade e ≥ 80 % de cobertura. Por fim, a identificação de elementos genéticos móveis foi realizada utilizando o Abricate, em associação com o banco de dados PlasmidFinder, com o objetivo de detectar replicons plasmidiais (Carattoli et al., 2014).

2.5 Metagenômica direcionada por enriquecimento de alvos

Para a análise metagenômica, 30 mL de cada amostra de esgoto bruto foram filtrados a vácuo em membranas estéreis de 0,22 μm (Millipore) e posteriormente armazenadas a -80 °C. O material genético foi recuperado por ruptura mecânica e extração automatizada com o Extracta® Kit – DNA e RNA de Patógenos MDx no equipamento Extracta® 16 (Loccus). O DNA foi quantificado no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), e sua pureza foi avaliada pelas razões de absorbância A260/280 e A260/230.

As bibliotecas foram preparadas por fragmentação do DNA, incorporação de adaptadores e índices, purificação e amplificação. Em seguida, foram quantificadas com o Qubit™ dsDNA BR Assay, normalizadas e agrupadas em *pools*. O enriquecimento direcionado foi realizado por hibridização durante 24 h com os painéis *Respiratory Pathogen ID/AMR* e *Urinary Pathogen ID/AMR* (Illumina), destinados à detecção de

patógenos e determinantes de resistência aos antimicrobianos (Illumina, 2022, 2023). Após o enriquecimento, as bibliotecas foram purificadas, quantificadas com o Qubit™ dsDNA HS Assay e avaliadas quanto à distribuição dos fragmentos no sistema Agilent 4150 TapeStation. O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 1000/2000 (Illumina), utilizando leituras pareadas.

Os arquivos FASTQ foram processados na plataforma Chan Zuckerberg ID, utilizando os módulos de metagenômica e detecção de resistência aos antimicrobianos (Kalantar et al., 2020; Lu et al., 2025). O processamento incluiu remoção de adaptadores e iniciadores, filtragem de leituras de baixa qualidade e remoção de sequências humanas. A classificação taxonômica foi realizada com os bancos NCBI NT/NR, enquanto os determinantes de resistência foram identificados pelo mapeamento das leituras contra o *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*, utilizando o *Resistance Gene Identifier* (Alcock et al., 2023).

2.6 Processamento e integração dos dados metagenômicos

Os resultados obtidos com os painéis *Respiratory Pathogen ID/AMR* (RPIP) e *Urinary Pathogen ID/AMR* (UPIP) foram analisados separadamente para cada uma das três amostras, totalizando seis bibliotecas. Para a análise taxonômica, foram utilizados os valores de *reads per million* (RPM) fornecidos pela plataforma CZ ID, considerando-se táxons selecionados do grupo ESKAPEE.

Para a análise do resistoma, as leituras atribuídas à mesma família ou mecanismo de resistência foram agrupadas e normalizadas pelo total de leituras aprovadas no controle de qualidade:

$$\text{AMR RPM} = \frac{\text{leituras atribuídas à categoria de resistência}}{\text{leituras aprovadas no controle de qualidade}} \times 10^6$$

A sobreposição com o sequenciamento do genoma completo foi avaliada em nível de família gênica ou mecanismo de resistência, considerando-se compartilhadas as categorias detectadas pela metagenômica direcionada e em pelo menos um dos nove isolados sequenciados.

2.7 Análise e visualização dos dados

As análises foram conduzidas de forma descritiva, utilizando frequências absolutas e relativas, proporções e matrizes de presença ou ausência. Para a construção

dos gráficos relacionados aos dados da metagenômica direcionada, os valores de RPM e AMR RPM foram transformados em $\log_{10}$ (valor + 1), a fim de reduzir a amplitude da distribuição e permitir a visualização conjunta de categorias com diferentes níveis de representação. As análises e a construção das figuras foram realizadas no ambiente RStudio v.2026.07.0.

3. Resultados

3.1 Suscetibilidade fenotípica aos antibióticos e perfis combinados de resistência

Os nove isolados foram classificados como multirresistentes e, apesar da diversidade dos perfis fenotípicos, apresentaram um núcleo comum de resistência, caracterizado pela resistência a AMX/ACC, AZT, CEX, CEF e CIP em todos os isolados (9/9) (Figura 1A). A resistência à GEN foi observada em quatro *E. coli* (4/6) e duas *K. pneumoniae* (2/3), enquanto cinco *E. coli* (5/6) e duas *K. pneumoniae* (2/3) permaneceram suscetíveis à AMI. Todos os isolados foram suscetíveis a CFZ/AVI. Para PIP/TAZ, a resistência ocorreu em uma *E. coli* (1/6) e nas três *K. pneumoniae* (3/3), enquanto, para CZT/TAZ, foi restrita a duas *K. pneumoniae* (2/3). A resistência a CFP foi identificada em cinco *E. coli* (5/6) e duas *K. pneumoniae* (2/3), com suscetibilidade intermediária em ECO03 e KLEB03.

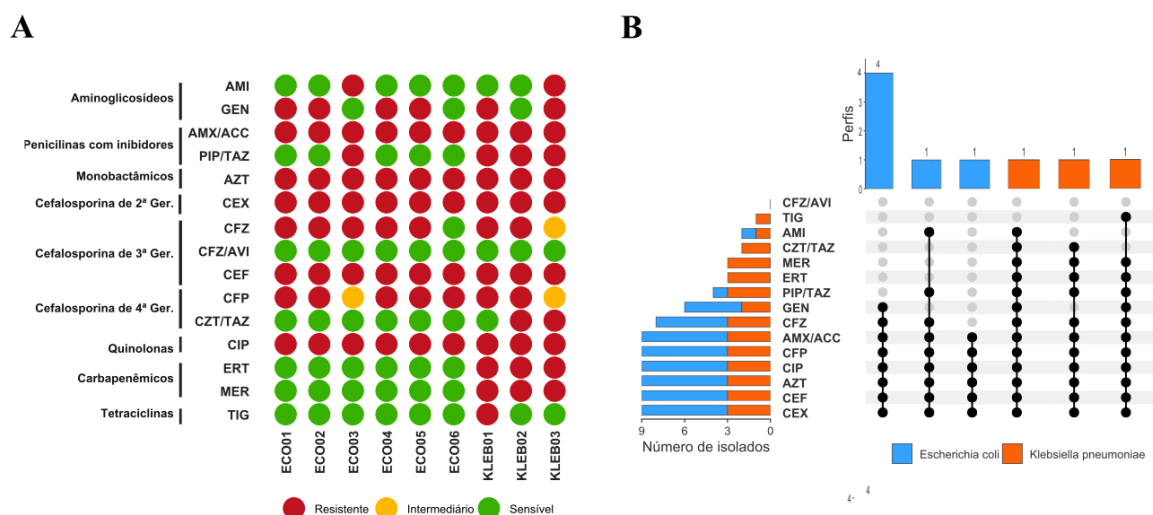


Figura 1. Suscetibilidade fenotípica aos antibióticos e perfis combinados de resistência em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. (A) Classificação dos isolados como resistentes, intermediários ou suscetíveis aos antimicrobianos avaliados. (B) Diagrama UpSet representando a frequência e a composição dos perfis de resistência. As barras verticais indicam o número de isolados por

perfil, as barras horizontais representam o número de isolados resistentes a cada antimicrobiano e os pontos conectados indicam os antimicrobianos que compõem cada perfil. Azul e laranja representam *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente. AMI, amicacina; GEN, gentamicina; AMX/ACC, amoxicilina/ácido clavulânico; PIP/TAZ, piperacilina/tazobactam; AZT, aztreonam; CEX, cefuroxima axetil; CFZ, ceftazidima; CFZ/AVI, ceftazidima/avibactam; CEF, ceftriaxona; CFP, cefepima; CZT/TAZ, ceftolozana/tazobactam; CIP, ciprofloxacina; ERT, ertapenem; MER, meropenem; TIG, tigeciclina.

A análise dos perfis de resistência revelou seis perfis distintos entre os nove isolados (Figura 1B). O perfil mais frequente foi compartilhado por ECO01, ECO02, ECO04 e ECO05, enquanto os cinco perfis restantes foram observados individualmente. ECO03 e ECO06 apresentaram combinações distintas das demais *E. coli*, e cada isolado de *K. pneumoniae* exibiu um perfil próprio, diferenciado principalmente pela resposta à AMI, GEN, CZT/TAZ, TIG, CFZ e CFP.

Os perfis frente aos carbapenêmicos diferiram entre as duas espécies. Os seis isolados de *E. coli* foram suscetíveis a ERT e MER, enquanto os três isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes a ambos os antimicrobianos. A suscetibilidade à TIG foi observada em oito dos nove isolados, sendo KLEB01 o único resistente. Resultados intermediários foram observados para CFZ em KLEB03 e para CFP em ECO03 e KLEB03.

3.2 Diversidade de *sequence types* e determinantes genômicos de resistência aos antimicrobianos

A análise por MLST identificou oito *sequence types* (STs) entre os nove isolados, sendo ST648 o único compartilhado, por ECO01 e ECO02 (Figura 2). Os demais isolados de *E. coli* pertenciam aos ST10, ST90, ST1011 e ST1193, enquanto os isolados de *K. pneumoniae* foram classificados como ST48, ST3512 e ST3539. O número de genes de resistência variou de 9 a 24 por genoma, com o maior repertório em ECO03 e o menor em KLEB02.

Todos os isolados de *E. coli* apresentaram genes da família *bla*CTX-M, incluindo *bla*CTX-M-14 em ECO01 e ECO02, *bla*CTX-M-15 em ECO03 e ECO04, *bla*CTX-M-55 em ECO05 e *bla*CTX-M-27 em ECO06. O gene *bla*CMY-2 também foi detectado em ECO01 e ECO02. Entre os isolados de *K. pneumoniae*, *bla*KPC-2 foi identificado nos três genomas, enquanto KLEB01 também apresentou *bla*CTX-M-15. Outras β -

lactamases, incluindo *bla*TEM-1, *bla*OXA-1 e *bla*OXA-9, apresentaram distribuição variável.

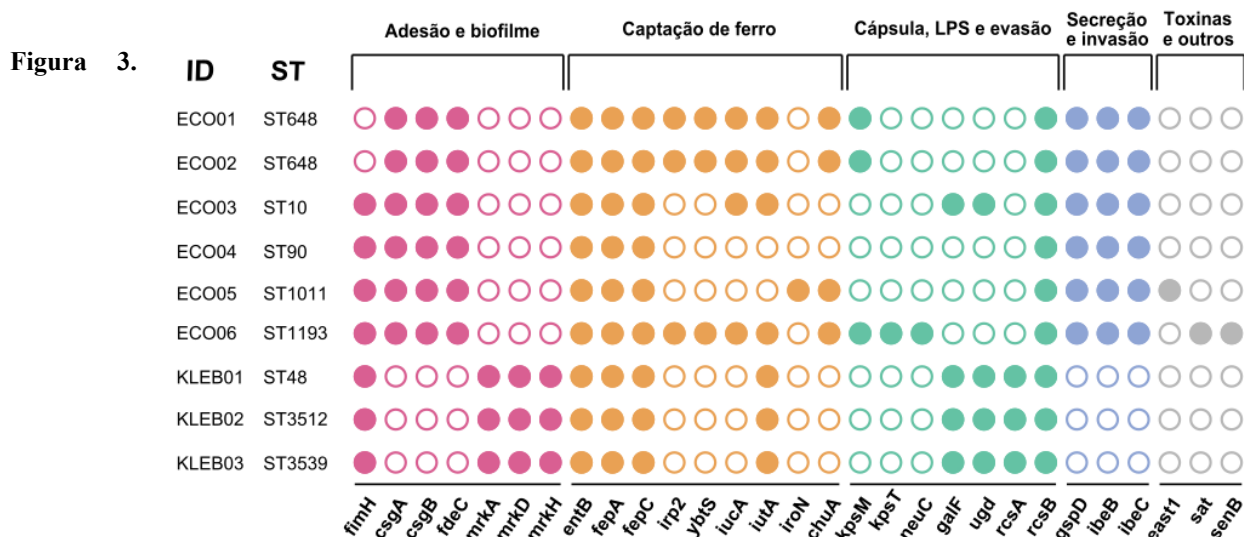
Os isolados também apresentaram diferentes combinações de genes associados à resistência a aminoglicosídeos, sulfonamidas, trimetoprim, fenicóis, macrolídeos e tetraciclina. O gene *aac*(6')-Ib-cr5 foi detectado em ECO03 e KLEB01, enquanto genes *qnr* ocorreram apenas em KLEB01 e KLEB03. Os genes de efluxo *oqx*A e *oqx*B foram identificados em KLEB02 e KLEB03. Adicionalmente, *mcr*-9.1 e *mcr*-10.1 foram detectados em KLEB02 e KLEB03, respectivamente.

Figura 2. Diversidade de *sequence types* e determinantes genômicos de resistência em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Distribuição dos *sequence types* determinados por MLST, dos genes de resistência aos antibióticos e das mutações cromossômicas associadas à resistência nos nove isolados sequenciados. ID, Identificação; ST, *sequence type*; GRA, genes de resistência aos antimicrobianos; RAM, resistência aos antimicrobianos.

Mutações cromossômicas associadas à resistência foram identificadas em todos os isolados de *E. coli*, principalmente em *gyrA*, *parC* e *parE*. Entre os isolados de *K. pneumoniae*, apenas KLEB03 apresentou uma mutação cromossômica, correspondente à substituição GyrA-D87Y.

3.3 Distribuição de genes associados à virulência

Os nove isolados apresentaram repertórios heterogêneos de genes associados à virulência, com predominância de determinantes relacionados à adesão, formação de biofilme e aquisição de ferro (Figura 3). Os genes *entB*, *fepA*, *fepC* e *rscB* foram detectados em todos os genomas. Entre os isolados de *E. coli*, *csgA*, *csgB*, *fdeC*, *gspD*, *ibeB* e *ibeC* estiveram presentes nos seis genomas, enquanto *mrkA*, *mrkD*, *mrkH* e *rscA* foram restritos a *K. pneumoniae*. O gene *fimH* foi identificado em ECO03–ECO06 e nos três isolados de *K. pneumoniae*.



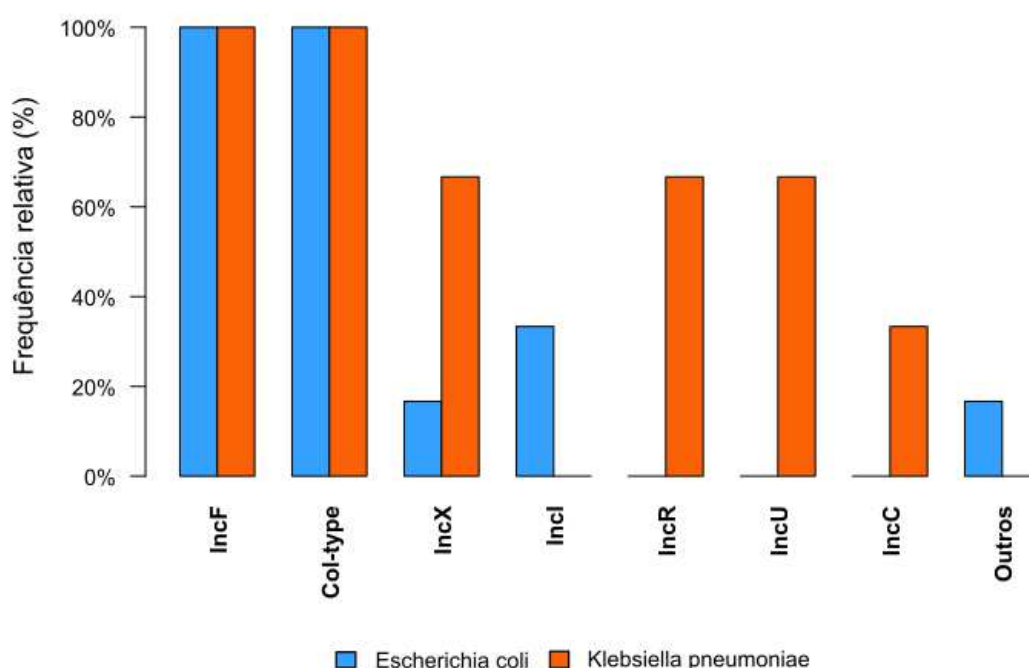
Distribuição de genes associados à virulência em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Os genes foram agrupados de acordo com as funções de adesão e biofilme, captação de ferro, cápsula/LPS e evasão, secreção e invasão, toxinas e outros fatores. Círculos preenchidos e vazios indicam presença e ausência dos genes, respectivamente. ID, Identificação; ST, *sequence type*.

Os genes *iucA* e *iutA* foram detectados em ECO01–ECO03, ECO06 e nos três isolados de *K. pneumoniae*, enquanto *irp2* e *ybtS* ocorreram em ECO01, ECO02 e ECO06. Entre os determinantes relacionados à cápsula e à evasão, *kpsM* foi identificado em ECO01, ECO02 e ECO06, com *kpsT* e *neuC* restritos a ECO06. Os genes *galF* e *ugd* foram detectados em ECO03 e nos três isolados de *K. pneumoniae*. Genes associados a toxinas apresentaram distribuição restrita, com *east1* em ECO05 e *sat* e *senB* em ECO06.

3.4 Distribuição de replicons plasmidiais

Os replicons IncF e do tipo Col foram detectados em todos os isolados de *E. coli* (6/6) e *K. pneumoniae* (3/3) (Figura 4). Entre os demais grupos, replicons IncX foram identificados em uma *E. coli* (1/6) e duas *K. pneumoniae* (2/3), enquanto IncI ocorreu em dois isolados de *E. coli* (2/6). Nos isolados de *K. pneumoniae*, IncR e IncU foram detectados em dois genomas cada (2/3), e IncC em um (1/3).

Figura 4.



Frequência dos grupos de replicons plasmidiais em isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. As barras representam a proporção de isolados de cada espécie nos quais os diferentes grupos de replicons foram detectados.

3.5 Perfil taxonômico de táxons ESKAPEE recuperados por metagenômica direcionada

A metagenômica direcionada por enriquecimento permitiu recuperar sequências atribuídas aos oito táxons selecionados do grupo ESKAPEE nas seis bibliotecas RPIP e UPIP geradas a partir das três amostras avaliadas (Figura 5). A apresentação separada dos painéis evidenciou variações na representação dos táxons entre as amostras e entre RPIP e UPIP. *E. coli* permaneceu entre os táxons mais representados em todas as bibliotecas, com valores variando entre 40.439 e 136.646 RPM. Para essa espécie, os valores foram superiores no painel UPIP nas três amostras, atingindo o máximo em A2-UIP (136.646 RPM). *K. pneumoniae* também apresentou valores elevados, especialmente em A1, tanto no painel RPIP (58.051 RPM) quanto no UPIP (64.737 RPM), enquanto valores menores foram observados em A3.

A representação das espécies do gênero *Enterobacter* variou entre as bibliotecas. *E. cloacae* apresentou seu maior valor em A1-UIP (31.535 RPM), enquanto *E. hormaechei* atingiu a maior representação em A2-RPIP (29.434 RPM). *A. baumannii* destacou-se em A2-UIP (184.526 RPM), correspondendo ao maior valor observado entre todos os táxons e bibliotecas avaliados. *P. aeruginosa* apresentou maior representação em A3, especialmente no painel UIP (37.815 RPM). Por sua vez, *E. faecium* apresentou valores comparativamente menores (2.239-7.082 RPM), enquanto *S. aureus* foi o táxon menos representado em todas as bibliotecas avaliadas (174-638 RPM).

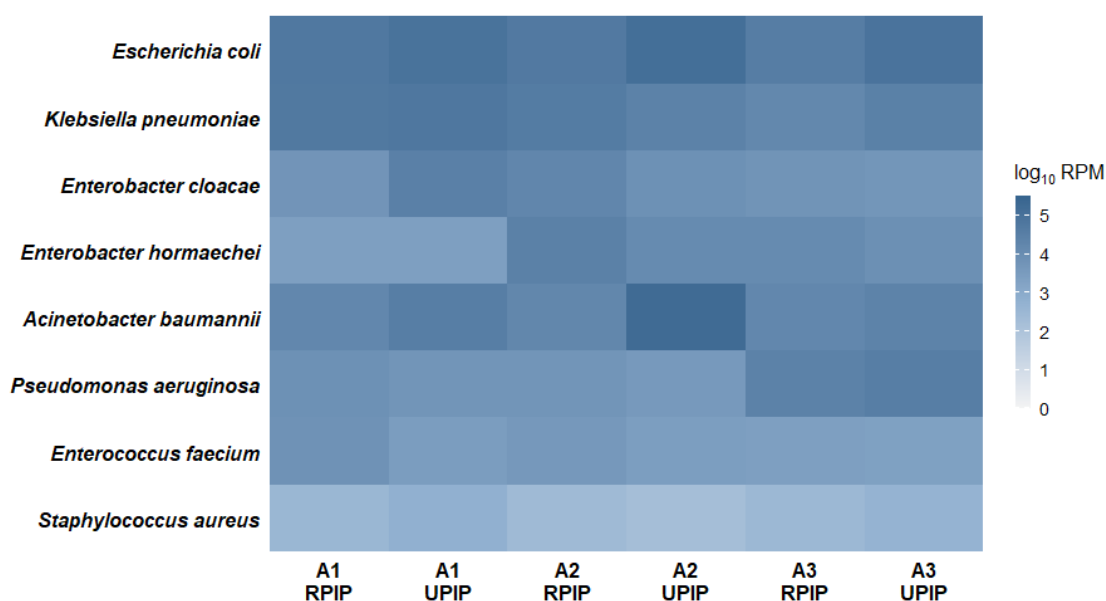


Figura 5.

Perfil taxonômico de táxons selecionados do grupo ESKAPEE recuperados por metagenômica direcionada em amostras de esgoto bruto da ETE-Uberabinha. O mapa de calor representa os valores de RPM transformados em $\log_{10}$ e apresentados separadamente nas bibliotecas RPIP e UIP geradas a partir das amostras A1, A2 e A3. A1: amostra 1 (01/12/2024); A2: amostra 2 (08/01/2025); A3: amostra 3 (02/02/2025); RPM, *reads per million*; RPIP, *Respiratory Pathogen ID/AMR Panel*; UIP, *Urinary Pathogen ID/AMR Panel*.

3.6 Resistoma recuperado por metagenômica direcionada

A metagenômica direcionada permitiu detectar 134 famílias ou categorias de determinantes associados à resistência aos antimicrobianos nas bibliotecas RPIP e UIP nas três amostras avaliadas. Desse conjunto, 30 categorias clinicamente relevantes foram selecionadas para representação e agrupadas de acordo com a classe de antimicrobianos (Figura 6). A apresentação separada dos painéis evidenciou variações na representação dessas categorias entre as amostras e entre RPIP e UIP.

Entre as categorias mais representadas, *mph* apresentou os maiores valores de AMR RPM nas seis bibliotecas (43.193-95.850 AMR RPM), atingindo o máximo em A1-UIP (95.850 AMR RPM). Valores elevados também foram observados para *blaOXA* (18.950-26.983 AMR RPM), *ANT/aad*

(13.534-33.898 AMR RPM), AAC (13.517-23.509 AMR RPM), *sul* (8.095-29.473 AMR RPM) e proteínas de proteção ribossomal (19.370-70.174 AMR RPM).

Entre as β -lactamases de relevância clínica, *blaKPC*, *blaOXA*, *blaTEM*, *blaGES* e *blaCTX-M* foram recuperadas nas seis bibliotecas. *blaNDM* apresentou variação acentuada entre os painéis, com maior representação em A2-RPIP (13.788 AMR RPM) e valor menor na respectiva biblioteca UPIP (37 AMR RPM). Para os determinantes de resistência às polimixinas, *mcr* apresentou maior representação nas bibliotecas UPIP (633-1.101 AMR RPM) em comparação às bibliotecas RPIP (2-3 AMR RPM).

Dezoito das 30 categorias selecionadas (60 %) também foram identificadas em pelo menos um dos nove isolados submetidos ao sequenciamento do genoma completo. Essa sobreposição incluiu as β -lactamases *blaCTX-M*, *blaKPC*, *blaOXA*, *blaTEM*, *blaSHV* e *blaCMY*, além de determinantes associados à resistência a quinolonas, aminoglicosídeos, sulfonamidas, trimetoprim, fenicóis, fosfomicina, polimixinas e macrolídeos. As 12 categorias restantes não foram identificadas entre os nove isolados sequenciados, embora tenham sido recuperadas diretamente das amostras pela metagenômica direcionada, entre elas, destacaram-se *blaNDM*, *blaGES* e *van*.

