

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

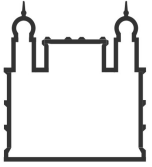
WAGNER THADEU CARDOSO ESTEVES

“Avaliação do impacto microbiológico por *Campylobacter* spp. no baixo curso do rio São João - RJ - Brasil.”

Orientadores: Aldo Pacheco Ferreira e Salvatore Siciliano

Dissertação elaborada junto ao Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Saúde Pública e Meio Ambiente da ENSP Área de Concentração em Gestão de Problemas Ambientais e Promoção da Saúde para obtenção do Título de Mestre.

Fevereiro / 2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

WAGNER THADEU CARDOSO ESTEVES

“Avaliação do impacto microbiológico por *Campylobacter* spp. no baixo curso do rio São João - RJ - Brasil.”

Orientadores: Aldo Pacheco Ferreira e Salvatore Siciliano

Fevereiro / 2009

Comissão Examinadora:

Aldo Pacheco Ferreira

Salvatore Siciliano

Inês Echenique Mattos

Julio Domingos Nunes Fortes

Wagner Thadeu Cardoso Esteves

Rio de Janeiro, 27 de fevereiro de 2009

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

Esteves, Wagner Thadeu Cardoso

Avaliação do impacto microbiológico por *Campylobacter*
spp. no baixo curso do rio São João. / Wagner Thadeu Cardoso
Esteves. Rio de Janeiro : s.n., 2009.

87 p., il., tab., graf., mapas

Orientador: Ferreira, Aldo Pacheco
Siciliano, Salvatore

Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Nacional de
Saúde Pública Sergio Arouca

1. *Campylobacter*. 2. Rio São João. 3. Análise
Bacteriológica. 4. Impacto Microbiológico. 5. Meio Ambiente.

Aos meus pais, ambos importantes na minha vida,
e a minha Jôjô...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Pacheco Ferreira, orientador desta dissertação, por sua participação com discussões, correções e revisões, sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

Ao Prof. Dr. Salvatore Siciliano, co-orientador desta dissertação, por sua ajuda e interesse, avaliações, correções e sábias idéias.

A Prof. Dra. Ana Luzia Lauria Filgueiras pela sua amizade, competência na área da bacteriologia e colaboração incondicional na provisão de toda a logística e necessidades laboratoriais durante a realização deste trabalho. Agradeço também às suas sugestões durante meu exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Ernesto Hofer, chefe do Laboratório de Zoonoses Bacterianas não só pela minha liberação durante a realização dos créditos, mas pela disponibilização do transporte para as coletas e de recursos, caso fossem necessários, aos meus experimentos.

À Prof. Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira pelo carinho, agilidade, organização e auxílio na realização dos experimentos moleculares e revisão final do trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente: Prof. Dr. Sergio Koifman e Prof. Dr. Aldo Pacheco Ferreira, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

Aos professores Dra. Inês Echenique Mattos, Dr. Julio Domingos Nunes Fortes e Dr. Vinicius de Oliveira pela participação ativa como membros da banca prévia, por

suas sugestões, exemplos e críticas fundamentais na re-elaboração da abordagem que eu vinha fazendo sobre o tema.

As colegas do Setor de *Campylobacter* Jaqueline Dárc da Silva Thomé, Sheila da Silva Duque e Grazielle Mendes da Silva por sempre me incentivarem na busca do crescimento, sendo exemplos de companheirismo, competência, garra, determinação e disciplina.

Aos professores e colegas de pós-graduação da ENSP, pelo convívio agradável.

A todos os membros da banca que aceitaram participar da avaliação desta dissertação.

A SECA, ENSP e IOC pelo acolhimento, disponibilização das instalações e serviços.

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Despertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade."

Rui Barbosa.