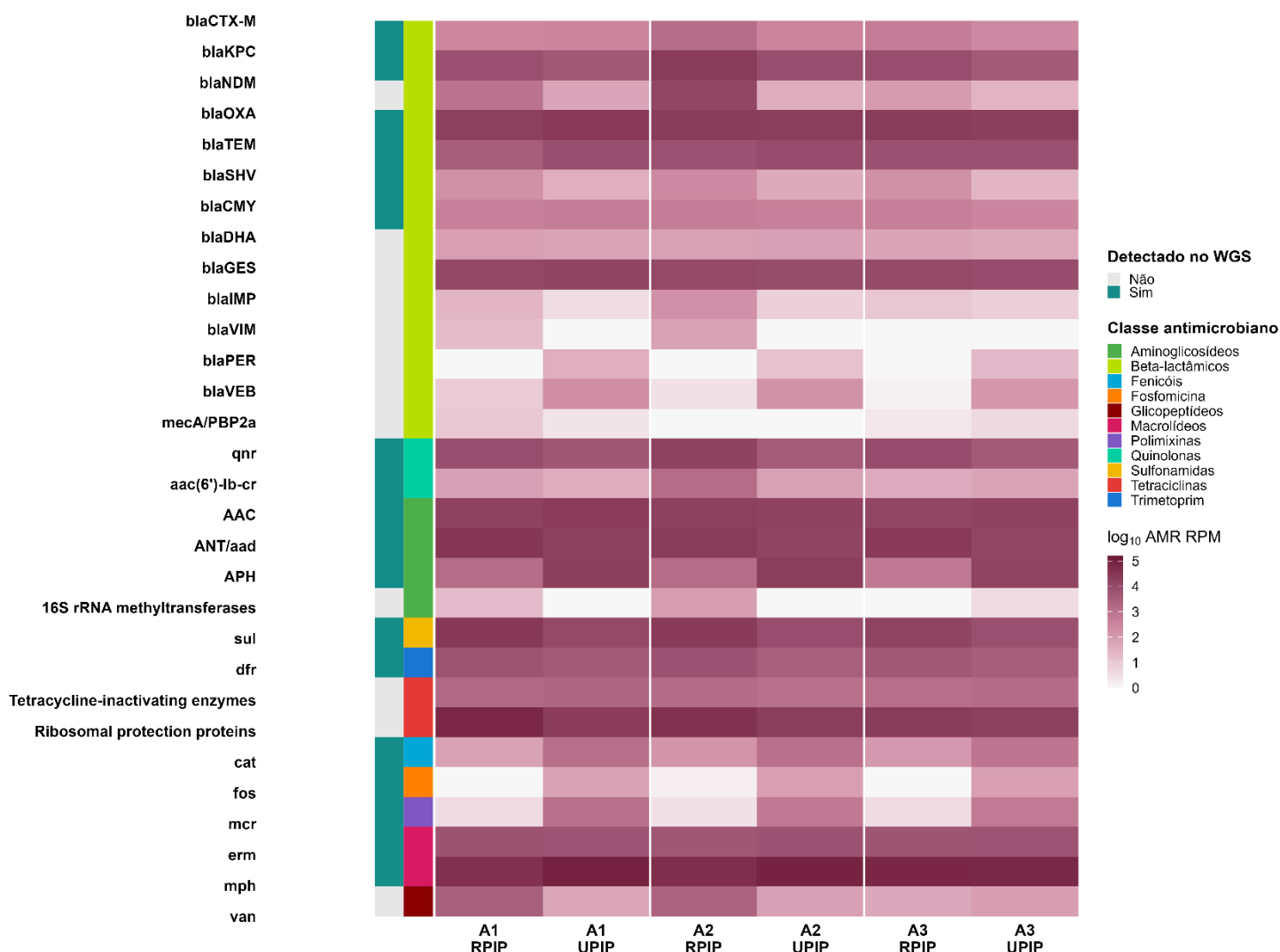


Figura 6. Resistoma recuperado por metagenômica direcionada em amostras de esgoto bruto da ETE-Uberabinha.

O mapa de calor representa os valores de AMR RPM transformados em $\log_{10}(\text{AMR RPM} + 1)$, apresentados separadamente nas bibliotecas RPIP e UPIP geradas a partir das amostras A1, A2 e A3. As barras laterais indicam a classe de antimicrobianos associada a cada categoria e sua identificação em pelo menos um dos nove isolados submetidos ao sequenciamento do genoma completo A1: amostra 1 (01/12/2024); A2: amostra 2 (08/01/2025); A3: amostra 3 (02/02/2025); AMR RPM, *reads per million* atribuídos a determinantes de resistência aos antimicrobianos; RPIP, *Respiratory Pathogen ID/AMR Panel*; UPIP, *Urinary Pathogen ID/AMR Panel*; WGS, *whole-genome sequencing*.

4. Discussão

Neste estudo, todos os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram multirresistência, com um núcleo comum de resistência a diferentes subclasses de β -lactâmicos, incluindo penicilina associada a inibidor de β -lactamase, monobactâmico e cefalosporinas de segunda e terceira gerações, além da ciprofloxacina (fluoroquinolona). Esse padrão é particularmente relevante porque reduz as opções terapêuticas para infecções causadas por Enterobacterales, envolvendo antimicrobianos de

reconhecida importância para a medicina humana e veterinária (WHO, 2024b; WOA, 2024). Entre os achados, sobressai a resistência à ceftriaxona em todos os isolados, considerando que Enterobacterales resistentes às cefalosporinas de terceira geração, assim como Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos, são classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como patógenos de prioridade crítica (WHO, 2024c). Entretanto, esse perfil compartilhado não se estendeu de forma homogênea aos β -lactâmicos de maior espectro, uma vez que os seis isolados de *E. coli* permaneceram suscetíveis ao ertapenem e ao meropenem, enquanto as três *K. pneumoniae* foram resistentes a ambos os carbapenêmicos.

A preservação da atividade dos carbapenêmicos frente a *E. coli* multirresistentes também tem sido relatada em isolados de águas residuárias, como observado em uma ETE na Alemanha, onde quase todos os 1.178 isolados de *E. coli* avaliados apresentaram multirresistência, embora a suscetibilidade ao meropenem e ao imipenem tenha permanecido elevada (Mahfouz et al., 2018). De forma semelhante, em esgoto hospitalar na Indonésia, seis isolados de *E. coli* apresentaram resistência a diferentes β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de terceira geração, além de fluoroquinolonas, mas permaneceram suscetíveis aos carbapenêmicos, além disso, entre os cinco genomas analisados, foram identificadas β -lactamases como *bla*CTX-M-15 e *bla*CMY-2, sem detecção relatada de genes de carbapenemases (Kunarisasi et al., 2025). No presente estudo, esse padrão também foi observado, uma vez que a suscetibilidade ao ertapenem e ao meropenem em *E. coli* coincidiu com a ausência de genes de carbapenemases, enquanto genes da família *bla*CTX-M foram detectados em todos os isolados.

Em contraste com o observado em *E. coli*, a resistência ao ertapenem e ao meropenem nas três *K. pneumoniae* foi acompanhada pela detecção de *bla*KPC-2 em todos os isolados. Esse achado é compatível com o cenário clínico brasileiro, *bla*KPC é considerado endêmico desde 2015 e frequente em *K. pneumoniae* entre outras Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos encaminhadas por hospitais à rede nacional de laboratórios de referência (Kiffer et al., 2023). No ambiente brasileiro, *K. pneumoniae* produtoras de KPC têm sido recuperadas de diferentes matrizes aquáticas associadas ao esgoto, incluindo efluente hospitalar, esgoto municipal e águas receptoras (Zagui et al., 2025), enquanto *bla*KPC-2 esteve entre os principais determinantes de resistência identificados em *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de ETEs do Distrito Federal (Oliveira et al., 2023). Em águas residuárias de outros países, o perfil de carbapenemases em *K. pneumoniae* variou entre os estudos. Entre os isolados selecionados para caracterização genômica na Finlândia, KPC foi a carbapenemase mais frequente, enquanto, na Alemanha, genes *bla*OXA-48-like predominaram na triagem molecular, seguidos por *bla*NDM-1 e *bla*KPC, com identificação de *bla*KPC-2 entre os isolados sequenciados (Heljanko et al., 2024; Werner et al., 2026).

A detecção de *E. coli* e *K. pneumoniae* com fenótipos de resistência clinicamente relevantes, associada à identificação de genes relacionados à produção de ESBLs e carbapenemases em esgoto bruto municipal, amplia a relevância desses achados no contexto ambiental. Outros estudos realizados em águas residuárias comunitárias também demonstraram a ocorrência de *E. coli* produtoras de ESBL e de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases, evidenciando a presença de microrganismos portadores de importantes mecanismos de resistência no esgoto comunitário (Conforti et al., 2024; Heljanko et al., 2024). Esses achados sustentam o potencial dessa matriz para a vigilância ambiental da resistência aos antimicrobianos em nível populacional.

Entre as combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamase, observou-se comportamento distinto entre os antimicrobianos avaliados. Embora todos os isolados tenham apresentado resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, a atividade da piperacilina/tazobactam foi preservada em cinco dos seis isolados de *E. coli*, sendo a resistência restrita ao ECO03. Esse isolado carregava simultaneamente *bla*CTX-M-15, *bla*OXA-1 e *bla*TEM-1, enquanto ECO04, também portador de *bla*CTX-M-15 e *bla*TEM-1, porém sem *bla*OXA-1, permaneceu sensível à associação. Embora o número reduzido de isolados não permita estabelecer uma relação causal, esse contraste é consistente com estudos que associaram a presença de OXA-1 ao aumento das concentrações inibitórias de piperacilina/tazobactam e à redução de sua atividade frente a *E. coli* produtoras de ESBL, particularmente no contexto da presença do gene CTX-M-15 (Kamau et al., 2026; Walkty et al., 2021).

Em *K. pneumoniae* observou-se um perfil distinto, com resistência à piperacilina/tazobactam nos três isolados, concomitantemente à presença de *bla*KPC-2. Entretanto, a resistência fenotípica à ceftolozana/tazobactam foi observada apenas em KLEB02 e KLEB03, apesar da presença desse gene nos três isolados. A redução da atividade de ceftolozana/tazobactam frente a *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 também têm sido observada em estudos de vigilância, incluindo dados recentes provenientes do Brasil (Bittencourt et al., 2025). A suscetibilidade apresentada por KLEB01, contudo, evidencia que a presença de uma β -lactamase, isoladamente, não permite predizer de maneira absoluta a resposta fenotípica a diferentes associações com inibidores. De fato, diferenças na expressão de β -lactamases e na permeabilidade da membrana externa podem contribuir para variações nas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), mecanismos que não são completamente inferidos pela simples detecção de genes de resistência por WGS (Maclean et al., 2024).

Em contraste, todos os nove isolados permaneceram suscetíveis à ceftazidima/avibactam, incluindo os três isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 e os seis isolados de *E. coli*. Esse achado é consistente com a elevada atividade descrita para essa combinação frente a Enterobacterales produtores de KPC-2, para os quais Kang et al. (2024) observaram susceptibilidade em 184 de 186

(98,9 %) isolados. Entre *E. coli*, a susceptibilidade observada também é compatível com a atividade do avibactam frente a ESBLs e AmpC, incluindo CMY-2, cuja inibição já foi demonstrada experimentalmente (Papp-Wallace et al., 2014). Embora variantes de CMY associadas à redução da susceptibilidade à ceftazidima/avibactam tenham sido descritas, estas apresentam alterações estruturais em relação à CMY-2 convencional, evidenciando que a atividade da combinação pode variar de acordo com a variante enzimática envolvida (Jousset et al., 2026).

A resistência à ciprofloxacina, observada em todos os isolados, apresentou bases genéticas distintas entre as espécies. Em *E. coli*, o fenótipo coincidiu com a ocorrência recorrente das substituições GyrA S83L e D87N e ParC S80I, alterações localizadas nas regiões determinantes de resistência às quinolonas e frequentemente associadas à resistência de alto nível. Padrão semelhante foi previamente identificado em *E. coli* resistentes à ciprofloxacina provenientes de águas residuárias urbanas (Alouache et al., 2014) e continua sendo observado em estudos genômicos recentes em diferentes contextos de Uma Só Saúde (Seo et al., 2026). Em *K. pneumoniae*, entretanto, verificou-se maior heterogeneidade dos mecanismos associados às quinolonas, incluindo determinantes plasmidiais *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *oqxAB*, além de alteração em *gyrA* em KLEB03. A ocorrência desses mecanismos em *K. pneumoniae* resistentes às fluoroquinolonas tem sido demonstrada tanto em estudos genômicos de larga escala quanto em águas residuárias, nos quais *qnrB* e, mais recentemente, *qnrEI* também foram identificados (Ballén et al., 2026; Zhang et al., 2026).

A contribuição desses determinantes, contudo, não parece ser equivalente. Genes PMQR geralmente promovem reduções de susceptibilidade de menor magnitude quando presentes isoladamente, podendo atuar de forma aditiva com mutações cromossômicas e mecanismos de efluxo (Zhang et al., 2026). Nesse contexto, a detecção de *oqxAB* em KLEB02 e KLEB03 é compatível com uma possível contribuição do efluxo para o fenótipo, embora sua presença genômica não permita inferir hiperexpressão, uma vez que a atividade dessas bombas depende também de mecanismos regulatórios (Gravey et al., 2024).

Entre os aminoglicosídeos, a maior atividade da amicacina em relação à gentamicina apresentou correspondência com o perfil das acetiltransferases identificadas. A resistência à gentamicina predominou entre os isolados portadores de *aac(3)-II*, enquanto a susceptibilidade à amicacina foi majoritariamente preservada, em concordância com evidências experimentais em *E. coli*, demonstrando que AAC(3)-II confere resistência à gentamicina, enquanto a susceptibilidade à amicacina permanece preservada (Plattner et al., 2022). Em contraste, ECO03, na ausência de *aac(3)-II* e portador de *aac(6')-Ib-cr5*, apresentou resistência à amicacina e susceptibilidade à gentamicina, perfil compatível com o diferente espectro de substrato das enzimas AAC(6'). A presença desse mesmo determinante em KLEB01, entretanto, não foi acompanhada de resistência à amicacina,

indicando que sua detecção isolada não determina necessariamente o fenótipo, uma vez que seu impacto pode variar em função da expressão e do número de cópias do gene (Dulyayangkul et al., 2024). KLEB03, por sua vez, apresentou resistência simultânea à amicacina e à gentamicina e carregava *aac(6')-Ib*. Embora esse determinante seja compatível com o comprometimento da amicacina, a resistência concomitante à gentamicina sugere a participação de mecanismos adicionais ou de diferenças funcionais entre variantes dessa família enzimática (Plattner et al., 2022).

A resistência à tigeciclina foi restrita a KLEB01. Embora esse isolado carregasse *tet(A)*, esse determinante está predominantemente associado à resistência às tetraciclinas e não permite, isoladamente, explicar o fenótipo observado. Em *K. pneumoniae*, mecanismos adicionais relacionados à hiperatividade de sistemas de efluxo, particularmente AcrAB-TolC e sua regulação pela via RamR-RamA, têm sido demonstrados experimentalmente em isolados resistentes à tigeciclina (Li et al., 2025b; Xia et al., 2024). Assim, o perfil de KLEB01 pode refletir mecanismos não evidenciados pela análise de presença ou ausência dos determinantes de resistência avaliados.

A análise por MLST evidenciou elevada heterogeneidade entre os isolados sequenciados, com oito STs identificados entre os nove genomas avaliados, indicando que a multirresistência observada não esteve restrita a um único perfil clonal. Elevada diversidade de STs também tem sido observada entre *E. coli* recuperadas de águas residuárias, inclusive em estudos com número reduzido de genomas (Kunarisasi et al., 2025). Entre *E. coli*, destacaram-se ST10, ST648 e ST1193, linhagens amplamente disseminadas e previamente identificadas em diferentes hospedeiros e compartimentos na interface *One Health* (Fuga et al., 2022; Lübcke et al., 2024; Watt et al., 2025). ST10 apresenta distribuição entre hospedeiros humanos, animais e ambientes e foi recentemente identificado em água doce no Brasil entre isolados MDR produtores de CTX-M. Essa elevada diversidade clonal reforça a hipótese de múltiplas fontes de contaminação convergindo para a matriz de esgoto bruto, compatível com a natureza coletiva e heterogênea da amostra populacional captada pela EBE. (Gaino et al., 2026).

Além disso, entre essas linhagens, ST648 e ST1193 merecem particular atenção. ST648 é reconhecido como uma linhagem emergente e generalista, associada à multirresistência e à presença de fatores de virulência, com ocorrência documentada em diferentes hospedeiros e origens (Schaufli et al., 2019). No presente estudo, ECO01 e ECO02, ambos ST648, apresentaram elevada similaridade fenotípica e genômica, além da coexistência de determinantes de resistência e genes associados à aquisição de ferro, adesão e evasão bacteriana. ST1193, por sua vez, constitui uma linhagem de alto risco de disseminação global, frequentemente associada a *E. coli* patogênica extraintestinal e, particularmente, à resistência às fluoroquinolonas e a infecções urinárias e da corrente sanguínea (Pitout et al., 2022).

Os três isolados do complexo *K. pneumoniae* pertenciam a STs distintos (ST48, ST3512 e ST3539), indicando heterogeneidade genética no conjunto avaliado. Apesar disso, todos apresentaram resistência ao ertapenem e ao meropenem e carregavam *blaKPC-2*, demonstrando a ocorrência desse determinante em diferentes linhagens. Entre os STs identificados, ST48 merece destaque por sua distribuição internacional e associação com isolados clínicos humanos, incluindo linhagens multirresistentes e produtoras de carbapenemases (Marcade et al., 2013; Nguyen et al., 2026). A recuperação dessas linhagens em esgoto bruto municipal amplia a relevância epidemiológica dos achados, ao evidenciar a presença, em uma matriz não clínica, de linhagens de Enterobacterales reconhecidas por sua importância clínica ou por carregarem determinantes de resistência de elevada relevância.

Além da multirresistência, a caracterização do viruloma revelou a conservação de atributos potencialmente relacionados à colonização e à adaptação bacteriana entre linhagens geneticamente distintas. A ampla ocorrência de determinantes associados à adesão, formação de biofilme e aquisição de ferro é particularmente relevante no contexto ambiental, pois essas funções podem favorecer tanto a interação com o hospedeiro quanto o estabelecimento bacteriano em superfícies e comunidades aderidas. Entre *E. coli*, a conservação de *csgA*, *csgB* e *fdeC* evidencia um repertório genético associado à adesão e ao biofilme. Particularmente, *csgA* e *csgB* estão envolvidos na formação das fibras curli, que participam da agregação celular e da organização da matriz do biofilme. A maior capacidade de formação de biofilme também tem sido relacionada à persistência de *E. coli* em comunidades aderidas de ambientes aquáticos (Moreira et al., 2012). Estudos recentes reforçam essa relevância ao demonstrarem a coexistência de determinantes de resistência, adesão e virulência em *E. coli* ambientais e sua capacidade de colonização em biofilmes associados a superfícies aquáticas (Ballesté et al., 2024; Saini et al., 2024).

Em *K. pneumoniae*, a conservação de *mrkA*, *mrkD* e *mrkH* nos três genomas merece particular atenção. O sistema *mrk* codifica fimbrias tipo 3 envolvidas na adesão e formação de biofilme, cuja expressão é regulada por MrkH, como demonstrado mecanisticamente (Wilksch et al., 2011). Evidências recentes confirmam que a modulação de MrkH interfere na expressão de *mrkA*, na produção de fimbrias e no desenvolvimento do biofilme (Wilksch et al., 2025), enquanto determinantes desse sistema também têm sido descritos em *K. pneumoniae* resistentes provenientes de águas residuárias e ETEs, inclusive entre isolados com elevada capacidade fenotípica de formação de biofilme (Aworh et al., 2026). Assim, a conservação desses atributos em Enterobacterales multirresistentes recuperadas de esgoto bruto sugere características potencialmente favoráveis à persistência fora do hospedeiro, ampliando sua relevância ambiental e epidemiológica. Contudo,

como a formação de biofilme não foi avaliada fenotipicamente, esses achados indicam potencial genético associado à adesão e persistência, e não a demonstração direta desse fenótipo.

A análise dos replicons plasmidiais revelou diferentes grupos entre os isolados, incluindo IncF e Col-type em todos os genomas e uma distribuição variável de IncX, IncI, IncR, IncU e IncC. A presença desses elementos é particularmente relevante considerando o papel dos plasmídios na disseminação horizontal de genes de resistência. Em *E. coli* provenientes de águas residuárias, estudos com plasmídios completamente resolvidos e ensaios de conjugação demonstraram que plasmídios IncF e IncI podem carrear genes de ESBL e transferir determinantes de resistência entre bactérias, incluindo genes da família *bla*CTX-M (Cheney et al., 2024; Justh de Neczpal et al., 2026). Entre *K. pneumoniae*, a participação de plasmídios na disseminação de carbapenemases também tem sido demonstrada em ambientes associados ao esgoto, com a identificação de plasmídios IncFII-IncR e IncC associados à disseminação de *bla*KPC-2 e *bla*NDM em hospitais, ETEs e ambientes aquáticos (Zou et al., 2023).

No Brasil, Furlan et al. (2025) caracterizaram *K. pneumoniae* ST258 recuperada de ETE com uma variante de *bla*KPC-2 associada a um plasmídio IncFIB(pQil)/IncFII(K). De forma semelhante, em isolados do complexo *K. pneumoniae* provenientes de diferentes etapas da rota das águas residuárias, o número de genes de resistência potencialmente transferíveis esteve associado aos tipos de plasmídios detectados (Verburg et al., 2024). Assim, a ocorrência desses replicons nos isolados multirresistentes recuperados do esgoto bruto reforça a importância desses elementos móveis na dinâmica da resistência aos antimicrobianos. Entretanto, como a análise realizada em nosso estudo se limitou à detecção de replicons, não foi possível determinar a localização dos genes de resistência em plasmídios específicos nem inferir sua capacidade de transferência.

Enquanto a caracterização baseada em cultivo e WGS se concentrou nos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*, a metagenômica direcionada ampliou a investigação para outros patógenos de relevância clínica presentes nas mesmas amostras de esgoto bruto. Sequências atribuídas aos oito táxons ESKAPEE avaliados foram recuperadas nas bibliotecas RPIP e UPIP, com *E. coli* entre os táxons mais representados e elevada representação de *K. pneumoniae*, além da detecção de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. faecium* e *S. aureus*. A aplicabilidade desse tipo de abordagem à vigilância ambiental já foi demonstrada com o próprio painel RPIP em águas residuárias, permitindo a caracterização simultânea da comunidade microbiana e de marcadores de resistência em amostras de uma ETE e de uma instalação comunitária (Harrington et al., 2022). Embora o UPIP e o RPIP tenham sido aplicados principalmente a amostras urinárias e respiratórias, respectivamente, abordagens baseadas em enriquecimento por hibridização também apresentam potencial para investigação de matrizes ambientais complexas, como águas residuárias. O UPIP

permitiu identificar uma diversidade de microrganismos superior à recuperada exclusivamente por cultura em amostras urinárias, enquanto o RPIP associado à análise pelo CZ ID possibilitou a detecção simultânea de diferentes patógenos e determinantes de resistência em amostras respiratórias (Almas et al., 2023; Shamim et al., 2024). Nesse contexto, o enriquecimento direcionado amplia a investigação para microrganismos não contemplados pelo cultivo seletivo e pode favorecer a detecção de alvos pouco representados na metagenômica não direcionada.

A maior amplitude da metagenômica direcionada também foi evidente na caracterização do resistoma. Das 30 categorias de resistência selecionadas, 18 (60 %) também foram identificadas em pelo menos um dos nove isolados sequenciados, incluindo importantes famílias de β -lactamases como *bla*CTX-M, *bla*KPC, *bla*OXA, *bla*TEM, *bla*SHV e *bla*CMY. Entretanto, outras 12 categorias foram recuperadas somente pela análise direta das amostras, entre elas *bla*NDM e *bla*GES, demonstrando que a caracterização de isolados representou apenas parte do reservatório de resistência presente no esgoto. O aumento da capacidade de detecção de ARGs por enriquecimento direcionado também foi demonstrado em águas residuárias hospitalares, nas quais a captura híbrida apresentou maior sensibilidade que a metagenômica convencional para determinantes clinicamente relevantes, incluindo *bla*CTX-M, *bla*IMP e *vanB* (Baba et al., 2023).