RESUMO

A campilobacteriose, apesar de pouco estudada, pode representar um problema de Saúde Pública em nosso País, tendo em vista as precárias condições sanitárias de boa parte da população. Entretanto, sua aquisição, manutenção e transmissão no Brasil só poderão ser estimadas e valorizadas a partir de investigações criteriosas, incluindo não só as pesquisas zoonóticas em humanos e animais, mas também relacionadas ao ambiente. Durante o período de agosto de 2007 a dezembro de 2008 investigou-se, a presença de *Campylobacter* spp. como potencial indicador microbiológico de contaminação em amostras de água do baixo curso do rio São João – RJ. O sítio de estudo, localizado na Região dos Lagos, serve como modelo de regiões que apresentam importantes atividades turísticas e econômicas, possuindo grande afluxo populacional, que promove desequilíbrios e impactos ao ecossistema. O trabalho incluiu também a pesquisa deste microrganismo na água de abastecimento da população local, poços, e fezes de voluntários, tendo sido isolados 28 representantes deste gênero. No processo de isolamento e identificação realizou-se a metodologia clássica fenotípica seguida da análise genotípica onde foram caracterizadas as seguintes espécies: *C. jejuni* (50%), *C. coli* (21,43%) e *Campylobacter* sp. (28,57%). O alto índice de isolamento de *Campylobacter* no rio São João, (em todos os pontos de coleta) indica a contaminação por essas bactérias e sua possível manutenção natural no ambiente. Todavia sua total ausência na água distribuída pela rede pública sugere efetividade no processo de tratamento, já que a água é retirada da lagoa de Juturnaíba, um dos pontos que apresentou maior percentual de positividade para este gênero dentro do nosso estudo. O estabelecimento no futuro de um manejo mais adequado para esse manancial representará a melhoria da qualidade de vida da população do entorno, diretamente exposta, proporcionando também a redução dos problemas de saúde pública decorrentes do uso de água contaminada.

ABSTRACT

The campylobacteriosis, although little studied, may represent a public health problem in our country, given the precarious health conditions of much of the population. However, its acquisition, maintenance and transmission in Brazil can only be estimated and valued from research on, including not only the research zoonoses in humans and animals, but also related to the environment. During the period August 2007 to December 2008 it was investigated, the presence of *Campylobacter* spp. as a potential indicator of microbiological contamination in water samples in the lower course of the São João river - RJ. The site of study at Lake's Region, serves as a model for regions that have major economic and tourist activities, with major population influx, which promotes imbalances and impacts on ecosystems. The work also included a search of this microorganism in the water supply of the local population, wells, and feces of volunteers, 28 isolates were representatives of this genus. In the process of isolation and identification was held on classic phenotypic methods followed by genetic analysis which were characterized the species: *C. jejuni* (50%), *C. coli* (21.43%) and *Campylobacter* sp. (28.57%). The high rate of isolation of *Campylobacter* in the river São João, (in all the collection points) indicates that contamination by these bacteria and their possible retention in the natural environment. However its total absence in the water distributed by public, suggests efficacy in the treatment process, due to the fact that water is removed from the lagoon of Juturnaíba, a point which had a higher percentage of positivity for this genus within our study. The future establishment of a more appropriate management for this source will improve the quality of life of the surrounding area, directly exposed, providing also the reduction of public health problems arising from the use of contaminated water.

Sumário

	Pag.	
1.	Introdução	1
2.	Referencial Teórico	4
2.1	A Legislação das águas	4
2.2	Disponibilidade hídrica: a visão regional	7
2.3	O abastecimento de água	9
2.4	Poluição dos recursos hídricos e efeitos na saúde humana	13
2.4.1	Indicadores Comuns de Poluição Hídrica	16
2.4.1.1	Coliformes	16
2.4.1.2	Coliformes Totais e Coliformes Fecais	17
2.4.1.3	<i>Campylobacter</i> spp.	20
2.4.1.3.1	Características da doença: campilobacteriose	22
3.	Perguntas Conductoras	25
4.	Justificativa	26
5.	Objetivos	29
5.1	Objetivo Geral	29
5.2	Objetivos Específicos	29
6.	Metodologia	30
6.1	Área de estudo	30
6.2	Delineamento do estudo	31
6.2.1	Amostras ambientais	32
6.2.2	Amostras de fezes de origem humana	33
6.2.3	Amostras de fezes de origem animal	35
6.3	Metodologia Laboratorial	36
6.3.1	Metodologia para análise de amostras de água	36
6.3.2	Metodologia para análise de amostras de origem fecal (humana e animal).	39
6.3.3	Experimentos de Biologia Molecular	40