De forma semelhante, estudos com metagenômica direcionada em outras matrizes demonstram que o enriquecimento por hibridização concentra o sequenciamento em alvos previamente selecionados e pode aumentar sua representação, favorecendo a detecção de patógenos e determinantes de resistência de interesse (Gaston et al., 2022; Santarelli et al., 2026). Particularmente, a detecção de *bla*NDM e *bla*GES exclusivamente pela metagenômica, amplia a relevância epidemiológica do resistoma recuperado. *bla*NDM constitui um determinante de resistência aos carbapenêmicos de elevada importância clínica, cuja ocorrência em águas residuárias tem sido demonstrada em diferentes contextos e reforça o potencial dessa matriz para sua vigilância (Acosta et al., 2025). A detecção de *bla*GES também merece destaque, uma vez que variantes dessa família com atividade de carbapenemase têm sido descritas em diferentes bactérias recuperadas de águas residuárias e associadas a elementos genéticos móveis (Tanabe et al., 2023). Assim, a identificação desses determinantes exclusivamente na análise metagenômica evidencia a capacidade dessa abordagem de revelar sinais de resistência clinicamente relevantes que podem permanecer sub-representados em estratégias baseadas no cultivo de grupos bacterianos específicos.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A avaliação de três amostras provenientes de uma única ETE e o número reduzido de isolados submetidos ao WGS limitam a extrapolação da diversidade observada. Além disso, o cultivo seletivo direcionado a *E. coli* e *K. pneumoniae* não contempla toda a diversidade de patógenos

prioritários potencialmente presentes no esgoto. Na metagenômica direcionada, diferenças na composição das sondas e na eficiência de captura dos painéis RPIP e UPIP também podem influenciar a representação relativa dos alvos detectados. Apesar dessas limitações, a combinação das abordagens possibilitou explorar diferentes dimensões da RAM nas mesmas amostras de esgoto bruto.

A integração entre cultivo, WGS e metagenômica direcionada revelou diferentes dimensões da resistência aos antimicrobianos presentes no esgoto bruto municipal. A caracterização dos isolados evidenciou *E. coli* e *K. pneumoniae* multirresistentes, pertencentes a diferentes linhagens e portadoras de determinantes de resistência e virulência, enquanto a análise direta da matriz ampliou a detecção para outros patógenos prioritários e para um resistoma mais abrangente. A complementaridade entre essas abordagens reforça o potencial do esgoto como fonte de informação para a vigilância da RAM em nível populacional. Nesse contexto, os dados obtidos em Uberlândia contribuem para o fortalecimento da vigilância ambiental da resistência aos antimicrobianos no Brasil e podem subsidiar a ampliação de estratégias integradas de monitoramento sob a perspectiva de Uma Só Saúde.

Declaração ética

Este estudo utilizou exclusivamente amostras de esgoto bruto coletadas na etapa preliminar de tratamento em estação de tratamento de esgoto municipal, sem envolvimento de participantes humanos individuais ou de dados pessoais identificáveis. A coleta foi autorizada pelo órgão operador da estação (DMAE-Uberlândia). Não se aplicam, portanto, os requisitos de aprovação ética para pesquisa com seres humanos previstos pelo periódico.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Financiamento

Este estudo é parte do projeto 409031/2022-4 – Rede de Vigilância da Resistência aos Antimicrobianos no Esgoto ReVIRAE financiado pelo CNPq.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados de sequenciamento gerados neste estudo (genomas de *E. coli* e *K. pneumoniae* obtidos por sequenciamento do genoma completo e dados brutos da metagenômica direcionada) serão depositados em repositório público (NCBI/SRA) mediante aceite do manuscrito, e os números de acesso serão fornecidos na versão final. Até lá, os dados estão disponíveis mediante solicitação ao autor correspondente.

Referências

- Acosta, N., Lee, J., Bautista, M.A., Bhatnagar, S., Li, C., Waddell, B.J., Au, E., Pradhan, P., Clark, R.G., Meddings, J., Achari, G., Pitout, J.D., Conly, J., Frankowski, K., Hubert, C.R.J., Parkins, M.D., 2025. Metagenomic analysis after selective culture enrichment of hospital and community wastewater enhances antimicrobial resistance gene detection. *mBio* 16, e01672-25. <https://doi.org/10.1128/mbio.01672-25>
- Alcock, B.P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K.W., Raphenya, A.R., Wlodarski, M.A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S.A., Tsang, K.K., Baker, S.J.C., Dave, M., McCarthy, M.C., Mukiri, K.M., Nasir, J.A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., Kwong, M., Liang, Z.C., Niu, K.C., Shan, P., Yang, J.Y.J., Gray, K.L., Hoad, G.R., Jia, B., Bhando, T., Carfrae, L.A., Farha, M.A., French, S., Gordzevich, R., Rachwalski, K., Tu, M.M., Bordeleau, E., Dooley, D., Griffiths, E., Zubyk, H.L., Brown, E.D., Maguire, F., Beiko, R.G., Hsiao, W.W.L., Brinkman, F.S.L., Van Domselaar, G., McArthur, A.G., 2023. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* 51, D690–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Almas, S., Carpenter, R.E., Rowan, C., Tamrakar, V.K., Bishop, J., Sharma, R., 2023. Advantage of precision metagenomics for urinary tract infection diagnostics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1221289. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1221289>
- Alouache, S., Estepa, V., Messai, Y., Bakour, R., 2014. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microb. Drug Resist.* 20, 30–38.
- Aworh, M.K., et al., 2026. Interconnected reservoirs: virulence & biofilm traits of ESBL-*Klebsiella pneumoniae* in municipal wastewater & agricultural systems. *Microorganisms* 14, 1435.
- Baba, H., Kuroda, M., Sekizuka, T., Kanamori, H., 2023. Highly sensitive detection of antimicrobial resistance genes in hospital wastewater using the multiplex hybrid capture target enrichment. *mSphere* 8, e00100-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00100-23>
- Baird, R.B., Eaton, A.D., Rice, E.W. (Eds.), 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Ballén, V., Mondéjar, L., Gabasa, Y., Castellsagués, L., Alcalde-Rico, M., Pinar-Méndez, A., Vilaró, C., Galofré, B., Soto, S.M., 2025. Integrated metagenomic, culture-based, and whole genome sequencing analyses of antimicrobial resistance in wastewater and drinking water treatment plants in Barcelona, Spain. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 270, 114664. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2025.114664>
- Ballén, V., et al., 2026. Emergence and persistence of ESBL- and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*-related species in Barcelona wastewater treatment plants. *Microbiol. Spectr.* 14 (8).
- Ballesté, E., Liang, H., Migliorato, L., Sala-Comorera, L., Méndez, J., García-Aljaro, C., 2024. Exploring plastic biofilm formation and *Escherichia coli* colonisation in marine environments. *Environ. Microbiol. Rep.* 16, e13308. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13308>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bittencourt, A.A., Faustino, V.L., Batista, P.M., Leonel, L.P., Paula, M.D.N., Polis, T.J., 2025. Activity of ceftolozane/tazobactam and comparators against gram-negative bacilli: results from the

Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART – Brazil), 2018-2021. *Braz. J. Infect. Dis.* 29, 104497. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2024.104497>

Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M.V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F.M., Hasman, H., 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/aac.02412-14>

Cheney, C., Johnson, J.D., Ste. Marie, J.P., Gacosta, K.Y.M., Denlinger Drumm, N.B., Jones, G.D., Waite-Cusic, J., Navab-Daneshmand, T., 2024. Resolved genomes of wastewater ESBL-producing *Escherichia coli* and metagenomic analysis of source wastewater samples. *Microbiol. Spectr.* 12, e00717-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00717-24>

Conforti, S., Holschneider, A., Sylvestre, É., Julian, T.R., 2024. Monitoring ESBL-*Escherichia coli* in Swiss wastewater between November 2021 and November 2022: insights into population carriage. *mSphere* 9, e00760-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00760-23>

Conforti, S., Pruden, A., Acosta, N., Anderson, C., Buergermann, H., Calabria De Araujo, J., Cristobal, J.R., Drigo, B., Ellison, C., Francis, Z., Frigon, D., Gaenzle, M., Vierheilig, J., Julian, T.R., Klümper, U., Ma, L., Mangat, C., Nadimpalli, M., Nakashita, M., Osen, G., Rathinavelu, S., Reid-Smith, R., Saldana, M., Schmitt, H., Li, S., Singer, A.C., Tran, T.T., Yanac, K., Ybazeta, G., Harnisz, M., 2025. Strengthening policy relevance of wastewater-based surveillance for antimicrobial resistance. *Environ. Sci. Technol.* 59, 2339–2343. <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c09663>

Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A.D., Brisse, S., 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4178–4182. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005>

DMAE – Departamento Municipal de Água e Esgoto – Prefeitura Municipal de Uberlândia, 2025. Tratamento de esgoto em Uberlândia. Available at: <https://www.uberlandia.mg.gov.br/prefeitura/orgaos-municipais/dmae/tratamento-de-esgoto/ete-uberabinha/> (accessed 30 September 2025)

Dulyayangkul, P., Beavis, T., Lee, W.W.Y., Ardagh, R., Edwards, F., Hamilton, F., Head, I., Heesom, K.J., Mounsey, O., Murarik, M., Pinweha, P., Reding, C., Satapoomin, N., Shaw, J.M., Takebayashi, Y., Tooke, C.L., Spencer, J., Williams, P.B., Avison, M.B., 2024. Harvesting and amplifying gene cassettes confers cross-resistance to critically important antibiotics. *PLoS Pathog.* 20, e1012235. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012235>

Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J.G., Haendiges, J., Haft, D.H., Hoffmann, M., Pettengill, J.B., Prasad, A.B., Tillman, G.E., Tyson, G.H., Klimke, W., 2021. AMRFinderPlus and the reference gene catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci. Rep.* 11, 12728. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>

Fuga, B., Sellera, F.P., Cerdeira, L., Esposito, F., Cardoso, B., Fontana, H., Moura, Q., Cardenas-Arias, A., Sano, E., Ribas, R.M., Carvalho, A.C., Tognim, M.C.B., Morais, M.M.C., Quaresma, A.J.P.G., Santana, Â.P., Reis, J.N., Pilonetto, M., Vespero, E.C., Bonelli, R.R., Cerqueira, A.M.F., Sincero, T.C.M., Lincopan, N., 2022. WHO critical priority *Escherichia coli* as *One Health* challenge for a post-pandemic scenario: genomic surveillance and analysis of current trends in Brazil. *Microbiol. Spectr.* 10, e01256-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01256-21>

Furlan, J.P.R., Bueno, G.C., Sousa-Carmo, R.R., Silva, R.L.O., Barbosa, M.R.F., Sato, M.I.Z., Brunetti, F., Power, P., Lincopan, N., Schenkman, S., 2025. KPC-157 and KPC-181

- carbapenemases produced by *Citrobacter freundii* ST522 and *Klebsiella pneumoniae* ST258 isolated from wastewater. *Mol. Biol. Rep.* 52, 705. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-10801-y>
- Gaino, R., Haisi, A., Araújo Jr., J.P., Guillen, A., Sellera, F.P., Heinemann, M.B., Gaeta, N.C., 2026. Global clones of *Escherichia coli* CTX-M-15/ST10 and CTX-M-65/ST683 isolated from Brazilian recreational freshwater. *Curr. Microbiol.* 83, 205. <https://doi.org/10.1007/s00284-026-04790-9>
- Gaston, D.C., Miller, H.B., Fissel, J.A., Jacobs, E., Gough, E., Wu, J., Klein, E.Y., Carroll, K.C., Simner, P.J., 2022. Evaluation of metagenomic and targeted next-generation sequencing workflows for detection of respiratory pathogens from bronchoalveolar lavage fluid specimens. *J. Clin. Microbiol.* 60, e00526-22. <https://doi.org/10.1128/jcm.00526-22>
- Gravey, F., Michel, A., Langlois, B., Gérard, M., Galopin, S., Du Cheyron, D., Fazilleau, L., Brossier, D., Guérin, F., Giard, J.-C., Le Hello, S., 2024. Central role of the ramAR locus in the multidrug resistance in ESBL-Enterobacterales. *Microbiol. Spectr.* 12, e03548-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03548-23>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29, 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Harrington, A., Vo, V., Papp, K., Tillett, R.L., Chang, C.-L., Baker, H., Shen, S., Amei, A., Lockett, C., Gerrity, D., Oh, E.C., 2022. Urban monitoring of antimicrobial resistance during a COVID-19 surge through wastewater surveillance. *Sci. Total Environ.* 853, 158577. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158577>
- Heljanko, V., Tyni, O., Johansson, V., Virtanen, J.-P., Räisänen, K., Lehto, K.-M., Lipponen, A., Oikarinen, S., Pitkänen, T., WastPan Study Group, Heikinheimo, A., 2024. Clinically relevant *sequence types* of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* detected in Finnish wastewater in 2021–2022. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 13, 14. <https://doi.org/10.1186/s13756-024-01370-z>
- Hock, L., Luiken, R., Valério, E., Vargha, M., Vierheilig, J., Börjesson, S., Pitkänen, T., Schmitt, H., 2026. Integrating AMR surveillance into wastewater monitoring systems in 2025: a position on the implementation of Article 17 of the Urban Wastewater Treatment Directive (UWWTD). *Euro Surveill.* 31, 2500289. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2026.31.3.2500289>
- Illumina, 2022. UPIP full feature demo report. Available at: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/urinary-pathogen-id-amr-enrichment-kit.html> (accessed 19 June 2026)
- Illumina, 2023. Illumina Respiratory Pathogen ID/AMR Panel Table. Available at: <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/respiratory-pathogen-id-panel.html> (accessed 19 June 2026)
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2025. Uberlândia (MG) | Cidades e Estados. Available at: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mg/uberlandia.html> (accessed 15 June 2026)
- Jain, C., Rodriguez-R, L.M., Phillippy, A.M., Konstantinidis, K.T., Aluru, S., 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* 9, 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Jousset, A.B., Girlich, D., Oueslati, S., Birer, A., Delaval, A., Guyot, C., Rezzoug, I., Emeraud, C., Naas, T., Bonnin, R.A., Dortet, L., 2026. In vivo selection of CMY-219 conferring resistance to ceftazidime-avibactam in an OXA-484-producing *E. coli* ST410. *Antimicrob. Agents Chemother.* 70, e01335-25. <https://doi.org/10.1128/aac.01335-25>

- Justh de Neczpal, A., Thorell, K., Tuts, L., Rasschaert, G., Martín-Rodríguez, A.J., Joffré, E., Sjöling, Å., 2026. Antimicrobial resistance, conjugative plasmids and pathogenicity in wastewater and freshwater *Escherichia* spp. in Stockholm, Sweden. *npj Antimicrob. Resist.* 4, 32. <https://doi.org/10.1038/s44259-026-00208-5>
- Kalantar, K.L., Carvalho, T., de Bourcy, C.F.A., Dimitrov, B., Dingle, G., Egger, R., Han, J., Holmes, O.B., Juan, Y.-F., King, R., Kislyuk, A., Lin, M.F., Mariano, M., Morse, T., Reynoso, L.V., Rissato Cruz, D., Sheu, J., Tang, J., Wang, J., Zhang, M.A., Zhong, E., Ah Yong, V., Lay, S., Chea, S., Bohl, J.A., Manning, J.E., Tato, C.M., DeRisi, J.L., 2020. IDseq – an open source cloud-based pipeline and analysis service for metagenomic pathogen detection and monitoring. *GigaScience* 9, giaa111. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa111>
- Kamau, E., Wong, B.M., MacArthur, J.L., Dombach, J.L., 2026. Correlation of OXA-1 and TEM-1 genes with antibiotic resistance to piperacillin/tazobactam in ESBL-producing Enterobacterales: insights from a multi-center analysis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15, 1694724. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1694724>
- Kang, M.S., Baek, J.Y., Ko, J.-H., Cho, S.Y., Lee, K.Y., Lee, Y.H., Yang, J., Kim, T.Y., Huh, H.J., Lee, N.Y., Huh, K., Kang, C.-I., Chung, D.R., Peck, K.R., 2024. Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam against KPC-2-producing Enterobacterales: a cross-combination and dose-escalation titration study with relebactam and vaborbactam. *Microbiol. Spectr.* 12, e00344-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00344-24>
- Kiffer, C.R.V., Rezende, T.F.T., Costa-Nobre, D.T., Marinonio, A.S.S., Shiguenaga, L.H., Kulek, D.N.O., Arend, L.N.V.S., Santos, I.C.O., Sued-Karam, B.R., Rocha-de-Souza, C.M., Kraft, L., Abreu, A., Peral, R.T.S., Carvalho-Assef, A.P.D., Pilonetto, M., 2023. A 7-year Brazilian national perspective on plasmid-mediated carbapenem resistance in Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* complex and the impact of the coronavirus disease 2019 pandemic on their occurrence. *Clin. Infect. Dis.* 77 (Suppl. 1), S29–S37. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad260>
- Kunarisasi, S., Yuliandari, P., Pramono, A.K., Furqoni, A.H., Aliyah, S.H., Nurjannah, I., Thaiyibah, N., Pratama, R., Sari, N.I.P., 2025. Genomic characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from hospital wastewater in Jakarta, Indonesia. *Mol. Biol. Rep.* 52, 960. <https://doi.org/10.1007/s11033-025-11076-z>
- Li, D., Jarocki, V.M., Wyrsh, E.R., Cummins, M.L., Djordjevic, S.P., 2025a. Next generation ESKAPE-E superbugs: identifying transmissible locus of stress tolerance and antibiotic resistance in pandemic bacterial lineages. *npj Antimicrob. Resist.* 3, 91. <https://doi.org/10.1038/s44259-025-00162-8>
- Li, Y., Tang, S., Han, Q., Xia, P., Si, T., Song, Y., Xia, Y., 2025b. The investigation of molecular epidemiological characteristics and resistance mechanism of tigecycline resistant *Klebsiella pneumoniae* from a large teaching hospital in southwest China, Chongqing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15, 1540967. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1540967>
- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., Yang, J., 2022. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 50, D912–D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
- Lu, D., Kalantar, K.L., Glascock, A.L., Chu, V.T., Guerrero, E.S., Bernick, N., Butcher, X., Ewing, K., Fahsbender, E., Holmes, O., Hoops, E., Jones, A.E., Lim, R., McCanny, S., Reynoso, L., Rosario, K., Tang, J., Valenzuela, O., Mourani, P.M., Pickering, A.J., Raphenya, A.R., Alcock, B.P., MacArthur, A.G., Langelier, C.R., 2025. Simultaneous detection of pathogens and

- antimicrobial resistance genes with the open source, cloud-based, CZ ID platform. *Genome Med.* 17, 46. <https://doi.org/10.1186/s13073-025-01480-2>
- Lübcke, P., Heiden, S.E., Homeier-Bachmann, T., Bohnert, J.A., Schulze, C., Eger, E., Schwabe, M., Guenther, S., Schaufler, K., 2024. Multidrug-resistant high-risk clonal *Escherichia coli* lineages occur along an antibiotic residue gradient in the Baltic Sea. *npj Clean Water* 7, 94. <https://doi.org/10.1038/s41545-024-00394-7>
- Maclean, A.K.W., Morrow, S., Niu, F., Hanson, N.D., 2024. What contributes to the minimum inhibitory concentration? Beyond β -lactamase gene detection in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 230, e777–e788. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae204>
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mahfouz, N., Caucci, S., Achatz, E., Semmler, T., Guenther, S., Berendonk, T.U., Schroeder, M., 2018. High genomic diversity of multi-drug resistant wastewater *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 8, 8928. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27292-6>
- Mao, Y., Shisler, J.L., Nguyen, T.H., 2025. Enhanced detection for antibiotic resistance genes in wastewater samples using a CRISPR-enriched metagenomic method. *Water Res.* 274, 123056. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.123056>
- Marcade, G., Brisse, S., Bialek, S., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Passet, V., Moreau, R., Nicolas-Chanoine, M.-H., 2013. The emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of international clones ST13, ST16, ST35, ST48 and ST101 in a teaching hospital in the Paris region. *Epidemiol. Infect.* 141, 1705–1712. <https://doi.org/10.1017/S0950268812002099>
- Miller, W.R., Arias, C.A., 2024. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nat. Rev. Microbiol.* 22, 598–616. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w>
- Moreira, S., Brown, A., Ha, R., Iserhoff, K., Yim, M., Yang, J., Liao, B., Pszczolko, E., Qin, W., Leung, K.T., 2012. Persistence of *Escherichia coli* in freshwater periphyton: biofilm-forming capacity as a selective advantage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 608–618. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01244.x>
- Nguyen, N.M., et al., 2026. Genomic surveillance reveals long-term endemicity and outbreak potential of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 48 in a German hospital and its global context. *Microb. Genom.* 12.
- Oliveira, P.M., Faria-Junior, C., Silva, D.M., Matos, L.F., Pereira, A.L., 2023. Clonal complexes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from community sewage. *J. Water Health* 21, 94–108. <https://doi.org/10.2166/wh.2023.237>
- Papp-Wallace, K.M., Winkler, M.L., Gatta, J.A., Taracila, M.A., Chilakala, S., Xu, Y., Johnson, J.K., Bonomo, R.A., 2014. Reclaiming the efficacy of β -lactam– β -lactamase inhibitor combinations: avibactam restores the susceptibility of CMY-2-producing *Escherichia coli* to ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4290–4297. <https://doi.org/10.1128/AAC.02625-14>

- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 25, 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Pitout, J.D.D., Peirano, G., Chen, L., DeVinney, R., Matsumura, Y., 2022. Escherichia coli ST1193: following in the footsteps of E. coli ST131. *Antimicrob. Agents Chemother.* 66, e00511-22. <https://doi.org/10.1128/AAC.00511-22>
- Plattner, M., et al., 2022. Genotypic and phenotypic analyses of aac(3) aminoglycoside-resistance gene diversity point to three distinct phenotypes of contemporary clinical relevance. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 29, 534–536.
- Pruden, A., Vikesland, P.J., Davis, B.C., de Roda Husman, A.M., 2021. Seizing the moment: now is the time for integrated global surveillance of antimicrobial resistance in wastewater environments. *Curr. Opin. Microbiol.* 64, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.013>
- Punch, R., Azani, R., Ellison, C., Majury, A., Hynds, P., Payne, S.J., Brown, R.S., 2025. The surveillance of antimicrobial resistance in wastewater from a *One Health* perspective: a global scoping and temporal review (2014–2024). *One Health* 21, 101139. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2025.101139>
- Ramatla, T., Mafokwane, T., Lekota, K., Monyama, M., Khasapane, G., Serage, N., Nkhebenyane, J., Bezuidenhout, C., Thekisoe, O., 2023. "One Health" perspective on prevalence of co-existing extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 22, 88. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00638-3>
- Saini, P., Bandsode, V., Singh, A., Mendem, S.K., Semmler, T., Alam, M., Ahmed, N., 2024. Genomic insights into virulence, antimicrobial resistance, and adaptation acumen of Escherichia coli isolated from an urban environment. *mBio* 15, e03545-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.03545-23>
- Santarelli, G., Fiori, B., Mannavola, C.M., Rosato, R., Cafaro, G., Monzo, F.R., Sanguinetti, M., De Maio, F., 2026. From gene detection to resistome ecology: targeted hybrid capture in AMR surveillance. *mSphere* 11, e00221-26. <https://doi.org/10.1128/msphere.00221-26>
- Sati, H., Carrara, E., Savoldi, A., Hansen, P., Garlasco, J., Campagnaro, E., Boccia, S., Castillo-Polo, J.A., Magrini, E., Garcia-Vello, P., Wool, E., Gigante, V., Duffy, E., Cassini, A., Huttner, B., Ramon Pardo, P., Naghavi, M., Mirzayev, F., Zignol, M., Cameron, A., Tacconelli, E., Aboderin, A., Al Ghoribi, M., Al-Salman, J., Amir, A., Apisarnthanarak, A., Blaser, M., El-Sharif, A., Essack, S., Harbarth, S., Huang, X., Kapoor, G., Knight, G., Chakaya Muhwa, J., Monnet, D.L., Ousassa, T., Sacaquiste, R., Severin, J., Sugai, M., Taneja, N., Umubyeyi Nyaruhirira, A., 2025. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. *Lancet Infect. Dis.* 25, 1033–1043. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(25\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(25)00118-5)
- Schaufler, K., Semmler, T., Wieler, L.H., Trott, D.J., Pitout, J., Peirano, G., Bonnedahl, J., Dolejska, M., Literak, I., Fuchs, S., Ahmed, N., Grobbel, M., Torres, C., McNally, A., Pickard, D., Ewers, C., Croucher, N.J., Corander, J., Guenther, S., 2019. Genomic and functional analysis of emerging virulent and multidrug-resistant Escherichia coli lineage sequence type 648. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e00243-19. <https://doi.org/10.1128/aac.00243-19>
- Seo, Y., Kang, W., Shin, E., Park, J., Hong, M., Roh, D.-H., Kim, J., 2026. Genomic insights into ciprofloxacin-resistant enteropathogenic Escherichia coli ST752 in Republic of Korea: a *One Health* perspective on its emergence and transmission. *Antibiotics (Basel)* 15, 304. <https://doi.org/10.3390/antibiotics15030304>