	Pag.	
6.3.3.1	Extração do DNA	40
6.3.3.1.1	Método da Lise com Isotiocianato de Guanidina	41
6.3.3.1.2	Método de Extração e Purificação Através do Kit Comercial G&E	42
6.3.3.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	43
6.3.3.2.1	Genes associados ao gênero	43
6.3.3.2.2	Gene flaA	44
6.3.3.2.3	Reação com os iniciadores C1 e C4	45
6.3.3.2.4	Outros Genes associados à virulência	46
6.3.3.3	Análise dos produtos da PCR	46
7.	Resultados	48
7.1	Amostras ambientais	48
7.2	Amostras de fezes	49
8.	Discussão	57
9.	Conclusões	66
10.	Perspectivas de estudos futuros e recomendações	69
11.	Referências Bibliográficas	70
12.	Anexos	87

Lista de Figuras

	Pag.
1. Fotografia por Microscopia Eletrônica - demonstração da morfologia celular típica de bactérias do gênero <i>Campylobacter</i> .	20
2. Bacia Hidrográfica do rio São João.	31
3. Localização dos pontos de coleta no baixo curso do rio São João.	32
4. Resultado da PCR associada a diferenciação das espécies	51
5. Gel de agarose a 1% utilizado para visualizar a qualidade do DNA das amostras extraídas pela técnica da Guanidina.	52
6. Géis de agarose demonstrando o resultado da PCR com os <i>primers</i> associados a diferenciação das espécies.	53
7. Gel da PCR realizada com os <i>primers</i> de gênero (Linton et al.1996).	54
8. Gel da PCR realizada com os <i>primers</i> de gênero, amostras extraídas pelo método da Guanidina.	54
9. Gel da PCR realizada com os <i>primers</i> de gênero, amostras extraídas pelo Kit G&E.	54
10. Gel de agarose a 1% utilizado para visualizar a qualidade do DNA das amostras extraídas pela técnica do Kit G&E.	55
11. Gel da PCR realizada com os <i>primers</i> de gênero, amostras extraídas pelo Kit G&E.	55
12. Gel de agarose realizado com os <i>primers</i> para evidenciação de presença de adesina (colonização)	56

Lista de Quadros

	Pag.
1. <i>Primers</i> usados para PCR neste estudo.	43
2. Perfil de pH/ temperatura das amostras de água por ponto de coleta.	48
3. Altura do nível do rio/ horário das coletas baseado na tabela de marés do Porto do Forno – Arraial do Cabo/RJ.	48
4. Resultados positivos para <i>Campylobacter</i> nas amostras de origem ambiental por pontos de coleta.	49
5. Características do material de origem fecal humano analisado.	50

Lista de Gráficos

	Pag.
1. Percentuais de positividade de <i>Campylobacter</i> em amostras coletadas de animais relacionados aos casos positivos em humanos.	50

1. INTRODUÇÃO

A saúde ambiental como subárea da saúde pública, busca articular o conhecimento científico interdisciplinar, de forma a contribuir para a formulação de políticas públicas para o desenvolvimento humano sustentável, através da inter-relação entre os aspectos do ambiente que impactam a saúde e vice-versa, como forma de entender cada vez mais esse processo interativo e dinâmico, proporcionando mitigar com ações concretas os agravos à saúde e ao ambiente (Tucci et al. 2000).

Do ponto de vista da questão saúde, a influência do ambiente pode ser positiva ou negativa, na medida em que promova condições que propiciem o bem estar e a plena realização das capacidades humanas para todas as populações ou contribuam para o aparecimento e manutenção de doenças, agravos e lesões traumáticas colaborando para o aniquilamento e morte da população como um todo ou para grupos populacionais particulares (Geo-Brasil 2002).