Shamim, U., Yadav, A., Maurya, R., Devi, P., Kumari, P., Kanika, Khare, K., Tarai, B., Pandey, R., 2024. Functional metagenomics highlights varied infection states with dynamics of pathogens and antibiotic resistance in lower respiratory tract infections. *Heliyon* 10, e38380. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38380>

Tanabe, M., Sugawara, Y., Denda, T., Sakaguchi, K., Takizawa, S., Koide, S., Hayashi, W., Yu, L., Kayama, S., Sugai, M., Nagano, Y., Nagano, N., 2023. Municipal wastewater monitoring revealed the predominance of blaGES genes with diverse variants among carbapenemase-producing organisms: high occurrence and persistence of *Aeromonas caviae* harboring the new bla GES variant blaGES-48. *Microbiol. Spectr.* 11, e02188-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02188-23>

UNEP, 2023. Bracing for superbugs: strengthening environmental action in the *One Health* response to antimicrobial resistance. United Nations Environment Programme. Available at: <https://wedocs.unep.org/items/e06380a1-453c-4a77-811f-9bfcced60018> (accessed 8 June 2026)

Verburg, I., Hernández Leal, L., Waar, K., Rossen, J.W.A., Schmitt, H., García-Cobos, S., 2024. *Klebsiella pneumoniae* species complex: from wastewater to the environment. *One Health* 19, 100880. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100880>

Walkty, A., Karlowsky, J.A., Lagacé-Wiens, P.R.S., Golden, A.R., Baxter, M.R., Denisuik, A.J., McCracken, M., Mulvey, M.R., Adam, H.J., Zhanel, G.G., 2021. Presence of the narrow-spectrum OXA-1 beta-lactamase enzyme is associated with elevated piperacillin-tazobactam MIC values among ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates (CANWARD, 2007–2018). *Open Forum Infect. Dis.* 8 (Suppl. 1), S697. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab466.1408>

Watt, A.E., Cummins, M.L., Donato, C.M., Wirth, W., Andersson, P., Donner, E., Jennison, A.V., Seemann, T., Djordjevic, S.P., Howden, B.P., Australian Pathogen Genomics *One Health* Working Group, 2025. Parameters for *One Health* genomic surveillance of *Escherichia coli* from Australia. *Nat. Commun.* 16, 17. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-55103-2>

Werner, K.A., Bajić, V., Blumenschein, C., Baum, D., Desirő, D., Sedaghatjoo, S., Barthelmes, J., Liebschner, A.K., Förster, C., Fuchs, S., Wolf, S.A., Bethe, A., Hölzer, M., Walther, B., 2026. Linking wet-lab and genomic approaches for reliable detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in wastewater. *Front. Microbiol.* 17, 1821458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2026.1821458>

WHO, 2024a. Action against antimicrobial resistance through the preservation of the environment. World Health Organization Regional Office for Europe. Available at: <https://www.who.int/europe/publications/i/item/WHO-EURO-2024-10420-50192-75621> (accessed 8 June 2026)

WHO, 2024c. WHO bacterial priority pathogens list, 2024. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> (accessed 30 September 2025)

WHO, 2025a. Global antibiotic resistance surveillance report 2025. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240116337> (accessed 9 June 2026)

WHO, 2025b. Wastewater and environmental surveillance summary for antimicrobial resistance. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/wastewater-and-environmental-surveillance--summary-for-antimicrobial-resistance> (accessed 8 June 2026)

Wilksch, J.J., Yang, J., Clements, A., Gabbe, J.L., Short, K.R., Cao, H., Cavaliere, R., James, C.E., Whitchurch, C.B., Schembri, M.A., Chuah, M.L.C., Liang, Z.-X., Wijburg, O.L., Jenney, A.W., Lithgow, T., Strugnell, R.A., 2011. MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator,

controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog.* 7, e1002204. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002204>

Wilksch, J.J., Tan, J.W.H., Nero, T.L., Hocking, D.M., Bennett-Wood, V., Wang, N., Zavras, S.-A., Schiesser, C.H., Tauschek, M., Schembri, M.A., Lithgow, T., Hartland, E.L., Robins-Browne, R.M., Parker, M.W., Yang, J., Strugnell, R.A., 2025. Chemical inhibition of MrkH-dependent activation of type 3 fimbriae synthesis and biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae*. *npj Biofilms Microbiomes* 11, 212. <https://doi.org/10.1038/s41522-025-00834-3>

Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>

WOAH, 2024. WOA list of antimicrobial agents of veterinary importance. World Organisation for Animal Health. Available at: <https://www.woah.org/en/document/list-of-antimicrobial-agents-of-veterinary-importance/> (accessed 31 July 2026)

Xia, Z., Zhou, J., Gao, N., Li, G., Liu, R., Lu, G., Shen, J., 2024. AcrAB-TolC efflux pump overexpression and tet(A) gene mutation increase tigecycline resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 40, 233. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04039-2>

Zagui, G.S., Moreira, N.C., Ferreira, J.C., Agnesini, M.V., Barth, P.O., Barth, A.L., Costa Darini, A.L., Andrade, L.N., Segura-Muñoz, S.I., 2025. Municipal sewage as a pathway for multidrug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from hospital effluent to urban stream: challenges for wastewater management. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 269, 114640. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2025.114640>

Zhang, Q., Jia, X., Chen, S., Jia, P., Zhu, Y., Yu, W., Chu, X., Li, Z., Yang, Q., 2026. Molecular epidemiology of levofloxacin-resistant *Klebsiella pneumoniae* and the association of plasmid-mediated quinolone resistance genes with key biological phenotypes. *Microbiol. Spectr.* 14. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01031-26>

Zou, H., Zhou, Z., Berglund, B., Zheng, B., Meng, M., Zhao, L., Zhang, H., Wang, Z., Wu, T., Li, Q., Li, X., 2023. Persistent transmission of carbapenem-resistant, hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* between a hospital and urban aquatic environments. *Water Res.* 242, 120263. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120263>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da complexidade que envolve a vigilância em saúde contemporânea, este estudo contribuiu para consolidar a EBE não apenas como uma metodologia complementar, mas como uma ferramenta estratégica vital para a compreensão da dinâmica de patógenos críticos no município de Uberlândia-MG. Sob a ótica da *One Health*, os dados obtidos permitiram traçar um panorama integrado da circulação viral e da resistência bacteriana, revelando desafios que transcendem os muros hospitalares e permeiam o ambiente comunitário.

No que tange à vigilância virológica, constatou-se que a circulação do SARS-CoV-2 nas águas residuais manteve-se contínua, independentemente da transição entre os períodos pandêmico e pós-pandêmico. A análise quantitativa demonstrou que, embora a correlação direta com o número de casos notificados tenha sofrido alterações devido à vacinação e ao incremento de casos assintomáticos, a EBE preservou um elevado valor preditivo para desfechos graves, antecipando curvas de óbitos. A vigilância genômica confirmou a circulação de Variantes de Preocupação (VOC), especificamente a linhagem Ômicron e suas sublinhagens, destacando o esgoto como uma matriz sentinela capaz de captar a diversidade evolutiva da população.

Paralelamente, o eixo de vigilância bacteriana revelou um cenário preocupante quanto à resistência antimicrobiana. A caracterização fenotípica e genômica de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isolados de esgoto bruto evidenciou uma disseminação crítica de fenótipos de multirresistência (MDR), com destaque para a detecção de blaCTX-M em todos os isolados de *E. coli* e de blaKPC-2 em todos os isolados de *K. pneumoniae*. A metagenômica direcionada ampliou esse panorama, recuperando os táxons do grupo ESKAPEE e identificando sinais de blaNDM e blaVIM diretamente na matriz de esgoto, ausentes nos genomas cultivados. O fato de a totalidade dos isolados apresentar resistência a três ou mais classes de antimicrobianos indica uma falha nas barreiras de contenção sanitária atuais, cenário agravado pela resistência a carbapenêmicos (ertapenem e meropenem) observada nos três isolados de *Klebsiella pneumoniae*, enquanto os seis isolados de *Escherichia coli* permaneceram suscetíveis a ambos os fármacos.

A despeito do seu promissor potencial, a consolidação prática desta vigilância perpassa por refinamentos metodológicos contínuos. A complexidade da matriz analítica demanda protocolos de extração cautelosos na normalização dos dados frente à dinâmica demográfica das bacias hidrográficas. Todavia, a integração efetiva da EBE com a formulação de políticas públicas representa um avanço estratégico fundamental. Ao contextualizar indicadores ambientais com dados clínicos, essa convergência transforma o monitoramento de efluentes em evidências robustas para avaliar a eficácia de programas de gerenciamento e uso racional de antimicrobianos.

Em suma, este estudo reitera que a EBE é uma abordagem robusta, econômica e indispensável para o enfrentamento das ameaças sanitárias do século XXI. Recomenda-se a institucionalização do monitoramento ambiental como política pública permanente em Uberlândia, integrando-o à vigilância epidemiológica convencional. A mitigação da resistência bacteriana e a garantia da segurança sanitária da coletividade demandam uma ação estatal coordenada, fundamentada na consolidação do monitoramento viral e bacteriano como ferramenta diretiva para o fortalecimento das políticas de saneamento e saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, N.; LEE, J.; BAUTISTA, M. A.; BHATNAGAR, S.; LI, C.; WADDELL, B. J.; AU, E.; PRADHAN, P.; CLARK, R. G.; MEDDINGS, J.; ACHARI, G.; PITOUT, J. D.; CONLY, J.; FRANKOWSKI, K.; HUBERT, C. R. J.; PARKINS, M. D. Metagenomic analysis after selective culture enrichment of hospital and community wastewater enhances antimicrobial resistance gene detection. **mBio**, v. 16, n. 9, 10 set. 2025. <https://doi.org/10.1128/mbio.01672-25>
- AGRAWAL, S.; ORSCHLER, L.; LACKNER, S. Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater of the Frankfurt metropolitan area in Southern Germany. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 5372, jan. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84914-2>
- AGUIAR-OLIVEIRA, M. de L.; CAMPOS, A.; MATOS, A. R.; RIGOTTO, C.; SOTERO-MARTINS, A.; TEIXEIRA, P. F. P.; SIQUEIRA, M. M. **Wastewater-based epidemiology (Wbe) and viral detection in polluted surface water: A valuable tool for covid-19 surveillance—a brief review** *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG, 2 dez. 2020. <https://doi.org/10.3390/ijerph17249251>
- ALCOCK, B. P.; HUYNH, W.; CHALIL, R.; SMITH, K. W.; RAPHENYA, A. R.; WLODARSKI, M. A.; EDALATMAND, A.; PETKAU, A.; SYED, S. A.; TSANG, K. K.; BAKER, S. J. C.; DAVE, M.; MCCARTHY, M. C.; MUKIRI, K. M.; NASIR, J. A.; GOLBON, B.; IMTIAZ, H.; JIANG, X.; KAUR, K.; KWONG, M.; LIANG, Z. C.; NIU, K. C.; SHAN, P.; YANG, J. Y. J.; GRAY, K. L.; HOAD, G. R.; JIA, B.; BHANDO, T.; CARFRAE, L. A.; FARHA, M. A.; FRENCH, S.; GORDZEVICH, R.; RACHWALSKI, K.; TU, M. M.; BORDELEAU, E.; DOOLEY, D.; GRIFFITHS, E.; ZUBYK, H. L.; BROWN, E. D.; MAGUIRE, F.; BEIKO, R. G.; HSIAO, W. W. L.; BRINKMAN, F. S. L.; VAN DOMSELAAR, G.; MCARTHUR, A. G. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D690–D699, 6 jan. 2023. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- ALI, M.; ZAID, M.; SAQIB, M. A. N.; AHMED, H.; AFZAL, M. S. SARS-CoV-2 and the hidden carriers: Sewage, feline, and blood transfusion. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 11, p. 2291–2292, 5 nov. 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25956>
- ASHOUR, H. M.; ELKHATIB, W. F.; RAHMAN, M. M.; ELSHABRAWY, H. A. **Insights into the recent 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) in light of past human coronavirus outbreaks** *Pathogens* 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030186>

- AURILIO, C.; SANSONE, P.; BARBARISI, M.; POTA, V.; GIACCARI, L. G.; COPPOLINO, F.; BARBARISI, A.; PASSAVANTI, M. B.; PACE, M. C. **Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance Antibiotics** 2022. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030186>
- AUSTIN, K. F. **Degradation and disease: Ecologically unequal exchanges cultivate emerging pandemics** *World Development* Elsevier Ltd, 1 jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2020.105163>
- BAIRD, Rodger.; EATON, A. D. .; RICE, E. W. .; BRIDGEWATER, Laura. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. [s.l.] American Public Health Association, 2017.
- BALCÁZAR, J. L. Wastewater-Based Epidemiology as a Complementary Tool for Antimicrobial Resistance Surveillance: Overcoming Barriers to Integration. **BioEssays**, v. 47, n. 8, 16 ago. 2025. <https://doi.org/10.1002/bies.70034>
- BALLÉN, V.; MONDÉJAR, L.; GABASA, Y.; CASTELLSAGUÉS, L.; ALCALDE-RICO, M.; PINAR-MÉNDEZ, A.; VILARÓ, C.; GALOFRÉ, B.; SOTO, S. M. Integrated metagenomic, culture-based, and whole genome sequencing analyses of antimicrobial resistance in wastewater and drinking water treatment plants in Barcelona, Spain. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 270, p. 114664, set. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2025.114664>
- BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLENKO, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A. V.; SIROTKIN, A. V.; VYAHHI, N.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PEVZNER, P. A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 1 maio 2012. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- BERTHE, F. C. J.; BALI, S. R.; BATMANIAN, G. J. **Putting Pandemics Behind Us : Investing in One Health to Reduce Risks of Emerging Infectious Diseases**. Washington, D.C.: Washington, DC, out. 2022. Disponível em: <<http://documents.worldbank.org/curated/en/0995330010212241754>>. Acesso em: 26 jan. 2026.
- BORDONI, G. P.; BARBOSA, L. C. G.; OLIVEIRA, T. R.; LIMA, F. S.; GOES, V. M.; ESTRELA, M. C.; DE SOUZA, P. Z.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; DE SOUZA, G. R. L.; VIEIRA, J. D. G.; SCALIZE, P. S.; CARNEIRO, L. C. Prevalence of Enterovirus in Water Consumed in Rural Areas in a State in the Midwest Region of Brazil. **Sustainability (Switzerland)**, v. 15, n. 13, 1 jul. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Uma Só Saúde PAN-BR**. 2018. <https://doi.org/10.3390/su15139886>

CABRAL, M. V. A.; MESQUITA DE SOUSA, A.; AMARAL TILLMANN, I. I.; BELÉM REIS, P.; BITENCOURT E BITENCOURT, E.; SOUSA GAMA, E.; DOS SANTOS BENJAMIN, J. V.; DAS NEVES MARTINS, F. E.; CARDOSO VALADARES PRESTES, M. do S.; CARVALHO DE ARAÚJO, J. A. VIGILÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA: ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DAS ÁGUAS RESIDUAIS, PÓS-COVID-19. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 2, 2024. Disponível em: <<https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/1391>>. Acesso em: 16 jan. 2026. <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n2p361-374>

LIMA, C. C.; BENJAMIM, S. C. C.; SANTOS, R. F. S. dos. MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA FRENTE AOS FÁRMACOS: UMA REVISÃO BACTERIAL RESISTANCE MECHANISM AGAINST DRUGS: A REVIEW MECANISMO DE RESISTENCIA BACTERIANA FRENTE A LOS FÁRMACOS: UNA REVISIÓN. **CuidArte Enfermagem**, v. 11, p. 105–113, 2017. Disponível em: <http://www.webfipa.net/facfipa/ner/sumarios/cuidarte/2017v1/15%20Artigo_Mecanismo%20resist%C3%Aancia%20bacteriana%20a%20antibi%C3%B3ticos_27-07-17.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2026.

CANDIDO, D. S.; CLARO, I. M.; DE JESUS, J. G.; SOUZA, W. M.; MOREIRA, F. R. R.; DELLICOUR, S.; MELLAN, T. A.; DU PLESSIS, L.; PEREIRA, R. H. M.; SALES, F. C. S.; MANULI, E. R.; THÉZÉ, J.; ALMEIDA, L.; MENEZES, M. T.; VOLOCH, C. M.; FUMAGALLI, M. J.; COLETTI, T. M.; DA SILVA, C. A. M.; RAMUNDO, M. S.; AMORIM, M. R.; HOELTGEBAUM, H. H.; MISHRA, S.; GILL, M. S.; CARVALHO, L. M.; BUSS, L. F.; PRETE, C. A.; ASHWORTH, J.; NAKAYA, H. I.; PEIXOTO, P. S.; BRADY, O. J.; NICHOLLS, S. M.; TANURI, A.; ROSSI, Á. D.; BRAGA, C. K. V.; GERBER, A. L.; DE GUIMARÃES, A. P. C.; GABURO, N.; ALENCAR, C. S.; FERREIRA, A. C. S.; LIMA, C. X.; LEVI, J. E.; GRANATO, C.; FERREIRA, G. M.; FRANCISCO, R. S.; GRANJA, F.; GARCIA, M. T.; MORETTI, M. L.; PERROUD, M. W.; CASTIÑEIRAS, T. M. P. P.; LAZARI, C. S.; HILL, S. C.; DE SOUZA SANTOS, A. A.; SIMEONI, C. L.; FORATO, J.; SPOSITO, A. C.; SCHREIBER, A. Z.; SANTOS, M. N. N.; DE SÁ, C. Z.; SOUZA, R. P.; RESENDE-MOREIRA, L. C.; TEIXEIRA, M. M.; HUBNER, J.; LEME, P. A. F.; MOREIRA, R. G.; NOGUEIRA, M. L.; FERGUSON, N. M.; COSTA, S. F.; PROENCA-MODENA, J. L.; VASCONCELOS, A. T. R.; BHATT, S.; LEMEY, P.; WU, C. H.; RAMBAUT, A.; LOMAN, N. J.; AGUIAR, R. S.; PYBUS, O. G.; SABINO, E. C.; FARIA, N. R. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. **Science**, v. 369, n. 6508, 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abd2161>

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, 1 ago. 2013. Disponível em:

- <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438422113000167>>. Acesso em: 29 jul. 2026. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>
- CARDOSO, J. V. B.; PEREIRA, D. C.; MATOS, W. L.; DE OLIVEIRA, G. S.; DE CARVALHO, V. R.; ALBORNOZ, L. L.; BARTH, A. L.; DA SILVA, S. W.; MARTINS, A. F. Bacteria That Made History: Detection of Enterobacteriaceae and Carbapenemases in the Waters of Southern Brazil's Largest Flood. **Microorganisms**, v. 13, n. 10, 1 out. 2025. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13102365>
- CASTRIGNANO, S. B.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; GARRAFA, P.; MONEZI, T. A.; BARRELLA, K. M.; MEHNERT, D. U. Identification of circo-like virus-Brazil genomic sequences in raw sewage from the metropolitan area of São Paulo: Evidence of circulation two and three years after the first detection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 175–181, 1 mar. 2017. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160312>
- CAUSANILLES, A.; NORDMANN, V.; VUGHS, D.; EMKE, E.; DE HON, O.; HERNÁNDEZ, F.; DE VOOGT, P. Wastewater-based tracing of doping use by the general population and amateur athletes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 6, p. 1793–1803, 15 fev. 2018.
- CDC. **COVID-19 - Centers for Disease Control and Prevention - CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/covid/php/variants/index.html>>. Acesso em: 12 nov. 2024. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0835-3>
- CHAN, J. F. W., KOK, K. H., ZHU, Z., CHU, H., TO, K. K. W., YUAN, S., & YUEN, K. Y. . Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan, 9(1), (221-236), 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1737364>>. Acesso em: 18 jan. 2026. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- CHAVDA, K. D.; CHEN, L.; FOUTS, D. E.; SUTTON, G.; BRINKAC, L.; JENKINS, S. G.; BONOMO, R. A.; ADAMS, M. D.; KREISWIRTH, B. N. Comprehensive genome analysis of carbapenemase-producing *Enterobacter* spp.: New insights into phylogeny, population structure, and resistance mechanisms. **mBio**, v. 7, n. 6, 1 jan. 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.02093-16>
- CHE, Y.; XIA, Y.; LIU, L.; LI, A. D.; YANG, Y.; ZHANG, T. Mobile antibiotic resistome in wastewater treatment plants revealed by Nanopore metagenomic sequencing. **Microbiome**, v. 7, n. 1, jan. 2019. <https://doi.org/10.1128/mBio.02093-16>
- CHOI, P. M.; TSCHARKE, B. J.; DONNER, E.; O'BRIEN, J. W.; GRANT, S. C.; KASERZON, S. L.; MACKIE, R.; O'MALLEY, E.; CROSBIE, N. D.; THOMAS, K. V.; MUELLER, J. F. Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 453–469, 1 ago. 2018. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993618301444>>. Acesso em: 18 abr. 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004>

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. **Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. Journal of Molecular Evolution**, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>

CLARKE, L. M.; O'BRIEN, J. W.; MURRAY, A. K.; GAZE, W. H.; THOMAS, K. V. **A review of wastewater-based epidemiology for antimicrobial resistance surveillance. Journal of Environmental Exposure Assessment**, 2024. <https://doi.org/10.20517/jeea.2023.29>

CLARO, I. C. M.; CABRAL, A. D.; AUGUSTO, M. R.; DURAN, A. F. A.; GRACIOSA, M. C. P.; FONSECA, F. L. A.; SPERANCA, M. A.; BUENO, R. de F. Long-term monitoring of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in Brazil: A more responsive and economical approach. **Water Research**, v. 203, 15 set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117534>

CONFORTI, S.; PRUDEN, A.; ACOSTA, N.; ANDERSON, C.; BUERGSMANN, H.; CALABRIA DE ARAUJO, J.; CRISTOBAL, J. R.; DRIGO, B.; ELLISON, C.; FRANCIS, Z.; FRIGON, D.; GAENZLE, M.; VIERHEILIG, J.; JULIAN, T. R.; KLÜMPER, U.; MA, L.; MANGAT, C.; NADIMPALLI, M.; NAKASHITA, M.; OSENA, G.; RATHINAVELU, S.; REID-SMITH, R.; SALDANA, M.; SCHMITT, H.; LI, S.; SINGER, A. C.; TRAN, T. T.; YANAC, K.; YBAZETA, G.; HARNISZ, M. Strengthening Policy Relevance of Wastewater-Based Surveillance for Antimicrobial Resistance. **Environmental Science & Technology**, v. 59, n. 5, p. 2339–2343, 11 fev. 2025. <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c09663>

COUTINHO, R. M.; MARQUITTI, F. M. D.; FERREIRA, L. S.; BORGES, M. E.; PAIXÃO DA SILVA, R. L.; CANTON, O.; PORTELLA, T. P.; POLONI, S.; FRANCO, C.; PLUCINSKI, M. M.; LESSA, F. C.; MOURA DA SILVA, A. A.; KRAENKEL, R. A.; DE SOUSA MASCENA VERAS, M. A.; INÁCIO PRADO, P. **Model-based estimation of transmissibility and reinfection of SARS-CoV-2 P.1 variant** 5 mar. 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.03.03.21252706>

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature Reviews Microbiology** 2019.