A promoção do acesso à água de qualidade e a proteção contra os riscos decorrentes dos contaminantes de importância e repercussão na saúde pública nela presentes, são de grande relevância para a humanidade (Lehtola et al. 2006, Fernandes Neto & Ferreira 2007). Nesse aspecto, o Conselho Nacional de Saúde apresenta à sociedade brasileira os maiores desafios atuais para o Sistema Único de Saúde (SUS): estruturação do novo modelo de atenção a saúde que, a partir da grande função de saúde pública, subordine os conceitos e programas de assistência médica individual aos preceitos e programas dos interesses coletivos e direitos da

cidadania, e realize, efetivamente, as ações de promoção e proteção da saúde (Brasil 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS 2001), cerca de 85% das doenças conhecidas são de veiculação hídrica, ou seja, estão relacionadas à água. O agravo em saúde, mais comumente associado à água contaminada por esgotos, é a gastroenterite, que pode levar, principalmente as crianças, à desidratação (Scarcelli et al. 1998). A OMS (2000) destaca o fato do *Campylobacter jejuni* ser o agente mais freqüentemente relatado nos casos de gastroenterite em seres humanos nos países desenvolvidos. Sua presença remete a diarreia aguda com cólicas abdominais, onde pessoas de todas as idades podem ser afetadas pela doença (Butzler, 2004).

Isso acontece porque o contato entre as pessoas e as fontes de contaminação é pouco freqüente, não propiciando o desenvolvimento precoce da imunidade, levando a quadros graves de gastroenterite aguda quando ocorre o primeiro contato (Butzler, 2004). Ao contrário, em países em desenvolvimento, as infecções são muito freqüentes e os indivíduos tornam-se imunes no primeiro ano de vida, dificultando a ocorrência de casos sintomáticos em crianças maiores ou em adultos (Rees et al. 1995, Cowden 1992).

No Brasil, há relatos da presença de *Campylobacter* spp. em fezes de indivíduos com diarreia aguda ou crônica e até mesmo, em indivíduos assintomáticos, observando-se que a ocorrência nos quadros diarreicos tem variado

entre 2,3% a 17,0%, dependendo da faixa etária e das condições socioeconômicas dos pacientes (Viana et al. 1986, Pavan et al. 1988, Ruiz-Esqvide et al. 2003).

Por ser pouco estudado na América Latina, *Campylobacter* tem sido negligenciado em investigações, da área de saúde pública, realizadas no Brasil, principalmente naqueles que tentam associar os distúrbios gastrintestinais a problemas relacionados ao manejo do ambiente. Todavia, por seu potencial de veiculação hídrica, há subsídios científicos que apontam ser de suma importância obter dados sobre sua distribuição no ambiente e possíveis portadores, bem como sobre sua relação com acometimentos diarreicos na população, sendo esta a vertente exploratória desta dissertação.

Levando em conta os trabalhos anteriores e considerando a avaliação sanitária como parâmetro de qualidade de uma bacia hidrográfica, neste trabalho pesquisamos *Campylobacter* spp. como possível indicador de degradação hídrica do rio São João, em amostras de água do rio, na água de abastecimento e em amostras obtidas de indivíduos voluntários, com ou sem quadro de diarreia, que procuraram atendimento nos serviços de saúde da localidade ou freqüentadores de estabelecimentos como associações de moradores e entidades privadas de serviço à população.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Na área de saúde pública é extremamente importante avaliar as relações existentes entre medidas de saneamento e saúde de populações humanas. A relação do processo saúde-doença com as ações de infra-estrutura de saneamento tem sido reconhecida pelos mais diversos organismos do setor, inclusive os internacionais como a Organização Mundial da Saúde (OMS).