DA COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45, 23 ago. 2017. <https://doi.org/10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57>

DANTAS, P. P.; MEDEIROS, E. S.; LOBO, A. P. T.; CARNIATTO, T.; SILVA, V. A.; TIerno, P. F.; BEIRÃO, E. M. ATIVIDADE DE MEROPENEM-VABORBACTEM EM INFECÇÕES POR ENTEROBACTERIALES NO BRASIL - RESULTADOS DO ANTIMICROBIAL TESTING

- LEADERSHIP AND SURVEILLANCE (ATLAS). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2022.102402>
- DARBY, E. M.; TRAMPARI, E.; SIASAT, P.; GAYA, M. S.; ALAV, I.; WEBBER, M. A.; BLAIR, J. M. A. **Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited** **Nature Reviews Microbiology** 2023. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01014-4>
- DAUGHTON, C. G. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Overarching Issues and Overview. *Em: [s.l.] American Chemical Society*, 2001. p. 2–38. <https://doi.org/10.1021/bk-2001-0791>
- DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. **Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance** **Clinical Microbiology Reviews**. American Society for Microbiology, 1 out. 2019. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>
- DE FREITAS BUENO, R.; CLARO, I. C. M.; AUGUSTO, M. R.; DURAN, A. F. A.; CAMILLO, L. D. M. B.; CABRAL, A. D.; SODRÉ, F. F.; BRANDÃO, C. C. S.; VIZZOTTO, C. S.; SILVEIRA, R.; DE MELO MENDES, G.; ARRUDA, A. F.; DE BRITO, N. N.; MACHADO, B. A. S.; DUARTE, G. R. M.; DE LOURDES AGUIAR-OLIVEIRA, M. Wastewater-based epidemiology: A Brazilian SARS-CoV-2 surveillance experience. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 5, 1 out. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108298>
- DE MELO MENDES, G.; ESTRELA, P. F. N.; DE SOUZA, M. N.; DE BRITO, N. N.; ARRUDA, A. F.; AUGUSTO, M. R.; CLARO, I. C. M.; DURAN, A. F. A.; CABRAL, A. D.; DE FREITAS BUENO, R.; DUARTE, G. R. M. SARS-CoV-2 Viral Load in Goiânia Wastewater: Wastewater-Based Epidemiology for a COVID-19 Early Warning System. COVID-19. **Química Nova**, v. 45, n. 10, p. 1197–1204, 2022.
- DELGADO-VALVERDE, M.; SOJO-DORADO, J.; PASCUAL, Á.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 1, n. 2, p. 49–69, 8 abr. 2013. <https://doi.org/10.1177/2049936113476284>
- DENG, X.; DEN BAKKER, H. C.; HENDRIKSEN, R. S. Genomic Epidemiology: Whole-Genome-Sequencing–Powered Surveillance and Outbreak Investigation of Foodborne Bacterial Pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 353–374, 28 fev. 2016. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033259>
- DENG, Y.; XU, X.; ZHENG, X.; DING, J.; LI, S.; CHUI, H. kwong; WONG, T. kin; POON, L. L. M.; ZHANG, T. Use of sewage surveillance for COVID-19 to guide public health response: A case study in Hong Kong. **Science of The Total Environment**, v. 821, p. 153250, 15 maio 2022. . Acesso em: 4 nov. 2024.

DIANCOURT, L.; PASSET, V.; VERHOEF, J.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178–4182, ago. 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>

DMAE – DEPARTAMENTO MUNICIPAL DE ÁGUA E ESGOTO – PREFEITURA MUNICIPAL DE UBERLÂNDIA. **Tratamento de esgoto em Uberlândia**2025. Disponível em: <https://www.uberlandia.mg.gov.br/prefeitura/orgaos-municipais/dmae/tratamento-de-esgoto/ete-uberabinha/?utm_source=>. Acesso em: 30 set. 2025.

DŽIDIĆ, Senka; ŠUŠKOVIĆ, Jagoda; KOS, Blaženka. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology & Biotechnology**, v. 46, n. 1, 2008.

EBMEYER, S.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D. G. J. A framework for identifying the recent origins of mobile antibiotic resistance genes. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, jan. 2021. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01545-5>

ELBEHIRY, A.; MARZOUK, E.; ABALKHAIL, A. Fluoroquinolone resistance in ESKAPE pathogens: evolutionary pathways, *One Health* transmission, and clinical surveillance. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, 13 jan. 2026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1719066>

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNEP UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH.. **One Health Joint Plan of Action (2022-2026): Working Together for the Health of Humans, Animals, Plants and the Environment**. World Health Organization, 2022.

FARIA, N. R.; MELLAN, T. A.; WHITTAKER, C.; CLARO, I. M.; CANDIDO, D. da S.; MISHRA, S.; CRISPIM, M. A. E.; SALES, F. C.; HAWRYLUK, I.; MCCRONE, J. T.; HULSWIT, R. J. G.; FRANCO, L. A. M.; RAMUNDO, M. S.; DE JESUS, J. G.; ANDRADE, P. S.; COLETTI, T. M.; FERREIRA, G. M.; SILVA, C. A. M.; MANULI, E. R.; PEREIRA, R. H. M.; PEIXOTO, P. S.; KRAEMER, M. U.; GABURO, N.; CAMILO, C. da C.; HOELTGEBAUM, H.; SOUZA, W. M.; ROCHA, E. C.; DE SOUZA, L. M.; DE PINHO, M. C.; ARAUJO, L. J. T.; MALTA, F. S. V.; DE LIMA, A. B.; SILVA, J. do P.; ZAULI, D. A. G.; FERREIRA, A. C. de S.; SCHNEKENBERG, R. P.; LAYDON, D. J.; WALKER, P. G. T.; SCHLÜTER, H. M.; DOS SANTOS, A. L. P.; VIDAL, M. S.; DEL CARO, V. S.; FILHO, R. M. F.; DOS SANTOS, H. M.; AGUIAR, R. S.; MODENA, J. L. P.; NELSON, B.; HAY, J. A.; MONOD, M.; MISCOURIDOU, X.; COUPLAND, H.; SONABEND, R.; VOLLMER, M.; GANDY, A.; SUCHARD, M. A.; BOWDEN, T. A.; POND, S. L. K.; WU, C.-H.; RATMANN, O.; FERGUSON, N. M.; DYE, C.; LOMAN, N. J.; LEMEY, P.; RAMBAUT, A.; FRAIJ, N. A.; CARVALHO, M. do P. S. S.; PYBUS, O. G.; FLAXMAN, S.; BHATT, S.; SABINO, E. C. **Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil**. 3 mar. 2021. <https://doi.org/10.1126/science.abh2644>

- FELDGARDEN, M.; BROVER, V.; GONZALEZ-ESCALONA, N.; FRYE, J. G.; HAENDIGES, J.; HAFT, D. H.; HOFFMANN, M.; PETTENGILL, J. B.; PRASAD, A. B.; TILLMAN, G. E.; TYSON, G. H.; KLIMKE, W. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 12728, 16 jun. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>
- FUGA, B.; SELLERA, F. P.; CERDEIRA, L.; ESPOSITO, F.; CARDOSO, B.; FONTANA, H.; MOURA, Q.; CARDENAS-ARIAS, A.; SANO, E.; RIBAS, R. M.; CARVALHO, A. C.; CRISTINA TOGNIM, M. B.; MARIA DE MORAIS, M. C.; JUDITH G QUARESMA, A. P.; PATRÍCIA SANTANA, Â.; REIS, J. N.; PILONETTO, M.; CAROLINA VESPERO, E.; BONELLI, R. R.; F CERQUEIRA, A. M.; M SINCERO, T. C.; LINCOPAN, N. **WHO Critical Priority Escherichia coli as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/spectrum>>.
- FUMIAN, T. M.; GUIMARÃES, F. R.; VAZ, B. J. P.; DA SILVA, M. T. T.; MUYLEAERT, F. F.; BOFILL-MAS, S.; GIRONÉS, R.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 8, n. 3, p. 438–445, 2010. <https://doi.org/10.2166/wh.2010.090>
- GILLINGS, M. R.; PAULSEN, I. T.; TETU, S. G. Genomics and the evolution of antibiotic resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1388, n. 1, p. 92–107, jan. 2017. <https://doi.org/10.1111/nyas.13268>
- GOMES, M. F. de A.; CHAVES, L. K. M.; PEREIRA, G. E. dos S.; ALBUQUERQUE, D. L. de; MIRANDA, M. L. A. F.; ZORZI, L. R. M.; WATERLOO, M. de M. L. Emergência da resistência antimicrobiana em animais de estimação: Uma revisão narrativa da literatura e suas implicações para a Saúde Pública. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 10, p. e45131047090, 11 out. 2024. <https://doi.org/10.33448/rsd-v13i10.47090>
- GONÇALVES, D. L. D. R.; CHANG, M. R.; NOBREGA, G. D.; VENANCIO, F. A.; HIGA JÚNIOR, M. G.; FAVA, W. S. Hospital sewage in Brazil: a reservoir of multidrug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2024. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.277750>
- GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; GROOT, R. J. De; GULYAEVA, A. A.; HAAGMANS, B. L.; LAUBER, C.; LEONTOVICH, A. M. The species and its viruses – a statement of the Coronavirus study group. **Biorxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 2020.

- GUREVICH, A.; SAVELIEV, V.; VYAHHI, N.; TESLER, G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 15 abr. 2013. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- HARTENIAN, E.; NANDAKUMAR, D.; LARI, A.; LY, M.; TUCKER, J. M.; GLAUNSINGER, B. A. The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, set. 2020. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013930>
- HELJANKO, V.; TYNI, O.; JOHANSSON, V.; VIRTANEN, J.-P.; RÄISÄNEN, K.; LEHTO, K.-M.; LIPPONEN, A.; OIKARINEN, S.; PITKÄNEN, T.; AL-MUSTAPHA, A.; KURITTU, P.; LÄNSIVAARA, A.; HYDER, R.; JANHONEN, E.; TIWARI, A.; HOKAJÄRVI, A.-M.; KOLEHMAINEN, A.; MÖTTÖNEN, T.; LUOMALA, O.; JUUTINEN, A.; BLOMQVIST, S.; SAVOLAINEN-KOPRA, C.; SAREKOSKI, A.; HEIKINHEIMO, A. Clinically relevant *sequence types* of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* detected in Finnish wastewater in 2021–2022. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 13, n. 1, p. 14, 30 jan. 2024. <https://doi.org/10.1186/s13756-024-01370-z>
- HELLMÉR, M.; PAXÉUS, N.; MAGNIUS, L.; ENACHE, L.; ARNHOLM, B.; JOHANSSON, A.; BERGSTRÖM, T.; NORDER, H. Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 21, p. 6771–6781, 2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.01981-14>
- HENDRIKSEN, R. S.; MUNK, P.; NJAGE, P.; VAN BUNNIK, B.; MCNALLY, L.; LUKJANCENKO, O.; RÖDER, T.; NIEUWENHUIJSE, D.; PEDERSEN, S. K.; KJELDGAARD, J.; KAAS, R. S.; CLAUSEN, P. T. L. C.; VOGT, J. K.; LEEKITCHAROENPHON, P.; VAN DE SCHANS, M. G. M.; ZUIDEMA, T.; DE RODA HUSMAN, A. M.; RASMUSSEN, S.; PETERSEN, B.; BEGO, A.; REES, C.; CASSAR, S.; COVENTRY, K.; COLLIGNON, P.; ALLERBERGER, F.; RAHUBE, T. O.; OLIVEIRA, G.; IVANOV, I.; VUTHY, Y.; SOPHEAK, T.; YOST, C. K.; KE, C.; ZHENG, H.; BAISHENG, L.; JIAO, X.; DONADO-GODOY, P.; COULIBALY, K. J.; JERGOVIĆ, M.; HRENOVIC, J.; KARPÍŠKOVÁ, R.; VILLACIS, J. E.; LEGESSE, M.; EGUALE, T.; HEIKINHEIMO, A.; MALANIA, L.; NITSCHKE, A.; BRINKMANN, A.; SABA, C. K. S.; KOCSIS, B.; SOLYMOSI, N.; THORSTEINSDOTTIR, T. R.; HATHA, A. M.; ALEBOUYEH, M.; MORRIS, D.; CORMICAN, M.; O’CONNOR, L.; MORAN-GILAD, J.; ALBA, P.; BATTISTI, A.; SHAKENOVA, Z.; KIIYUKIA, C.; NG’ENO, E.; RAKA, L.; AVSEJENKO, J.; BĚRZIŇŠ, A.; BARTKEVICS, V.; PENNY, C.; RAJANDAS, H.; PARIMANNAN, S.; HABER, M. V.; PAL, P.; JEUNEN, G. J.; GEMMELL, N.; FASHAE, K.; HOLMSTAD, R.; HASAN, R.; SHAKOOR, S.; ROJAS, M. L. Z.; WASYL, D.; BOSEVSKA, G.; KOCHUBOVSKI, M.; RADU, C.; GASSAMA, A.; RADOSAVLJEVIC, V.; WUERTZ, S.; ZUNIGA-MONTANEZ, R.; TAY, M. Y. F.;

GAVAČOVÁ, D.; PASTUCHOVA, K.; TRUSKA, P.; TRKOV, M.; ESTERHUYSE, K.; KEDDY, K.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; PATHIRAGE, S.; NORRGREN, L.; ÖRN, S.; LARSSON, D. G. J.; HEIJDEN, T. Van der; KUMBURU, H. H.; SANNEH, B.; BIDJADA, P.; NJANPOP-LAFOURCADE, B. M.; NIKIEMA-PESSINABA, S. C.; LEVENT, B.; MESCHKE, J. S.; BECK, N. K.; VAN, C. D.; PHUC, N. Do; TRAN, D. M. N.; KWENDA, G.; TABO, D. adjim; WESTER, A. L.; CUADROS-ORELLANA, S.; AMID, C.; COCHRANE, G.; SICHERITZ-PONTEN, T.; SCHMITT, H.; ALVAREZ, J. R. M.; AIDARA-KANE, A.; PAMP, S. J.; LUND, O.; HALD, T.; WOOLHOUSE, M.; KOOPMANS, M. P.; VIGRE, H.; PETERSEN, T. N.; AARESTRUP, F. M. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>

HILL, R.; STENTIFORD, G. G.; WALKER, D. I.; BAKER-AUSTIN, C.; WARD, G.; MASKREY, B. H.; VAN AERLE, R.; VERNER-JEFFREYS, D.; PEELER, E.; BASS, D. Realising a global *One Health* disease surveillance approach: insights from wastewater and beyond. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49417-4>

HILLER, C. X.; HÜBNER, U.; FAJNOROVA, S.; SCHWARTZ, T.; DREWES, J. E. **Antibiotic microbial resistance (AMR) removal efficiencies by conventional and advanced wastewater treatment processes: A review** *Science of the Total Environment* Elsevier B.V., jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.315>

HO, D.; WANG, P.; LIU, L.; IKETANI, S.; LUO, Y.; GUO, Y.; WANG, M.; YU, J.; ZHANG, B.; KWONG, P.; GRAHAM, B.; MASCOLA, J.; CHANG, J.; YIN, M.; SOBIESZCZYK, M.; KYRATSOUS, C.; SHAPIRO, L.; SHENG, Z.; NAIR, M.; HUANG, Y. **Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7 to Antibody Neutralization** 29 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-155394/v1>>. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>

HOCK, L.; LUIKEN, R.; VALÉRIO, E.; VARGHA, M.; VIERHEILIG, J.; BÖRJESSON, S.; PITKÄNEN, T.; SCHMITT, H. Integrating AMR surveillance into wastewater monitoring systems in 2025: a position on the implementation of Article 17 of the Urban Wastewater Treatment Directive (UWWTD). **Eurosurveillance**, v. 31, n. 3, 22 jan. 2026. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2026.31.3.2500289>>. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2026.31.3.2500289>

HUI, D. S. C.; ZUMLA, A. Severe Acute Respiratory Syndrome. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 869–889, dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.07.001>

- HUIJBERS, P. M. C.; LARSSON, D. G. J.; FLACH, C. F. Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. **Environmental Pollution**, v. 261, 1 jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114200>
- ILLUMINA. **UIP Full Feature Demo Report**. 2026. Disponível em: <<https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/urinary-pathogen-id-amr-enrichment-kit.html#tabgroup-2-tab3>>. Acesso em: 19 jun. 2026.
- ILLUMINA. **Illumina Respiratory Pathogen ID/AMR Panel Table**. 2026. Disponível em: <<https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/respiratory-pathogen-id-panel.html#tabgroup-2-tab3>>. Acesso em: 19 jun. 2026.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Uberlândia (MG) | Cidades e Estados**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/CIDADES-E-ESTADOS/MG/UBERLANDIA.HTML?utm_source=>>. Acesso em: 15 jun. 2026.
- JAIN, C.; RODRIGUEZ-R, L. M.; PHILLIPPY, A. M.; KONSTANTINIDIS, K. T.; ALURU, S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 5114, 30 nov. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- JIN, Y.; YANG, H.; JI, W.; WU, W.; CHEN, S.; ZHANG, W.; DUAN, G. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 372, 27 mar. 2020. <https://doi.org/10.3390/v12040372>
- JONES, D. L.; BALUJA, M. Q.; GRAHAM, D. W.; CORBISHLEY, A.; MCDONALD, J. E.; MALHAM, S. K.; HILLARY, L. S.; CONNOR, T. R.; GAZE, W. H.; MOURA, I. B.; WILCOX, M. H.; FARKAS, K. Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19. **Science of the Total Environment**, v. 749, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141364>
- KAGAMBÈGA, A. B.; DEMBÉLÉ, R.; BIENTZ, L.; M'ZALI, F.; MAYONNOVE, L.; MOHAMED, A. H.; COULIBALY, H.; BARRO, N.; DUBOIS, V. Detection and Characterization of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Hospital Effluents of Ouagadougou, Burkina Faso. **Antibiotics**, v. 12, n. 10, p. 1494, 29 set. 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101494>
- KALANTAR, K. L.; CARVALHO, T.; DE BOURCY, C. F. A.; DIMITROV, B.; DINGLE, G.; EGGER, R.; HAN, J.; HOLMES, O. B.; JUAN, Y.-F.; KING, R.; KISLYUK, A.; LIN, M. F.; MARIANO, M.; MORSE, T.; REYNOSO, L. V.; CRUZ, D. R.; SHEU, J.; TANG, J.; WANG, J.; ZHANG, M. A.; ZHONG, E.; AHYONG, V.; LAY, S.; CHEA, S.; BOHL, J. A.; MANNING, J. E.; TATO, C. M.; DERISI, J. L. IDseq-An open source cloud-based pipeline and analysis service for

- metagenomic pathogen detection and monitoring. **GigaScience**, v. 9, n. 10, 15 out. 2020. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa111>
- KARKMAN, A.; PÄRNÄNEN, K.; LARSSON, D. G. J. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, jan. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07992-3>
- KIM, D.; LEE, J. Y.; YANG, J. S.; KIM, J. W.; KIM, V. N.; CHANG, H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. **Cell**, v. 181, n. 4, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- KITAJIMA, M.; AHMED, W.; BIBBY, K.; CARDUCCI, A.; GERBA, C. P.; HAMILTON, K. A.; HARAMOTO, E.; ROSE, J. B. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. **Science of The Total Environment**, v. 739, p. 139076, 15 out. 2020. . Acesso em: 6 dez. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>
- LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. **SARS-CoV-2 pathogenesis** **Nature Reviews Microbiology** Nature Research, 1 maio 2022. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- LARSEN, D. A.; WIGGINTON, K. R. **Tracking COVID-19 with wastewater** **Nature Biotechnology** 2020. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0690-1>
- LARSSON, D. G. J.; FLACH, C. F. **Antibiotic resistance in the environment** **Nature Reviews Microbiology** Nature Research, jan. 2022.
- LI, D.; JAROCKI, V. M.; WYRSCH, E. R.; CUMMINS, M. L.; DJORDJEVIC, S. P. Next generation ESKAPE-E superbugs: identifying transmissible locus of stress tolerance and antibiotic resistance in pandemic bacterial lineages. **npj Antimicrobials and Resistance**, v. 3, n. 1, p. 91, 10 nov. 2025.
- LI, J.; ZHU, Y.; WU, X.; HOFFMANN, M. R. **Rapid detection methods for bacterial pathogens in ambient waters at the point of sample collection: A brief review** **Clinical Infectious Diseases** Oxford University Press, 15 ago. 2020. <https://doi.org/10.1038/s44259-025-00162-8>
- LIU, B.; ZHENG, D.; ZHOU, S.; CHEN, L.; YANG, J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D912–D917, 7 jan. 2022. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
- CAMILLO, L. M. B.; DURAN, A. F. A.; PAULA, R. Z.; SANTOS, G. B.; BUENO, R. F. **PADRONIZAÇÃO DE PAINEL DE VIROMA PARA ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO NOS ESGOTOS DE FOZ DO IGUAÇU**. 33º Congresso da ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2025.
- LIVORSI, D. J.; CHORAZY, M. L.; SCHWEIZER, M. L.; BALKENENDE, E. C.; BLEVINS, A. E.; NAIR, R.; SAMORE, M. H.; NELSON, R. E.; KHADER, K.; PERENCEVICH, E. N. A systematic review of the epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the United

States. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 55, 24 abr. 2018. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0346-9>

LOPES, G. A. de P. **O papel do médico veterinário na prevenção da resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma perspectiva de Uma Só Saúde**. 2022.

LU, D.; KALANTAR, K. L.; GLASCOCK, A. L.; CHU, V. T.; GUERRERO, E. S.; BERNICK, N.; BUTCHER, X.; EWING, K.; FAHSBENDER, E.; HOLMES, O.; HOOPS, E.; JONES, A. E.; LIM, R.; MCCANNY, S.; REYNOSO, L.; ROSARIO, K.; TANG, J.; VALENZUELA, O.; MOURANI, P. M.; PICKERING, A. J.; RAPHENYA, A. R.; ALCOCK, B. P.; MCARTHUR, A. G.; LANGELEIR, C. R. Simultaneous detection of pathogens and antimicrobial resistance genes with the open source, cloud-based, CZ ID platform. **Genome Medicine**, v. 17, n. 1, 1 dez. 2025. <https://doi.org/10.1186/s13073-025-01480-2>

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. 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, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

MANOR, Y.; SHULMAN, L. M.; KALINER, E.; HINDIYEH, M.; RAM, D.; SOFER, D.; MORAN-GILAD, J.; LEV, B.; GROTO, I.; GAMZU, R.; MENDELSON, E. Intensified environmental surveillance supporting the response to wild poliovirus type 1 silent circulation in Israel, 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 7, 2014. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.7.20708>

MAO, K.; ZHANG, H.; PAN, Y.; YANG, Z. **Biosensors for wastewater-based epidemiology for monitoring public health** *Water Research* Elsevier Ltd, 1 mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116787>

MAO, K.; ZHANG, K.; DU, W.; ALI, W.; FENG, X.; ZHANG, H. **The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks** *Current Opinion in Environmental Science and Health* Elsevier B.V., 1 out. 2020. . Acesso em: 18 abr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.04.006>

MAO, Y.; SHISLER, J. L.; NGUYEN, T. H. Enhanced detection for antibiotic resistance genes in wastewater samples using a CRISPR-enriched metagenomic method. **Water Research**, v. 274, p. 123056, abr. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.123056>

MARQUES, P. R. C.; DOLABELLA, S. S.; JAIN, S.; BARBOSA, A. A. T. CONTRIBUIÇÕES DA EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ÁGUAS RESIDUAIS PARA VIGILÂNCIA EM SAÚDE

- PÚBLICA. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, p. 1–13, 16 set. 2022. <https://doi.org/10.51161/rem/s/3487>
- MARTIN, J.; KLAPSA, D.; WILTON, T.; ZAMBON, M.; BENTLEY, E.; BUJAKI, E.; FRITZSCHE, M.; MATE, R.; MAJUMDAR, M. Tracking SARS-CoV-2 in sewage: Evidence of changes in virus variant predominance during COVID-19 pandemic. **Viruses**, v. 12, n. 10, 2020. <https://doi.org/10.3390/v12101144>
- MARTINS, R. M. **Detecção e vigilância do vírus SARS-CoV-2 em Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de São José do Rio Preto**. 2022. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/entities/publication/e81ad16e-4adf-4748-ac13-faf05d5164e5>>. Acesso em: 16 jan. 2026.
- MEDEMA, G.; HEIJNEN, L.; ELSINGA, G.; ITALIAANDER, R.; BROUWER, A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 7, n. 7, p. 511–516, 14 jul. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00357>
- MENDES, G.; SANTOS, M. L.; RAMALHO, J. F.; DUARTE, A.; CANEIRAS, C. Virulence factors in carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 30 nov. 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1325077>
- METSKY, H. C.; FREIJE, C. A.; KOSOKO-THORODDSEN, T. S. F.; SABETI, P. C.; MYHRVOLD, C. CRISPR-based surveillance for COVID-19 using genomically-comprehensive machine learning design. **bioRxiv**, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.967026>
- MICHELON, C. M. Main SARS-CoV-2 variants notified in Brazil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 53, n. 2, 2021. <https://doi.org/10.21877/2448-3877.202100961>
- MIGLIORINI, L. B.; DE SALES, R. O.; KOGA, P. C. M.; DOI, A. M.; POEHLEIN, A.; TONIOLO, A. R.; MENEZES, F. G.; MARTINO, M. D. V.; GALES, A. C.; BRÜGGEMANN, H.; SEVERINO, P. Prevalence of blaKPC-2, blaKPC-3 and blaKPC-30—Carrying Plasmids in *Klebsiella pneumoniae* Isolated in a Brazilian Hospital. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 332, 12 mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030332>
- MILLER, W. R.; ARIAS, C. A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 598–616, 3 out. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w>
- MINIGULOV, N.; BORANBAYEV, K.; BEKBOSSYNNOVA, A.; GADILGEREYEVA, B.; FILCHAKOVA, O. Structural proteins of human coronaviruses: what makes them different? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, 6 dez. 2024. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1458383>

- NAKAMURA-SILVA, R.; DIAS, L. L.; SOUSA, R. C.; FUJIMOTO, R. Y.; PITONDO-SILVA, A. Multidrug-resistant and potentially pathogenic Enterobacteriaceae found in a tertiary hospital sewage in southeastern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, n. 10, p. 782, 13 out. 2022. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10454-5>
- NASROLLAHIAN, S.; GRAHAM, J. P.; HALAJI, M. A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of E. coli. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 14, 4 abr. 2024. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1387497>
- NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING AND MEDICINE. **Increasing the Utility of Wastewater-based Disease Surveillance for Public Health Action**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2024.
- NEILL, J. O. Tackling drug-resistant infections globally. **Review on Antimicrobial Resistance**, v. 7, n. 3, 2016. <https://doi.org/10.4103/2045-080X.186181>
- NGUYEN, A. Q.; VU, H. P.; NGUYEN, L. N.; WANG, Q.; DJORDJEVIC, S. P.; DONNER, E.; YIN, H.; NGHIEM, L. D. **Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: Current strategies and future challenges** *Science of the Total Environment* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146964>
- NICOLELIS, M. A. L.; RAIMUNDO, R. L. G.; PEIXOTO, P. S.; ANDREAZZI, C. S. The impact of super-spreader cities, highways, and intensive care availability in the early stages of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92263-3>
- NIMMANA BK, TOBIN. EH. **Enterobacter Infections**. [Updated 2025 Oct 24]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559296/>>. Acesso em: 16 jul. 2026.
- OECD. **Antimicrobial Resistance in the EU/EEA**. 2022.
- OLIVEIRA, R. X. de; SILVA, C. H.; CUPERTINO, M. do C.; SILVA, E. F. da; SILVA, M. C. da; MIGUEL, P. S. B.; MOREIRA, T. R. O uso de antimicrobianos na Atenção Primária à Saúde / The use of antimicrobials in primary health care. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n1-242>
- OYENUGA, N.; COBO-DÍAZ, J. F.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; ALEXA, E. A. **Overview of Antimicrobial Resistant ESKAPEE Pathogens in Food Sources and Their Implications from a One Health Perspective** *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 out. 2024. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12102084>
- PARASA, S.; DESAI, M.; THOGULUVA CHANDRASEKAR, V.; PATEL, H. K.; KENNEDY, K. F.; ROESCH, T.; SPADACCINI, M.; COLOMBO, M.; GABBIADINI, R.; ARTIFON, E. L. A.; REPICI, A.; SHARMA, P. **Prevalence of Gastrointestinal Symptoms and Fecal Viral Shedding**

- in Patients with Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Network Open.** American Medical Association, 11 jun. 2020. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.11335>
- PARKS, D. H.; IMELFORT, M.; SKENNERTON, C. T.; HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, v. 25, n. 7, p. 1043–1055, jul. 2015. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- PARTRIDGE, S. R.; KWONG, S. M.; FIRTH, N.; JENSEN, S. O. **Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance.** 2018. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cmr.00088-17>. Acesso em : 15 jul. 2026. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- POLO, D.; QUINTELA-BALUJA, M.; CORBISHLEY, A.; JONES, D. L.; SINGER, A. C.; GRAHAM, D. W.; ROMALDE, J. L. Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 – approaches and challenges for surveillance and prediction. **Water Research**, v. 186, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116404>
- PRUDEN, A.; VIKESLAND, P. J.; DAVIS, B. C.; DE RODA HUSMAN, A. M. Seizing the moment: now is the time for integrated global surveillance of antimicrobial resistance in wastewater environments. **Current Opinion in Microbiology**, v. 64, p. 91–99, dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.013>
- PULJKO, A.; BARIŠIĆ, I.; DEKIĆ ROZMAN, S.; KRIŽANOVIĆ, S.; BABIĆ, I.; JELIĆ, M.; MARAVIĆ, A.; UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem and colistin resistance in *Klebsiella* and other Enterobacterales from treated wastewater in Croatia. **Environment International**, v. 185, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108554>
- PUNCH, R.; AZANI, R.; ELLISON, C.; MAJURY, A.; HYND, P. D.; PAYNE, S. J.; BROWN, R. S. The surveillance of antimicrobial resistance in wastewater from a *One Health* perspective: A global scoping and temporal review (2014–2024). **One Health**, v. 21, p. 101139, dez. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2025.101139>
- RAJPUT, V.; PRAMANIK, R.; NANNAWARE, K.; MALIK, V.; MATRA, S.; KUMAR, S.; JOSHI, S.; KADAM, P.; BHALERAO, U.; TUPEKAR, M.; DESHPANDE, D.; SHAH, P.; SANGEWAR, P.; GOGATE, N.; BOARGAONKAR, R.; PATIL, D.; KALE, S.; BHALERAO, A.; JAIN, N.; SHASHIDHARA, L. S.; KAMBLE, S.; DASTAGER, S.; KARMODIYA, K.; DHARNE, M. Wastewater surveillance in post-omicron silent phase uncovers silent waves and cryptic transmission of SARS-CoV-2 variants; a yearlong study in Western India. **Science of the Total Environment**, v. 955, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176833>

- RAMATLA, T.; MAFOKWANE, T.; LEKOTA, K.; MONYAMA, M.; KHASAPANE, G.; SERAGE, N.; NKHEBENYANE, J.; BEZUIDENHOUT, C.; THEKISOE, O. “One Health” perspective on prevalence of co-existing extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a comprehensive systematic review and meta-analysis. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 22, n. 1, p. 88, 22 set. 2023. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00638-3>
- RAMBAUT, A.; HOLMES, E. C.; O'TOOLE, Á.; HILL, V.; MCCRONE, J. T.; RUIS, C.; DU PLESSIS, L.; PYBUS, O. G. **Addendum: A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology** *Nature microbiology*. NLM (Medline), 1 mar. 2021. <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.046086>
- RAZAVI, M.; KRISTIANSSON, E.; FLACH, C.-F.; LARSSON, D. G. J. The Association between Insertion Sequences and Antibiotic Resistance Genes. **mSphere**, v. 5, n. 5, jan. 2020. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00418-20>
- RIVA, F.; CASTIGLIONI, S.; PACCIANI, C.; ZUCCATO, E. Testing urban wastewater to assess compliance with prescription data through wastewater-based epidemiology: First case study in Italy. **Science of The Total Environment**, v. 739, p. 139741, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139741>
- RIZI, K. S.; GHAZVINI, K.; FARSIANI, H. Clinical and pathogenesis overview of *Enterobacter* infections. **Clinical Medicine Rev Clin Med**, v. 6, n. 4, 2019.
- SANTOS, H. A. **Investigação de fatores que podem influenciar a disseminação de bactérias resistentes a antibióticos durante a pandemia da COVID-19**. 2024. Disponível em: <<https://repositorio.ufmg.br/items/a1331a5e-6aab-4be0-84b5-30e1401daebd>>. Acesso em: 15 jul. 2026.
- SARANGI, J.; MATSUO, N.; NONOGAKI, R.; HAYASHI, M.; KAWAMURA, K.; SUZUKI, M.; JIN, W.; TAMAI, K.; OGAWA, M.; WACHINO, J.-I.; KIMURA, K.; YAGI, T.; ARAKAWA, Y. **Molecular epidemiology of *Enterobacter cloacae* complex isolates with reduced carbapenem susceptibility recovered by blood culture**. 2021. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2021.141>
- SATI, H.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HANSEN, P.; GARLASCO, J.; CAMPAGNARO, E.; BOCCIA, S.; CASTILLO-POLO, J. A.; MAGRINI, E.; GARCIA-VELLO, P.; WOOL, E.; GIGANTE, V.; DUFFY, E.; CASSINI, A.; HUTTNER, B.; PARDO, P. R.; NAGHAVI, M.; MIRZAYEV, F.; ZIGNOL, M.; CAMERON, A.; TACCONELLI, E.; ABODERIN, A.; AL GHORIBI, M.; AL-SALMAN, J.; AMIR, A.; APISARNTHANARAK, A.; BLASER, M.; EL-SHARIF, A.; ESSACK, S.; HARBARTH, S.; HUANG, X.; KAPOOR, G.; KNIGHT, G.; MUHWA, J. C.; MONNET, D. L.; OUSASSA, T.; SACSQUISPE, R.; SEVERIN, J.; SUGAI, M.; TANEJA,

- N.; UMUBYEYI NYARUHIRIRA, A. The WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: a prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 25, n. 9, p. 1033–1043, set. 2025. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(25\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(25)00118-5)
- SCHAUFLE, K.; SEMMLER, T.; WIELER, L. H.; TROTT, D. J.; PITOUT, J.; PEIRANO, G.; BONNEDAH, J.; DOLEJSKA, M.; LITERAK, I.; FUCHS, S.; AHMED, N.; GROBBEL, M.; TORRES, C.; MCNALLY, A.; PICKARD, D.; EWERS, C.; CROUCHER, N. J.; CORANDER, J.; GUENTHER, S. Genomic and Functional Analysis of Emerging Virulent and Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Lineage Sequence Type 648. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 6, jun. 2019. <https://doi.org/10.1128/AAC.00243-19>
- SHUAI, H.; CHAN, J. F. W.; HU, B.; CHAI, Y.; YUEN, T. T. T.; YIN, F.; HUANG, X.; YOON, C.; HU, J. C.; LIU, H.; SHI, J.; LIU, Y.; ZHU, T.; ZHANG, J.; HOU, Y.; WANG, Y.; LU, L.; CAI, J. P.; ZHANG, A. J.; ZHOU, J.; YUAN, S.; BRINDLEY, M. A.; ZHANG, B. Z.; HUANG, J. D.; TO, K. K. W.; YUEN, K. Y.; CHU, H. Attenuated replication and pathogenicity of SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron. **Nature**, v. 603, n. 7902, p. 693–699, 24 mar. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04442-5>
- SILVA, R. A. da; OLIVEIRA, B. N. L. de; SILVA, L. P. A. da; OLIVEIRA, M. A.; CHAVES, G. C. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 126, p. 607–623, set. 2020. <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012602>
- SILVA, J. P.; DE LIMA, A. B.; ALVIM, L. B.; MALTA, F. S. V.; MENDONÇA, C. P. T. B.; FONSECA, P. L. C.; MOREIRA, F. R. R.; QUEIROZ, D. C.; FERREIRA, J. G. G.; FERREIRA, A. C. S.; SOUZA, R. P.; AGUIAR, R. S.; ZAULI, D. A. G. Delta Variant of SARS-CoV-2 Replacement in Brazil: A National Epidemiologic Surveillance Program. **Viruses**, v. 14, n. 5, 2022. <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012602>
- SILVA, R. A. **A Resistência a Antimicrobianos: Revisão Sobre o Uso de Antibióticos Em Animais e a Resistência Em Humanos**. 2019. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca—Fiocruz., 2019.
- SIMS, N.; KASPRZYK-HORDERN, B. **Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level** *Environment International* Elsevier Ltd, 1 jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>
- SINTCHENKO, V.; IREDELL, J. R.; GILBERT, G. L. Pathogen profiling for disease management and surveillance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 6, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1656>

- SMITH, D. B.; PADDY, J. O.; SIMMONDS, P. The use of human sewage screening for community surveillance of hepatitis E virus in the UK. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 5, p. 915–918, 1 maio 2016. <https://doi.org/10.1002/jmv.24403>
- SOARES, A. F. S.; RICCI, B. C.; CATÃO, B. S. de A.; SOUZA, L. P. S. e. EPIDEMIOLOGIA BASEADA EM ESGOTO COMO ESTRATÉGIA DE RASTREAMENTO E DIAGNÓSTICO COLETIVO DE DOENÇAS E AGRAVOS TRANSMISSÍVEIS. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 11, n. 3, p. 571–580, 10 mar. 2025. <https://doi.org/10.51891/rease.v11i3.17754>
- SOMMER, M. O. A.; MUNCK, C., Prediction of antibiotic resistance time for a new preclinical paradigm. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 689–696 -2017. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.75>
- SONCINI, J. G. M.; CERDEIRA, L.; SANO, E.; KOGA, V. L.; TIZURA, A. T.; TANO, Z. N.; NAKAZATO, G.; KOBAYASHI, R. K. T.; AIRES, C. A. M.; LINCOPAN, N.; VESPERO, E. C. Genomic insights of high-risk clones of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from community infections and commercial meat in southern Brazil. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 9354, 7 jun. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13197-y>
- SOUCY, S. M.; HUANG, J.; GOGARTEN, J. P. **Horizontal gene transfer: Building the web of life** *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, jan. 2015. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- SOUZA, L. da S. R. de. **Caracterização molecular e análise da carga viral de enterovírus em efluentes líquidos de São José do Rio Preto**. 2024. Disponível em <https://repositorio.unesp.br/entities/publication/f6e277f7-6bce-4cc7-a2b0-d186ad5d77ea>. Acesso em: 15 jul. 2026.
- TAMMA, P. D.; HEIL, E. L.; JUSTO, J. A.; MATHERS, A. J.; SATLIN, M. J.; BONOMO, R. A. Infectious Diseases Society of America 2024 Guidance on the Treatment of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections. **Clinical Infectious Diseases**, 7 ago. 2024. <https://doi.org/10.1093/cid/ciae403>
- THOMPSON, J. R.; NANCHARAI, Y. V.; GU, X.; LEE, W. L.; RAJAL, V. B.; HAINES, M. B.; GIRONES, R.; NG, L. C.; ALM, E. J.; WUERTZ, S. Making waves: Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 for population-based health management. **Water Research**, v. 184, p. 116181, 1 out. 2020. . Acesso em: 13 nov. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116181>
- TINDALL, B. J.; SUTTON, G.; GARRITY, G. M. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, with consequences for the name *Klebsiella mobilis* Bascomb et al. 1971 (Approved Lists 1980).

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 502–504, 1 fev. 2017. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001572>
- TRAN, N. H.; REINHARD, M.; GIN, K. Y. H. **Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review** **Water Research** Elsevier Ltd, jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>
- UGALDE ZÁRRAGA, E.; VIDAL-GARCÍA, M.; URRUTIKOETXEA-GUTIÉRREZ, M.; ERASO, E.; ANGULO LÓPEZ, I.; DÍAZ DE TUESTA DEL ARCO, J. L. Molecular Characterisation and Descriptive Analysis of Carbapenemase-Producing Enterobacterales: Striking Epidemiological Changes. **Antibiotics**, v. 15, n. 7, p. 713, 22 jul. 2026. <https://doi.org/10.3390/antibiotics15070713>
- UNEP. **Bracing for superbugs : strengthening environmental action in the *One Health* response to antimicrobial resistance**. [s.l.] United Nations Environment Programme, 2023. . Disponível em: <<https://wedocs.unep.org/items/e06380a1-453c-4a77-811f-9bfcced60018>>. Acesso em: 8 jun. 2026.
- URASE, T.; GOTO, S.; SATO, M. Monitoring Carbapenem-Resistant Enterobacterales in the Environment to Assess the Spread in the Community. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070917>
- VECCHIA; FLECK; KLUGE, M.; LUZ, R. B.; SILVA, J.; SPILKI, F. R. **Assessment of enteric viruses in a sewage treatment plant located in Porto Alegre, southern Brazil**. **Braz. J. Biol.** 72 (4), 2012. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842012000500009>
- VIANA-CARDENAS, E.; JIANG, M.; RODRIGUEZ-NAVA, G.; PAREDES, J. L.; TARIQ, W.; PINCUS, N.; MIRANTI, E.; WHITAKER, E.; SAMPSON, M. M.; ZULLI, A.; MARRA, A. R.; BOEHM, A.; SALINAS, J. L. **Hospital Wastewater-based Antimicrobial Resistance Surveillance: A Scoping Review** 21 jan. 2026. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-8648143/v1>>. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-8648143/v1>
- VOLZ, E. M.; KOELLE, K.; BEDFORD, T. Viral Phylodynamics. **PLoS Computational Biology**, v. 9, n. 3, p. e1002947, 21 mar. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002947>
- WAN, Y.; SHANG, J.; GRAHAM, R.; BARIC, R. S.; LI, F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. **Journal of Virology**, v. 94, n. 7, 2020. <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>
- ALMEIDA, W. N. M.; CAVALCANTI, R. V. D.; WATTS, M. L.; NEVES JÚNIOR, C. B.; ROCHA, R. E. T. da.. Impactos da utilização de antimicrobianos na resistência antimicrobiana: uma revisão de literatura com abordagem da Uma Só Saúde. **Revista Universitária Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 121–133, 2023. Disponível em: <<https://www.revistaub.com/index.php/RUB/article/view/22>>. Acesso em: 24 jan. 2026.

WHO. **WHO bacterial priority pathogens list, 2024**. Geneva. WHO, 17 maio 2024b. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>>. Acesso em: 30 set. 2025.

WHO Integrated Global Surveillance on ESBL-Producing E. Coli Using a One Health Approach : Implementation and Opportunities. [s.l.] World Health Organization, 2021.

WIRTH, T.; FALUSH, D.; LAN, R.; COLLES, F.; MENSA, P.; WIELER, L. H.; KARCH, H.; REEVES, P. R.; MAIDEN, M. C. J.; OCHMAN, H.; ACHTMAN, M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1136–1151, 4 jun. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>

WONG, A. C. P.; LI, X.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y. Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 174, 20 fev. 2019. <https://doi.org/10.3390/v11020174>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. [s.l.: s.n.]

WU, F.; ZHANG, J.; XIAO, A.; GU, X.; LEE, W. L.; ARMAS, F.; KAUFFMAN, K.; HANAGE, W.; MATUS, M.; GHAEI, N.; ENDO, N.; DUVALLET, C.; POYET, M.; MONIZ, K.; WASHBURN, A. D.; ERICKSON, T. B.; CHAI, P. R.; THOMPSON, J.; ALM, E. J. SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases. **mSystems**, v. 5, n. 4, 25 ago. 2020. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00614-20>

WU, W.; FENG, Y.; ZONG, Z. *Enterobacter sichuanensis* sp. nov., recovered from human urine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 3922–3927, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003089>

XIAO, F.; TANG, M.; ZHENG, X.; LIU, Y.; LI, X.; SHAN, H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. **Gastroenterology**, v. 158, n. 6, p. 1831- 1833.e3, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>

YAMASOBA, D.; KIMURA, I.; NASSER, H.; MORIOKA, Y.; NAO, N.; ITO, J.; URIU, K.; TSUDA, M.; ZAHRADNIK, J.; SHIRAKAWA, K.; SUZUKI, R.; KISHIMOTO, M.; KOSUGI, Y.; KOBIYAMA, K.; HARA, T.; TOYODA, M.; TANAKA, Y. L.; BUTLERTANAKA, E. P.; SHIMIZU, R.; ITO, H.; WANG, L.; ODA, Y.; ORBA, Y.; SASAKI, M.; NAGATA, K.; YOSHIMATSU, K.; ASAKURA, H.; NAGASHIMA, M.; SADAMASU, K.; YOSHIMURA, K.; KURAMOCHI, J.; SEKI, M.; FUJIKI, R.; KANEDA, A.; SHIMADA, T.; NAKADA, T.; SAKAO, S.; SUZUKI, T.; UENO, T.; TAKAORI-KONDO, A.; ISHII, K. J.; SCHREIBER, G.; SAWA, H.; SAITO, A.; IRIE, T.; TANAKA, S.; MATSUNO, K.; FUKUHARA, T.; IKEDA, T.; SATO, K. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike. **Cell**, v. 185, n. 12, p. 2103-2115.e19, jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.035>

- YANG, Q. E.; WALSH, T. R. **Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance***FEMS Microbiology Reviews*Oxford University Press, jan. 2017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux006>
- YANG, R.; GUI, X.; XIONG, Y. **Comparison of Clinical Characteristics of Patients with Asymptomatic vs Symptomatic Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China***JAMA Network Open*2020. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.10182>
- ZAGUI, G. S.; MOREIRA, N. C.; FERREIRA, J. C.; AGNESINI, M. V.; BARTH, P. O.; BARTH, A. L.; COSTA DARINI, A. L.; ANDRADE, L. N.; SEGURA-MUÑOZ, S. I. Municipal sewage as a pathway for multidrug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from hospital effluent to urban stream: challenges for wastewater management. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 269, p. 114640, ago. 2025. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2025.114640>
- ZHANG, S.; LI, X.; WU, J.; COIN, L.; O'BRIEN, J.; HAI, F.; JIANG, G. **Molecular methods for pathogenic bacteria detection and recent advances in wastewater analysis***Water (Switzerland)*MDPI, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.3390/w13243551>
- ZHENG, S.; FAN, J.; YU, F.; FENG, B.; LOU, B.; ZOU, Q.; XIE, G.; LIN, S.; WANG, R.; YANG, X.; CHEN, W.; WANG, Q.; ZHANG, D.; LIU, Y.; GONG, R.; MA, Z.; LU, S.; XIAO, Y.; GU, Y.; ZHANG, J.; YAO, H.; XU, K.; LU, X.; WEI, G.; ZHOU, J.; FANG, Q.; CAI, H.; QIU, Y.; SHENG, J.; CHEN, Y.; LIANG, T. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: Retrospective cohort study. **The BMJ**, v. 369, 21 abr. 2020. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1443>
- ZHOU, H.; JI, J.; CHEN, X.; BI, Y.; LI, J.; WANG, Q.; HU, T.; SONG, H.; ZHAO, R.; CHEN, Y.; CUI, M.; ZHANG, Y.; HUGHES, A. C.; HOLMES, E. C.; SHI, W. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. **Cell**, v. 184, n. 17, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.008>
- ZHOU, P.; YANG, X. Lou; WANG, X. G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H. R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C. L.; CHEN, H. D.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, H.; JIANG, R. Di; LIU, M. Q.; CHEN, Y.; SHEN, X. R.; WANG, X.; ZHENG, X. S.; ZHAO, K.; CHEN, Q. J.; DENG, F.; LIU, L. L.; YAN, B.; ZHAN, F. X.; WANG, Y. Y.; XIAO, G. F.; SHI, Z. L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- ZUCCATO, E.; CHIABRANDO, C.; CASTIGLIONI, S.; CALAMARI, D.; BAGNATI, R.; SCHIAREA, S.; FANELLI, R. Cocaine in surface waters: A new evidence-based tool to monitor community drug abuse. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 4, jan. 2005. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-4-14>

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO - ENVIRONMENT & HEALTH – CAPÍTULO 2

15/07/2026, 17:15

Dashboard

ACS | ACS Publications | C&EN | CAS

ACS Publishing Center

Powered by ChronosHub

JB

Are you ready to publish your research?

Select a journal to: Start Submission

My Manuscripts

Search Refresh

Awaiting Submission 0

Under Consideration 1

Decision Made 0

Preparing to Publish 0

Editorial Review

eh-2026-00450w

COVID-19 surveillance in wastewater in a post-pandemic perspective

Environment & Health

Received 11 Jul 2026

JB

CA

Resources

How To Submit a Manuscript

Want to ensure your paper stands out from the crowd? ACS Publications' English Editing Service was designed ...

Copyright/Journal Publishing Agreement

Every Author who publishes their research with ACS Publications is required to complete and sign a Journal...

Ethical Guidelines & Plagiarism Screening

The Editors of Journals published by the American Chemical Society provide a set of ethical guidelines for...

Permissions & Credit Lines

Every Author who publishes their research with ACS Publications is required to complete and sign a Journal...

L

F

P

C

R

T

Help?

ANEXO B – NORMAS DO PERIÓDICO *ENVIRONMENT & HEALTH* (E&H)

Last updated: March 11, 2026

Select an ACS Journal Accounts of Chemical Research Accounts of Materials Research ACS Agricultural Science & Technology ACS Applied Bio Materials ACS Applied Electronic Materials ACS Applied Energy Materials ACS Applied Engineering Materials ACS Applied Materials & Interfaces ACS Applied Nano Materials ACS Applied Optical Materials ACS Applied Polymer Materials ACS Bio & Med Chem Au ACS Biomaterials Science & Engineering ACS Catalysis ACS Central Science ACS Chemical Biology ACS Chemical Health & Safety ACS Chemical Neuroscience ACS Earth and Space Chemistry ACS Electrochemistry ACS Energy Letters ACS Engineering Au ACS Environmental Au ACS ES&T Air ACS ES&T Engineering ACS ES&T Water ACS Food Science & Technology ACS Infectious Diseases ACS Macro Letters ACS Materials Au ACS Materials Letters ACS Measurement Science Au ACS Medicinal Chemistry Letters ACS Nano ACS Nano Medicine ACS Nanoscience Au ACS Nutrition Science ACS Omega ACS Organic & Inorganic Au ACS Pharmacology & Translational Science ACS Photonics ACS Physical Chemistry Au ACS Polymers Au ACS Sensors ACS Sustainable Chemistry & Engineering ACS Sustainable Resource Management ACS Synthetic Biology Analytical Chemistry Artificial Photosynthesis Biochemistry Bioconjugate Chemistry Biomacromolecules Chem & Bio Engineering Chemical & Biomedical Imaging Chemical Research in Toxicology Chemical Reviews Chemistry of Materials Crystal Growth & Design Digital Medical Engineering Energy & Fuels Environment & Health Environmental Health Perspectives Environmental Science & Technology Environmental Science & Technology Letters Industrial & Engineering Chemistry Research Inorganic Chemistry JACS Au Journal of Agricultural and Food Chemistry Journal of Chemical & Engineering Data Journal of Chemical Education Journal of Chemical Information and Modeling Journal of Chemical Theory and Computation Journal of Medicinal Chemistry Journal of Natural Products Journal of Proteome Research Journal of the American Chemical Society Journal of the American Society for Mass Spectrometry Langmuir Macromolecules Molecular Pharmaceutics Nano Letters Organic Letters Organic Process Research & Development Organometallics Photon Science Polymer Science & Technology Precision Chemistry The Journal of Organic Chemistry The Journal of Physical Chemistry A The Journal of Physical Chemistry B The Journal of Physical Chemistry C The Journal of Physical Chemistry Letters

- [Scope of the Journal](#)
- [Manuscript Types](#)
- [ACS Researcher Resources](#)
- [Manuscript Preparation](#)
 - [Submit with Fast Format](#)
 - [Document Templates and Format](#)
 - [Acceptable Software, File Designations, and TeX/LaTeX](#)
 - [Cover Letter](#)
 - [Manuscript Text Components](#)
 - [Supporting Information](#)
 - [Research Data Policy](#)
 - [Data Requirements](#)
 - [Language and Editing Services](#)
 - [Preparing Graphics](#)
 - [Figure and Illustration Services](#)
- [Preparing for Submission](#)
 - [Prior Publication Policy](#)
 - [Editorial Policies](#)
 - [Providing Potential Reviewer Names](#)
 - [Manuscript Transfer](#)
- [Production And Publication](#)
 - [Proofs via ACS Direct Correct](#)
 - [Publication Date and Patent Dates](#)
 - [ASAP Publication](#)
 - [Post-Publication Policies](#)

[Appendix 1: Preparing for Submission](#)

[Ethical Guidelines](#) | [OFAC Compliance](#) | [Safety Considerations](#) | [Conflict of Interest Disclosure](#) | [Plagiarism](#) | [Authorship, Author List, and Coauthor Notification](#) | [Patent Activities and Intellectual Property](#) | [Open Researcher and Contributor ID \(ORCID\)](#) | [Copyright and Permissions](#) | [Funder Reporting Requirement](#) | [Open Access Compliance](#) | [Diversity and Inclusion Statement](#)

[Appendix 2: Preparing Graphics](#)

[Resolution](#) | [Size](#) | [Color](#) | [Types of Graphics](#) | [Table of Contents \(TOC\)/Abstract Graphic](#) | [Figures](#) | [Charts](#) | [Tables](#) | [Schemes](#) | [Chemical Structures](#) | [Cover Art](#) | [Web Enhanced Objects \(WEO\)](#)

Scope of the Journal

Environment & Health (E&H), a peer-reviewed, open access journal, is committed to exploring the relationship between the environment and human health.

As a premier journal for multidisciplinary research, *Environment & Health* reports the health consequences for individuals and communities of changing and hazardous environmental factors. In supporting the UN Sustainable Development Goals, the journal aims to help formulate policies to create a healthier world.

Topics of interest include, but are not limited to:

- Air, water, and soil pollution
- Exposomics
- Environmental epidemiology
- Innovative analytical methodology and instrumentation (multi-omics, non-target analysis, effect-directed analysis, high-throughput screening, etc.)
- Environmental toxicology (endocrine disrupting effect, neurotoxicity, alternative toxicology, computational toxicology, epigenetic toxicology, etc.)
- Environmental microbiology, pathogen, and environmental transmission mechanisms of diseases
- Environmental modeling, bioinformatics, and artificial intelligence
- Emerging contaminants (including plastics, engineered nanomaterials, etc.)
- Climate change and related health effect
- Health impacts of energy evolution and carbon neutralization
- Food and drinking water safety
- Occupational exposure and medicine
- Innovations in environmental technologies for better health
- Policies and international relations concerned with environmental health

More information can be found [here](#).

Manuscript Types

Research Article (flexible length typically up to 7,000 word-equivalents).

Research Articles in *E&H* must report original research that is expected to have a definable impact on the advancement of environmental health and related policy, being characterized by the editor and referees as an advance representing the top 10 % of articles published annually in that field. Articles must be of high scientific quality, originality, significance, and conceptual novelty.

Authors are requested to provide an explanation in their cover letter why they believe the manuscript belongs in *E&H* and why their research will interest our readers with an emphasis on the novelty and environmental or health relevance of the contribution. For articles focusing on environmental science or technology, a brief discussion on the implications for human health should be included in the article.

Review (flexible length typically up to 10,000 word-equivalents).

Reviews are topical, forward looking, and of general interest to the readership. A good review critically evaluates existing work of multiple groups in a field or across disciplines, provides a logical organization, and makes the material more easily available to those not expert in the area through clear text and figures. Reviews should lay out the challenges and opportunities that lie ahead. Reviews should contain an abstract and appropriate references. The use of graphics to illustrate key concepts is strongly encouraged. Reviews include a graphical Table of Contents entry and ~5–8 keywords.

Authors should briefly describe their expertise in the subject matter and provide a list of their own publications related to review topic in the cover letter accompanying the submission. Authors should also provide justification for the need for a review on the topic and address what differentiates their submission from the most recent and related Reviews, Perspectives, or Viewpoints published in the topic area. All Review articles will undergo full peer review.

Although most Reviews are invited, they can be submitted without invitation. Authors interested in submitting a Review are strongly encouraged to contact the Editors prior to manuscript preparation and submission, to seek conditional approval of the proposed topic. One-page proposals should be sent to the Editor (eic@eh.acs.org) with the subject line “Review Proposal”.

Perspective (flexible length approximately 2,000 to 4,000 word-equivalents).

Perspectives are personal reviews of a field or area by one or a small team of authors, and they are focused rather than comprehensive. Perspective authors are asked to assess the current status of the field with an emphasis toward identifying key advances being made or those advances that are needed, and with an eye to the future. A Perspective should touch base with the current literature, including key contributors and references, but will primarily serve to inspire and help direct future research efforts.

Authors should briefly describe their expertise in the subject matter and provide a list of their own related publications on the topic in the cover letter accompanying the submission. Authors should also

provide justification for the need for a Perspective on the topic and address what differentiates their submission from the most recent and related Reviews, Perspectives, or Viewpoints published in the topic area. Perspectives will undergo full peer review.

Although most Perspectives are invited, they can be submitted without invitation. Authors interested in submitting a Perspective are strongly encouraged to contact the Editors prior to manuscript preparation and submission, to seek conditional approval of the proposed topic. One-page proposals should be sent to the Editor (eic@eh.acs.org) with the subject line “Perspective Proposal”.

Policy Analysis (flexible length typically up to 7,000 word-equivalents).

These manuscripts typically focus on the interface of environment and health research with public policy and provide new insight into the understanding and management of human-environment nexus. Policy Analysis articles will undergo peer review.

Viewpoint (flexible length approximately 1,000 to 1,500 word-equivalents).

Viewpoints are short opinion-style manuscripts, written in the journalistic style of an opinion piece in a newspaper or magazine. They provide authors with a venue to comment on an issue of pressing importance to *E&H* readership. Viewpoint articles should express an opinion of a clear scientific nature, based on rigorous scientific research in an environmental or health discipline. They should not be wholly political or summary in nature. Viewpoints are not generally peer reviewed but are subject to editorial approval.

Correspondence/Rebuttal (length limit: 1,000 word-equivalents each including citations).

Correspondence is a technical contribution providing, with supporting material, a respectful but alternative point of view to a publication that has appeared in *E&H*. The author of the original publication may be invited to write a Rebuttal. The Correspondence and Rebuttal may undergo peer review under the direction of the assigned editor. The Correspondence and Rebuttal will appear in the same issue of the journal, when possible.

In Focus (flexible length approximately 1,000 to 1,500 word-equivalents).

In Focus are articles that popularize scientific knowledge and raise the public's scientific literacy in an easy-to-understand way. They provide authors with a venue to communicate professional knowledge to the general public and enable the citizens to become aware of environmental and health issues. In Focus articles are not generally peer reviewed but are subject to editorial approval. Interested authors can submit proposals for In Focus to the Editor (eic@eh.acs.org) with the subject line, “In Focus Proposal”.

News

News reports latest incidents in environment and health research in a concise and timely manner. News may be linked to articles either published in *E&H* or elsewhere. News is not peer reviewed. News manuscripts are invited only.

Spotlight

Spotlights are short editorial features that highlight research articles published in *E&H* or other journals, alerting the readership to interesting research findings. Spotlights are not peer reviewed. These pieces are invited submissions, and those who wish to contribute a Spotlight article should contact the Editor (eic@eh.acs.org).

Special Issue

E&H has a required template that must be completed for all proposals for special issues. If you would like to propose a special issue, please contact the Editor for more information (eic@eh.acs.org).

ACS Researcher Resources

While this document will provide basic information on how to prepare and submit the manuscript as well as other critical information about publishing, we also encourage authors to visit [ACS Researcher Resources](#) for additional information on everything that is needed to prepare (and review) manuscripts for ACS journals and partner journals, such as

- [Mastering the Art of Scientific Publication](#), which shares editor tips about a variety of topics including making your paper scientifically effective, preparing excellent graphics, and writing cover letters.
- Resources on [how to prepare and submit a manuscript](#) to the ACS Publications manuscript submission and peer review system, including details on selecting the applicable [Journal Publishing Agreement](#).
- [Sharing your research](#) with the public through the ACS Publications open access program.
- [ACS Reviewer Lab](#), a free online course covering best practices for peer review and related ethical considerations.
- [ACS Author Lab](#), a free online course that empowers authors to prepare and submit strong manuscripts, avoiding errors that could lead to delays in the publication process.
- [ACS Inclusivity Style Guide](#), a guide that helps researchers communicate in ways that recognize and respect diversity in all its forms.

Manuscript Preparation

Submit with Fast Format

All ACS journals and partner journals have simplified their formatting requirements in favor of a streamlined and standardized format for an initial manuscript submission. Read more about the requirements and the benefits these serves authors and reviewers [here](#).

Manuscripts submitted for initial consideration must adhere to these standards:

- Submissions must be complete with clearly identified standard sections used to report original research, free of annotations or highlights, and include all numbered and labeled components.
- Figures, charts, tables, schemes, and equations should be embedded in the text at the point of relevance. Separate graphics can be supplied later at revision, if necessary.
- When required by a journal's structure or length limitations, manuscript templates should be used.
- References can be provided in any style, but they must be complete, including titles. For information about the required components of different reference types, please refer to the [ACS Style Quick Guide](#).
- Supporting Information must be submitted as a separate file(s).

Document Templates and Format

Environment & Health does not require the use of any document templates.

General information on the preparation of manuscripts may also be found in the [ACS Guide to Scholarly Communication](#).

Acceptable Software, File Designations, and TeX/LaTeX

See the list of [Acceptable Software](#) and appropriate [File Designations](#) to be sure your file types are compatible with the submission system. Information for manuscripts generated from [TeX/LaTeX](#) is also available.

Cover Letter

A cover letter must accompany every manuscript submission. During the submission process, you may type it or paste it into the submission system, or you may attach it as a file.

Recommended information includes the following:

- the full manuscript title
- the name and complete contact information (mailing address, phone, and email) of the corresponding author
- the type of manuscript submitted
- a paragraph explaining why the paper is appropriate for *E&H*, clearly indicating what key advance(s) is/are described in the work.
- a statement confirming the manuscript is not under consideration for publication and has not been published elsewhere.
- note any use of a preprint server, and as appropriate, state how the manuscript has been adjusted/updated between deposition and submission.

Manuscript Text Components

Title. Titles should clearly and concisely reflect the emphasis and content of the manuscript. Titles are of great importance for current awareness and information retrieval and should be carefully constructed for these purposes. Titles of manuscripts may not contain the words “New” or “Novel” nor any part number or series number without permission from the Editor. Claims of precedence should not be made in a title, so use of “First” in titles for this purpose is prohibited. Additionally, “Superb”, “Excellent”, “Exceptional”, “Outstanding” or other similar descriptive words, are strongly discouraged. Acronyms and abbreviations are not permitted in manuscript titles, unless they are broadly familiar to readers in all disciplines of chemistry. Titles should not be phrased as a question.

Author List. Bylines should include all those who have made substantial contributions to the work. To facilitate indexing and retrieval and for unique identification of an author, use first names, initials, and surnames or first initials (e.g., Jody R. Smith), second names, and last names (e.g., J. Riley Smith). Do not use only initials with surnames (e.g., J. R. Smith). Deceased persons who meet the criteria for inclusion as coauthors should be included, with an Author Information note indicating the date of death. Do not include professional or official titles or academic degrees. At least one, or optionally more than one but fewer than four authors must be designated with an asterisk as the author(s) to whom reader correspondence regarding the published manuscript may be addressed.

The full names and e-mail addresses of all co-authors must be provided on the Authors & Institutes page upon submission of the manuscript in the ACS Publishing Center. Use of ORCID identifiers is encouraged.

Addition or deletion of an author or authors after submission of the manuscript requires justification from the corresponding author and is subject to approval by the Editor.

Institution Address. The author affiliation(s) listed should be the institution(s) where the work was conducted. If the present address of an author differs from that at which the work was done, that address should be given in an Author Information note.

Many Funders and Institutions require that institutional affiliations are identified for all authors listed in the work being submitted. ACS facilitates this requirement by collecting institution information during manuscript submission under Step 2: Authors and Affiliations in the ACS Publishing Center.

Abstract. All Articles, Reviews, Perspectives and Policy Analysis papers must be accompanied by an abstract, including an Abstract (TOC) graphic, which should state briefly the purpose of the research, the principal results, and major conclusions. Abstracts of manuscripts may not contain the words “superb”, “excellent”, “exceptional”, “outstanding”, or other similar descriptive words unless rigorously supported by a thorough comparison with the state-of-the-art in the manuscript. Like manuscript titles, the words “New”, “First”, or “Novel” are also generally disallowed in the abstract.

The abstract should not generally exceed 200 words. Pasting the abstract in the text box on the Web submission page does not replace the need for including an abstract in the manuscript document.

Keywords. All Articles, Reviews, Perspectives and Policy Analysis papers must be accompanied by 5–8 keywords. Authors are encouraged to include significant keywords that do not appear in the title to expand discoverability and aid the reader in literature retrieval. These keywords will appear in the PDF version of the article and will also be used as a search term in the HTML version of the article.

Introduction. The introduction should clearly and concisely explain the motivation for the work, its importance and originality, where it fits in the development of the field and why it should be of interest to *E&H* readers. Discuss relationships of the study to previously published work, but do not reiterate or provide a complete literature survey. If a recent article has summarized work on the subject, cite that article only, and not the sources it cites. Current findings should not be included or summarized in this section.

Materials and Methods. Describe pertinent and critical factors involved in the experimental work but avoid excessive description. Details not essential for understanding the paper can be placed in Supporting Information (SI). Specific experimental methods should be sufficiently detailed for others to repeat the experiments unequivocally. List devices of a specialized nature or instruments that may vary in performance or affect the quality of the data obtained (e.g. spectroscopic resolution), including the vendor. If the procedures are already published, provide citations to previous publications and expand only on differences in the current work. Authors must emphasize any unexpected, new, and/or significant hazards or risks associated with the reported work and this safety information must be included in the Materials and Methods section.

Ethical Use of Animals or Human Participants in Research. For animal and human studies, the ethics committee that approved the experimental procedure must be identified and the case number provided, as described in the ACS [Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research](#). Research involving human participants/samples should also include a statement confirming that the samples/data were obtained through the informed consent of the donors/participants. Papers that include any aspect of Community-Based Participatory Research (CBPR) or citizen science must include information on practices employed to protect vulnerable populations. This information should be included in the Experimental or Methods section of the manuscript.

Results and Discussion. Be complete but concise. Discuss your findings, postulate explanations for the data, elucidate models and compare your results with those of others. Avoid irrelevant comparisons or contrasts, any speculation unsupported by the data presented and verbose discussion.

Conclusions. Concisely articulate the important findings of your work and their impact on the field of research, aiming for maximum brevity.

Safety. Authors must emphasize any unexpected, new, and/or significant hazards or risks associated with the reported work. For each manuscript that reports experimental procedures, authors must include an affirmative statement about safety in the Experimental Section of the full article or the main text of a Letter. Further information may be included or re-introduced in the Supporting Information.

Abbreviations. Acronyms and abbreviations that are not broadly familiar to readers in all disciplines of chemistry should be introduced in parentheses following the full term on its first appearance in the text. Do not include a separate Abbreviations list.

Acknowledgment. Dedications and notes acknowledging financial or professional assistance to the conduct of research or indicating presentation at a meeting should be brief and placed in the Acknowledgment section.

Author Information Notes. The e-mail address(es) of the corresponding author or authors must be provided as a Corresponding Author note. Present addresses for individual authors that differ from the address(es) at which the work was done should be given in a Present Address(es) note.

Statements about author contributions to the work or equal contributions of work should be included as a separate statement.

References and Footnotes. *All the references and footnotes must be placed together in a list at the end of the manuscript text.* In the Web edition, many of them will have links to other Web resources, such as the corresponding abstracts in *Chemical Abstracts* and the full text from other American Chemical Society journals. Because of this electronic linking, and to aid scientific research, *it is crucial that authors verify the accuracy of all references.*

Unnecessarily long lists of references should be avoided, and excessive self-citation is not permitted. However, authors must reference all previous publications in which portions of the present work have appeared. Each literature reference should be assigned one number and placed in the text as a superscript Arabic numeral. Footnotes to the text should be combined with references and numbered in ordinal sequence. Long footnotes should be avoided in Articles and are not permitted in Communications; additional data and peripheral discussion should be placed in the Supporting Information rather than in footnotes.

Bibliographic references to classified documents and reports or references to unpublished materials that are not generally available to the scientific public should not be used. Authors must obtain written permission from any person whose work is cited as a personal communication, unpublished work, or work in press. Copies of letters of permission and documentation should be appended to the cover letter file. If the manuscript is accepted but the necessary permissions have not been received, the Editor will ask the author to remove the reference(s) and dependent text.

List submitted articles as “in press” only if they have been formally accepted for publication. Otherwise, use “unpublished work” with the name of the place where the work was done and the date. For work published online (ASAP, in press), the DOI should be furnished in addition to the author name(s), article title, journal name, and year. DOI is an accepted form of citation before and after the article appears in an issue.

Example of a journal reference:

Yue, Q.; Liu, W.; Zhu, X. n-Type Molecular Photovoltaic Materials: Design Strategies and Device Applications. *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 11613–11628.

Example of an in-press journal reference:

Ham, J. S.; Park, B.; Son, M.; Roque, J. B.; Jurczyk, J.; Yeung, C. S.; Baik, M.-H. ; Sarpong, R. C–H/C–C Functionalization Approach to N-Fused Heterocycles from Saturated Azacycles. *J. Am. Chem. Soc.* 2020, DOI: 10.1021/jacs.0c04278.

Example of a reference to a book with no editors:

Desiraju, G. R.; Vittal, J. J.; Ramanan, A. *Crystal Engineering: A Textbook*. World Scientific Publishing Co Pte Ltd: Singapore, 2011.

Example of a reference to a book with editors:

Byrn, S. R.; Stowell, J. G. Impurities in Drug Substances and Drug Products. In *Validation of Active Pharmaceutical Ingredients*; Berry, I.R., Harpaz, D., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2001; pp 271–292.

Authors should consult the [ACS Guide to Scholarly Communication](#) for the appropriate style to use in citations of journal articles, books, and other publications. In literature references, article titles must be included and journal abbreviations should be those used in the [Chemical Abstracts Service Source Index \(CASSI\)](#)

Supporting Information

This information is provided to the reviewers during the peer-review process (for Review Only) and is available to readers of the published work (for Publication). Supporting Information must be submitted at the same time as the manuscript. See the list of [Acceptable Software by File Designation](#) and confirm that your Supporting Information is [viewable](#).

If the manuscript is accompanied by any supporting information files for publication, these files will be made available free of charge to readers. A brief, nonsentence description of the actual contents of each file, including the file type extension, is required. This description should be labeled Supporting Information and should appear before the Acknowledgement and Reference sections. Examples of sufficient and insufficient descriptions are as follows:

Examples of sufficient descriptions: “Supporting Information: ^1H NMR spectra for all compounds (PDF)” or “Additional experimental details, materials, and methods, including photographs of experimental setup (DOC)”.

Examples of insufficient descriptions: “Supporting Information: Figures S1-S3” or “Additional figures as mentioned in the text”.

When including supporting information for review only, include copies of references that are unpublished or in-press. These files are available only to editors and reviewers.

Research Data Policy

All ACS journals strongly encourage authors to make the research data underlying their articles publicly available at the time of publication.

Environment & Health applies ACS Research Data Policy Level 1, meaning the journal encourages all authors to publicly share all the data underlying the results reported in the paper, preferably via archiving in an appropriate public repository. Authors are also encouraged to provide a [Data Availability Statement](#) describing the public availability of the data supporting the article’s conclusions. Publicly available data sets should be [cited appropriately](#).

Research data is defined as materials and information used in the experiments that enable the validation of the conclusions drawn in the article, including primary data produced by the authors for the study being reported, secondary data reused or analyzed by the authors for the study, and any other materials necessary to reproduce or replicate the results.

The [ACS Research Data Policy](#) provides additional information on Data Availability Statements, Data Citation, and Data Repositories.

Data Requirements

Nomenclature. Use abbreviations and acronyms sparingly, and all usage should be defined at the first occurrence in the text. Whenever possible, use systematic nomenclature as recommended by IUPAC and IUBMB for chemical compounds and biomolecules, and SI units. The [ACS](#) and [IUPAC](#) websites have links to nomenclature recommendations. Names of organisms should comply with genetic conventions, with genus and species names written in italics and spelled out in full on first appearance. Trade names should be defined at the point of first use (registered trade names should begin with a capital letter).

Database Deposition. Advancing scientific discoveries can be enhanced when data and materials are made available and readily exchanged. *E&H* encourages authors to make materials, data, and protocols available to readers through deposition in a public database for all published articles. In addition, ACS Publications’ figshare houses all Supporting Information within the HTML presentation of the paper and at acs.figshare.com and is available free of charge. Authors may want

to further investigate [Dryad](#) or institutional repositories for depositing data. Authors also agree to make available to interested academic researchers for their own use any materials reported in the manuscript that are not otherwise obtainable. Any restrictions to the availability of materials or information must be stated at the time of submission. The [ACS Math Style Sheet](#) and [NMR Guidelines](#) are available on ACS Researcher Resources.

Sequence data. DNA sequence data must be submitted to [GenBank](#), [EMBL Nucleotide Sequence Database](#), or the [DNA Data Bank of Japan](#). Protein sequence data should be deposited with the [Protein Identification Resource](#) at Georgetown University Medical Center, Washington, the [European Bioinformatics Institute](#) (EBI), or the [Swiss Institute of Bioinformatics](#).

Microarray data. Manuscripts that present microarray data should follow the MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) [guidelines](#). Data must be submitted to the [GEO](#) (Gene Expression Omnibus) or [ArrayExpress Archive](#) databases.

For sequence data and microarray data, the relevant accession numbers should be available at the time that the revision is submitted and should be listed at the end of the Materials and Methods section in the revised version of the manuscript.

Proteomics data. Proteomic experiments must meet the standards established by the Journal of Proteome Research. More information is available in the [Publication Guidelines](#) for the Analysis and Documentation of Peptide and Protein Identifications. Protein sequences should be handled in the same way as described above, and accession number and database source should be included.

Computer codes. When computer codes are developed or used and are an essential part of a manuscript, sufficient detail must be given, either within the paper or in the SI. Types of languages that are used in the computer codes, compiler/interpreter, and operating system with a specific version must be provided or properly cited. Upon request, after appropriate material transfer agreements to restrict the use of the materials so as to protect the legitimate interests of the authors, codes and input data must be made available for others to validate the calculations. Regardless of whether the source code is open or closed source, it must be properly cited in the References.

Computational chemistry calculations. When computational chemistry calculations are performed, input data, including force field parameters, equations defining the model (or references to where such material is available in the open literature), methods and approaches, and basis sets, must be given either within the paper or in the SI. If the software used for calculations is generally available, it must be properly cited in the References. References to the methods upon which the software is based must also be provided.

Materials. When requested, the authors should also make a reasonable effort to provide samples of unusual materials unavailable elsewhere, including, but not limited to, clones, microorganism strains,

antibodies, computer codes, etc., to other researchers, with appropriate material transfer agreements to restrict the field of use of the materials so as to protect the legitimate interests of the authors. Any restrictions to the availability of materials or information must be stated at the time of submission.

Language and Editing Services

A well-written paper helps share your results most clearly. ACS Publications' [English Editing Service](#) is designed to help scientists communicate their research effectively. Our subject-matter expert editors will edit your manuscript for grammar, spelling, and other language errors so your ideas are presented at their best.

Preparing Graphics

The quality of illustrations in ACS journals and partner journals depends on the quality of the original files provided by the authors. Figures are not modified or enhanced by journal production staff. All graphics must be prepared and submitted in digital format.

Graphics should be inserted into the main body whenever possible. Please see Appendix 2 for additional information.

Any graphic (figure chart, scheme, or equation) that has appeared in an earlier publication should include a [credit line](#) citing the original source. Authors are responsible for [obtaining written permission](#) to re-use this material.

Figure and Illustration Services

The impact of your research is not limited to what you can express with words. Tables and figures such as graphs, photographs, illustrations, diagrams, and other visuals can play a significant role in effectively communicating your findings. Our [Artwork Editing](#) and [Graphical Abstract](#) services generate publication-ready figures and Table of Contents (TOC) graphics that conform to your chosen journal's specifications. For figures, this includes changes to file type, resolution, color space, font, scale, line weights, and layout (to improve readability and professional appearance). For TOC graphics, our illustrators can work with a rough sketch or concept or help extract the key findings of your manuscript directly for use as a visual summary of your paper.

Preparing for Submission

Manuscripts, graphics, supporting information, and required forms, as well as manuscript revisions, must all be submitted in digital format through [ACS Publishing Center](#), which requires an ACS ID to log in. Registering for an ACS ID is fast, free, and does not require an ACS membership. Please refer to Appendix 1 for additional information on preparing your submission

Prior Publication Policy

Submission of a manuscript to *E&H* is contingent upon the agreement by all the authors that the reported work has not received prior publication and that no portion of this or any other closely related work is under consideration for publication.

E&H authors may deposit an initial draft of their manuscript in a preprint service such as [ChemRxiv](#), [bioRxiv](#), [arXiv](#), or the applicable repository for their discipline before the manuscript is accepted for publication in *E&H*. Authors may revise the preprint version of their manuscript up until a final acceptance decision has been issued. Please note any use of a preprint server in the cover letter and include a link to the preprint, and as appropriate, state how the manuscript has been adjusted/updated between deposition and submission. All other prior/redundant publication is forbidden. Upon publication in *E&H*, authors should add a link from the preprint to the published article via the Digital Object Identifier (DOI). Some preprint servers, including ChemRxiv and bioRxiv, add this link for authors automatically after publication. For further details, contact the Editorial Office. For the ACS Publications policy on theses and dissertations, click [here](#).

Editorial Policies

Open Access and Article Publishing Charges at *E&H*. *E&H* is a fully open access journal, with all content published under an open access license. There is therefore no subscription charges and no charge to access, read, and download articles published in the journal. Authors of accepted manuscripts will need to pay an Article Publishing Charge (APC) to publish their research in *E&H*. The default license for authors will be CC BY-NC-ND, with the option to upgrade to CC BY. Country discounts apply for authors based in countries with lower-income economies, [detailed here](#). Authors from institutions with ACS Read + Publish Agreements are eligible to have their APC covered through these agreements. [Information can be found here](#).

Pricing details [can be found here](#). For assistance with open access, please contact support@services.acs.org.

The Peer-Review Process

Editors evaluate submitted manuscripts, and only those judged to fall within the scope of the journal and to be of potential interest to *E&H* readers are sent for external evaluation. Authors are required to suggest a minimum of four persons competent to review the manuscript from at least three different countries. Suggested referees may not be at the same institution as any of the manuscript authors, may not be former mentors or mentees, and they may not have a conflict of interest and/or have co-authored publications in the past 5 years with any of the authors.

Reviewers will evaluate the manuscript on the basis of originality, technical quality, clarity of presentation, and importance to the field. The editors evaluate the reviewers' arguments in the context

of the scope and aims of the journal and make the final decision on each manuscript. The possible decisions will be:

- accept;
- revise to address the concerns of the reviewers before the editors make a final decision;
- reject but consider a resubmission if significant additional work is completed; or
- decline on the grounds of major technical or interpretational flaws, insufficient advance, or lack of novelty and interest.

Editorial decisions are based on many factors, and reviewers' concerns are taken seriously. In cases when reviewers suggest different decisions, the editors may request additional information from the reviewers, consult other experts, and/or ask the authors to clarify sections in question. Some manuscripts that are declined may be considered upon resubmission if significant additional work is completed.

Reviewers may be asked to review subsequent versions of the manuscript, especially if new data have been added to the paper, to evaluate whether the authors have addressed the scientific concerns. In such cases, anonymized copies of all reviewers' comments are normally sent to the reviewers. This practice allows the reviewers to understand the expectations of the editors. The editors will expedite any additional rounds of reviews to ensure timely publication.

The editors strongly disapprove of any attempts by authors to determine the identity of reviewers or to confront potential reviewers. The editorial policy of this journal is neither to confirm nor to deny any speculation about the identities of our reviewers. The journal will not release the identity of a reviewer to the authors or to other reviewers. Authors whose manuscripts are published in *E&H* will be expected to review manuscripts submitted by other researchers from time to time. More information about peer review at ACS Publications can be [found here](#).

Appeals

Appeals are reviewed at the discretion of the editorial team, with a strong commitment to fairness and transparency. While all appeals receive careful consideration, authors should be aware that only a small proportion lead to a reversal of the original editorial decision.

To initiate an appeal, the corresponding author must email a formal appeal letter to the journal's editorial office or the handling editor. The corresponding author is responsible for ensuring all authors agree to submit an appeal. Appeals should be submitted within 1 month of receiving a decision. Your appeal letter should include:

1. Your manuscript ID
2. A clear rationale for why you disagree with the decision and include point-by-point responses to reviewer and/or editor comments

3. Evidence of any errors, potential reviewer conflicts of interest or other ethical considerations

You will receive an acknowledgement once your appeal is received. The editorial team may consult with additional editors to assess the merit of the appeal. Final decisions include upholding the original rejection, inviting a revised submission, initiating further review, or rejection with the option of transferring to another ACS journal.

Please note, only one appeal will be considered per manuscript, and all appeal decisions are final. An appeal is considered an extension of the manuscript submission process, therefore the same [ACS Ethical Guidelines](#) apply. Authors should not submit an appeal while the manuscript, or substantially similar research, is under consideration by another journal. Priority is given to active submissions under consideration. As such, decisions on appeals may take longer.

If the appeal is successful, the editorial office will provide guidance on next steps.

Providing Potential Reviewer Names

Please suggest at least four qualified reviewers. Authors are encouraged to avoid suggesting reviewers from the authors' institutions. Do not suggest reviewers who may have a [real or perceived conflict of interest](#). Whenever possible, suggest academic email addresses rather than personal email addresses.

Manuscript Transfer

If your submission is declined for publication by this journal, the editors might deem your work to be better suited for another ACS Publications journal or partner journal and suggest that the authors consider transferring the submission. [Manuscript Transfer](#) simplifies and shortens the process of submitting to another ACS journal or partner journal, as all the coauthors, suggested reviewers, manuscript files, and responses to submission questions are copied to the new draft submission. Authors are free to accept or decline the transfer offer.

Note that each journal is editorially independent. Transferring a manuscript is not a guarantee that the manuscript will be accepted, as the final publication decision will belong to the editor of the next journal.

PRODUCTION AND PUBLICATION

Proofs via ACS Direct Correct

Correction of the galley proofs is the responsibility of the Corresponding Author. The Corresponding Author of an accepted manuscript will receive e-mail notification and complete instructions when page proofs are available for review via [ACS Direct Correct](#). Extensive or important changes on page proofs, including changes to the title or list of authors, are subject to review by the editor.

It is the responsibility of the Corresponding Author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within 48 hours in order to ensure timely publication of the manuscript.

Publication Date and Patent Dates

Accepted manuscripts will be published on the ACS Publications Web site as soon as page proofs are corrected and all author concerns are resolved. The first date on which the document is published on the Web is considered the publication date.

Publication of manuscripts on the Web may occur weeks in advance of the cover date of the issue of publication. Authors should take this into account when planning their patent and intellectual property activities related to a document and should ensure that all patent information is available at the time of first publication, whether ASAP or issue publication.

All articles published ahead of print receive a unique Digital Object Identifier (DOI) number, which is used to cite the manuscript before and after the paper appears in an issue. Additionally, any supplemental information submitted along with the manuscript will automatically be assigned a DOI and hosted on Figshare to promote open data discoverability and use of your research outputs.

ASAP Publication

Manuscripts will be published on the "ASAP Articles" page on the web as soon as page proofs are corrected, all author concerns are resolved, and payment has been received. ASAP publication usually occurs within a few working days of receipt of page proof corrections (provided payment has been resolved), which can be several weeks in advance of the cover date of the issue.

Post-Publication Policies

The American Chemical Society follows guidance from the [Committee on Publication Ethics](#) (COPE) when considering any ethical concerns regarding a published article, Retractions, and Expressions of Concern.

Additions and Corrections

Additions and Corrections may be requested by the author(s) or initiated by the Editor to address important issues or correct errors and omissions of consequence that arise after publication of an article. All Additions and Corrections are subject to approval by the Editor, and should bring new and directly relevant information and corrections that fix scientific facts. Minor corrections and additions will not be published. Readers who detect errors of consequence in the work of others should contact the corresponding author of that work.

Additions and Corrections must be submitted as new manuscripts via the ACS Publishing Center by the Corresponding Author for publication in the "Addition/Correction" section of the Journal. The corresponding author should obtain approval from all coauthors prior to submitting or provide

evidence that such approval has been solicited. The manuscript should include the original article title and author list, citation including DOI, and details of the correction.

Retractions

Articles may be retracted for scientific or ethical reasons and may be requested by the article author(s) or by the journal Editor(s), but are ultimately published at the discretion of the Editor. Articles that contain seriously flawed or erroneous data such that their findings and conclusions cannot be relied upon may be retracted in order to correct the scientific record. When an article is retracted, a notice of Retraction will be published containing information about the reason for the Retraction. The originally published article will remain online except in extraordinary circumstances (e.g. where deemed legally necessary, or if the availability of the published content poses public health risks).

Expressions of Concern

Expressions of Concern may be issued at the discretion of the Editor if:

- there is inconclusive evidence of research or publication misconduct by the authors;
- there is evidence that the findings are unreliable but the authors' institution will not investigate the case;
- an investigation into alleged misconduct related to the publication either has not been, or would not be, fair and impartial or conclusive;
- an investigation is underway but a judgment will not be available for a considerable time.

Upon completion of any related investigation, and when a final determination is made about the outcome of the article, the Expression of Concern may be replaced with a Retraction notice or Correction.

Appendix 1: PREPARING FOR SUBMISSION

We've developed ACS' publishing and editorial policies in consultation with the research communities that we serve, including authors and librarians. Browse our policies below to learn more.

Ethical Guidelines

ACS editors have provided [Ethical Guidelines](#) for persons engaged in the publication of chemical research, specifically, for editors, authors, and reviewers. Each journal also has a specific [policy on prior publication](#).

OFAC Compliance

As a U.S.-based non-profit organization, the American Chemical Society (ACS) is required to comply with U.S. sanctions laws and regulations administered by the [U.S. Treasury Department's Office of Foreign Assets Control](#) (OFAC). While these laws and regulations permit U.S.-based publishers like ACS to engage in publishing-related activities with authors located in sanctioned regions in many cases, ACS may be prohibited under U.S. law from engaging in publishing-related activities in some

cases, including, but not limited to, instances where an author or the institution with which an author is affiliated is located in a particular sanctioned region or has been designated by OFAC as a [Specially Designated National](#) (SDN) pursuant to certain U.S. sanctions programs. ACS reserves the right to refrain from engaging in any publishing-related activities that ACS determines in its sole discretion may be in violation of U.S. law.

Safety Considerations

Authors must emphasize any unexpected, new, and/or significant hazards or risks associated with the reported work. This information should be in the Experimental Section of a full article and included in the main text of a communication or letter. Statement examples can be found in the [Safety Statement Style Sheet](#) and additional information on communicating safety information from the *ACS Guide to Scholarly Communication* [is freely available here](#).

Conflict of Interest Disclosure

A statement describing any financial conflicts of interest or lack thereof is published in each ACS journal and partner journal article.

During the submission process, the Corresponding Author must provide a statement on behalf of all authors of the manuscript, describing all potential sources of bias, including affiliations, funding sources, and financial or management relationships, that may constitute conflicts of interest. If the manuscript is accepted, the statement will be published in the final article.

If the manuscript is accepted and no conflict of interest has been declared, the following statement will be published in the final article: “The authors declare no competing financial interest.”

Plagiarism

In publishing only original research, ACS is committed to deterring plagiarism, including self-plagiarism. ACS Publications uses CrossCheck's iThenticate software to screen submitted manuscripts for similarity to published material. Note that your manuscript may be screened during the submission process.

Further information about plagiarism can be found in Part B of the [Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research](#). See also the [press release](#) regarding ACS' participation in the CrossCheck initiative.

Authorship, Author List, and Coauthor Notification

Authors are required to obtain the consent of all their coauthors prior to submitting a manuscript. The submitting author accepts the responsibility of notifying all coauthors that the manuscript is being submitted.

During manuscript submission, the submitting author must provide contact information (full name, email address, institutional affiliation, and mailing address) for all of the coauthors. Because all of

the author names are automatically imported into the electronic [Journal Publishing Agreement](#), the names must be entered into the submission system. (Note that coauthors are not required to register in the ACS Publishing Center.) Author affiliation should reflect where the work was completed, even if the author has since left that institution. Authors may include a note with a current address if their institution has changed since the work was completed.

To expedite the processing of your manuscript, please format your author and affiliation information according the guidelines in this [document](#).

Criteria for authorship can be found in Part B of the [Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research](#). Artificial intelligence (AI) tools do not qualify for authorship. As non-person entities, these tools can neither take responsibility for published content, nor can they assent to co-authorship. The use of AI tools for text or image generation should be disclosed in the manuscript within the Acknowledgments section with a description of when and how the tools were used. For more substantial use cases or descriptions of AI tool use, authors should provide full details within the Methods or other appropriate section of the manuscript. The authors of the work are responsible for all submitted content and agree upon submission that generated content from AI tools is appropriate, both scientifically and based on the [Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research](#). For more information on use of AI, please review the [ACS AI Best Practices and Policy](#).

Any changes to the authorship after initial submission require the completion of an [authorship change form](#). Confirmation that all authors (including those being added or removed) agree to the changes is required via the signed form. Please note that exceptions will not be made for large authorship lists and/or large numbers of changes. Authors must also provide a reason for each change and should explain how any added co-author(s) meet the authorship criteria as defined in the [Ethical Guidelines to Publication of Chemical Research](#). Authorship changes are subject to editorial approval and insufficient and/or inappropriate reasons for changes may result in manuscript rejection. In general, the addition of new authors will be deemed inappropriate unless fully explained and justified in the context of their scientific contributions to the work. Authorship changes post-acceptance will generally not be considered except in rare circumstances with full justification. For more information, please refer to the Authorship Changes section of the [Authorship Guidance & Policies](#).

Authors with a single name: If you, or any of your coauthors, have only one name, please follow these steps for proper submission to the ACS Publishing Center:

1. First (Given) Name Field: Enter an asterisk (*) into the "First (Given) Name" field.
2. Last (Family) Name Field: Enter your single name into the "Last (Family) Name" field.

If your paper is accepted, the asterisk (*) will be removed from the published version of the paper.

Patent Activities and Intellectual Property

Authors are responsible for ensuring that all patent activities and intellectual property issues are satisfactorily resolved prior to first publication (ASAP or in issue). Acceptance and publication will not be delayed for pending or unresolved issues of this nature.

Open Researcher and Contributor ID (ORCID)

Authors submitting manuscript revisions are required to provide their own personal, validated ORCID iD before completing the submission, if an ORCID iD is not already associated with their ACS Publishing Center user profiles. This ID may be provided during original manuscript submission or when submitting the manuscript revision. All authors are strongly encouraged to register for an ORCID iD, a unique researcher identifier. The ORCID iD will be displayed in the published article for any author on a manuscript who has a validated ORCID iD associated with ACS when the manuscript is accepted.

ORCID iDs should not be typed into the manuscript. ACS publishes only those ORCID iDs that have been properly verified and linked before the manuscript is accepted. After your ORCID iD is linked, it will be displayed automatically in all subsequently accepted manuscripts for any/all ACS journals. We do not publish ORCID iDs provided during proof review or via other communications after a manuscript is accepted for publication.

With an ORCID iD, you can create a profile of your research activities to distinguish yourself from other researchers with similar names, and make it easier for your colleagues to find your publications. If you do not yet have an ORCID iD, or you wish to associate your existing ORCID iD with your ACS Publishing Center account, you may do so by clicking on “Profile” from your ACS Publishing Center dashboard and following the ORCID-related links. Learn more at www.orcid.org.

Copyright and Permissions

To obtain forms and guidelines for completing the Journal Publishing Agreement or obtaining permissions from copyright owners, and to explore a Copyright Learning Module for chemists, click [here](#).

Funder Reporting Requirement

Authors are required to report funding sources and grant/award numbers. Enter ALL sources of funding for ALL authors in BOTH the Funder Registry Tool in the submission system and in your manuscript to meet this requirement.

Open Access Compliance

Authors publishing in *E&H* retain copyright of their published research and may publish via a choice of CC BY-NC-ND or CC BY license. ACS offers options by which authors can fulfill the requirements for open access and deposition into repositories for funded research. Visit our ACS

Open Science site to see [how to fulfill requirements for specific funders](#) and to find out if you are eligible to publish under a [read and publish agreement](#) between ACS and your institution. You can also find out more about [Open Access Compliance](#) and [ACS Open Science initiatives](#).

Diversity and Inclusion Statement

During manuscript submission, ACS journal authors have the option to submit a statement sharing information related to inclusion that is relevant for their paper. If supplying an inclusion statement, the corresponding author must provide this on behalf of all authors of the manuscript during the submission process. These statements include but are not limited to analysis of the paper's citations and acknowledgment of indigenous land on which research was conducted. Statements expressing political beliefs are not permitted and may be removed by the journal office. All statements are subject to final review by the Editor.

- Citation Statement: The citation statement should appear in the Acknowledgements section of the manuscript. ACS recommends including the following: (1) the importance of inclusive citation practices, (2) the proportion of citations by gender and race/ethnicity for the first and last authors, (3) the method used to determine those proportions and its limitations, and (4) steps taken by the authors to mitigate citation bias in the article. (Adapted from [BMES/Springer Guidelines](#))
- Land acknowledgment: The land acknowledgment statement should appear in the Acknowledgements section of the manuscript. The statement should link to the institutions' formal land acknowledgments on which the research took place, if possible. Further guidance for creating these statements can be found here: <https://nativegov.org/news/a-guide-to-indigenous-land-acknowledgment/>.

Appendix 2: Preparing Graphics

Resolution

Digital graphics pasted into manuscripts should have the following minimum resolutions:

- Black and white line art, 1200 dpi
- Grayscale art, 600 dpi
- Color art, 300 dpi

Size

Graphics must fit a one- or two-column format. Single-column graphics can be sized up to 240 points wide (3.33 in.) and double-column graphics must be sized between 300 and 504 points (4.167 in. and 7 in.). The maximum depth for all graphics is 660 points (9.167 in.) including the caption (allow 12 pts. For each line of caption text). Lettering should be no smaller than 4.5 points in the final published format. The text should be legible when the graphic is viewed full-size. Helvetica or Arial fonts work well for lettering. Lines should be no thinner than 0.5 point.

Color

Color may be used to enhance the clarity of complex structures, figures, spectra, and schemes, etc., and color reproduction of graphics is provided at no additional cost to the author. Graphics intended to appear in black and white or grayscale should not be submitted in color.

Avoid relying on color alone to represent information. Use indicators such as symbols, text labels, or patterns to ensure the data is accessible to those with color vision deficiency or other visual conditions. If color is necessary to understand data, such as in heat maps or fluorescence images, choose accurate and accessible color combinations. For additional guidance and suggested color schemes, see [How to Make Scientific Figures Accessible to Readers with Color-Blindness](#) and [Coloring Chemistry—How Mindful Color Choices Improve Chemical Communication](#).

Ensure the content within graphics has sufficient contrast against adjacent colors, including the background. Contrast ratios measure the difference in brightness between two adjacent colors, helping make text and images readable. The Web Content Accessibility Guidelines (WCAG) define [minimum contrast requirements](#) of 4.5:1 for text and 3:1 for nontext elements, with [some exceptions](#) for elements like large text.

Two tools to measure contrast are TPGi's [Colour Contrast Analyzer](#) and Web Accessibility in Mind's [Contrast Checker](#). To improve low contrast, increase the saturation of one of the colors, or use borders or other visual separators between adjacent colors. For additional information and examples, see [Color to convey meaning](#) and [Choosing color in data visualizations](#) in the ACS Inclusivity Style Guide.

Type of Graphics

Table of Contents (TOC)/Abstract Graphic

Consult the Guidelines for [Table of Contents/Abstract Graphics](#) for specifications.

Our team of subject-matter experts and graphical designers can also help generate a compelling TOC graphic to convey your key findings. Learn more about our [Graphical Abstract service](#).

Figures

A caption giving the figure number and a brief description must be included below each figure. The caption should be understandable without reference to the text. It is preferable to place any key to symbols used in the artwork itself, not in the caption. Ensure that any symbols and abbreviations used in the text agree with those in the artwork.

Charts

Charts (groups of structures that do not show reactions) may have a brief caption describing their contents.

Tables

Each table must have a brief (one phrase or sentence) title that describes the contents. The title should be understandable without reference to the text. Details should be put in footnotes, not in the title. Tables should be used when the data cannot be presented clearly in the narrative, when many numbers must be presented, or when more meaningful inter-relationships can be conveyed by the tabular format. Tables should supplement, not duplicate, information presented in the text and figures. Tables should be simple and concise, so avoid merging or splitting cells.

Schemes

Each scheme (sequences of reactions) may have a brief caption describing its contents.

Chemical Structures

Chemical structures should be produced with the use of a drawing program such as ChemDraw.

Cover Art

E&H authors are encouraged to submit images to be considered for use on the journal's front cover or [Supplementary Covers](#) at the time of the submission of their revised manuscript. If your article is accepted for publication, your suggestion may also be selected for use on one of the journal's covers. Images chosen for the front cover will be published at no cost to the author.

Cover image submissions should be colorful and visually engaging, with minimal text. The cover image should not resemble a graphical abstract or data figure, but rather should be an artistic and scientifically accurate representation of the manuscript.

Image files should be submitted as TIF, JPG, PNG, or EPS files (not PDF or PPT) with a resolution of at least 300 dpi for pixel-based images. Cover art should be 8.19 inches (20.8 cm) wide × 10.00 inches (25.4 cm) high at 300 ppi, and submission of "layered" artwork is encouraged. The journal's logo will obscure the top 2.5 inches (6.35 cm) of the image. Authors should submit the cover image, along with a short (<50-word), clear legend explaining the image, as supplementary files to the ACS Publishing Center with their revised manuscript. Any use of AI tools must comply with [ACS Artificial Intelligence Best Practices](#) and be disclosed in the cover caption. For any questions about AI use in cover art, please contact ACSPubsMultimedia@acs.org.

If you wish to be considered only for the front cover, and not a paid supplementary cover, please respond NO accordingly to the Supplementary Cover Art question in the submission system. For more information on the Supplementary Covers program, please see the [Supplementary Cover Art webpage](#). All art submitted for consideration for a supplementary cover will also be considered for a front cover.

Web Enhanced Objects (WEO)

The Web editions of ACS journals allow readers to view multimedia attachments such as animations and movies that complement understanding of the research being reported.

WEOs should be uploaded in the submission system with ‘Web Enhanced Object’ selected as the file designation. Consult the list of [compatible WEO formats](#).