No Brasil, essa preocupação se estabeleceu principalmente a partir da década de 1980 e tomou vulto nos últimos anos, principalmente pelo interesse científico na percepção do afastamento entre as políticas públicas do setor de saneamento básico e a visão de saúde pública (Bonatto 2000). O reconhecimento desta sistemática estimula entidades do setor de saúde no Brasil a aprofundar as questões da relação saneamento-saúde, aperfeiçoando as abordagens nas práticas de ações de saneamento (Cook & Bolster 2007).

2.1. A Legislação das águas

O marco legal na gestão dos recursos hídricos no Brasil é o Código de Águas, estabelecido em 1934, pelo Decreto Federal nº: 24.643. O código foi instituído no momento em que o Brasil passava de uma economia baseada no setor agrário para uma economia urbano-industrial e necessitava da produção de energia hidrelétrica para movimentar esse setor.

Segundo Leal (1998), apesar do Código ser antigo, ele estabeleceu aspectos importantes e conceitos atuais sobre a gestão das águas, como:

- a) A aplicação do princípio de usuário-pagador: no parágrafo 2º do artigo 36, é definido que "o uso das águas pode ser gratuito ou retribuído".
- b) A necessidade de preservação das condições da água pelo usuário de montante perante os usuários de jusante, colocada no Título III, que regulamenta o aproveitamento das águas comuns.
- c) O regime de outorga, estabelecido pelo artigo 43, definindo que "as águas públicas não podem ser derivadas para as aplicações da agricultura, da indústria e da higiene sem a existência de concessão administrativa".
- d) A definição do uso prioritário da água para o abastecimento público: no artigo 36 fica estabelecida a "preferência da derivação para o abastecimento das populações".
- e) A defesa do aproveitamento múltiplo das águas, colocada pelo artigo 51, estabelecendo que "em regulamento administrativo se disporá sobre as condições de derivação, de modo a conciliarem quanto possível os usos a que as águas se prestam".

Vários desses princípios são bastante atuais, porém não foram aplicados por falta de uma regulamentação específica. Para Leal & La Rovere (1997) isso mostra que uma legislação adequada é fundamental, mas não suficiente para estabelecer determinadas práticas, sendo necessário também um quadro institucional e uma situação política que possibilitem sua regulamentação e aplicação.

A Constituição Federal de 1988 estabelece apenas dois domínios para os corpos d'água: (1) domínio da União, para rios e lagos que banhem mais de um estado, ou que sirvam de fronteira entre essas unidades, ou de fronteira entre o Brasil e países vizinhos, ou deles provenham ou para eles se estendam e (2)

domínio estadual, para os corpos d'água que se situem exclusivamente em um estado (MMARH 1997).

A Política Nacional de Recursos Hídricos, prevista na Constituição de 1988, estabelecida pela Lei nº 9.433 em janeiro de 1997, é um reflexo da projeção mundial de cenários catastróficos em relação à disponibilidade de água doce suficiente para abastecer as futuras gerações. O Brasil, com essa política, passa a adotar instrumentos de gestão já implementados em outros países, como França e a Alemanha, e que vêm sendo incentivados por acordos internacionais (MMARH 1997). O Capítulo 18 item 16 da Agenda 21 coloca como pré-requisito para um manejo sustentável da água o reconhecimento de seus custos totais, através de cobrança de tarifas que reflitam o custo real da água, quando usada como bem econômico (Agenda 21 1992).

Alguns princípios básicos importantes, a serem considerados, foram estabelecidos no artigo 1º da Lei das Águas:

- (1) a adoção da bacia hidrográfica como uma unidade de planejamento;
- (2) o uso múltiplo das águas;
- (3) o reconhecimento da água como um bem natural limitado;
- (4) o reconhecimento do valor econômico da água e
- (5) a gestão descentralizada e participativa.

No artigo 5º, ficaram estabelecidos instrumentos para viabilizar a aplicação dos princípios da lei:

- (1) o Plano Nacional de Recursos Hídricos;

- (2) a outorga de direito de uso dos recursos hídricos;
- (3) a cobrança pelo uso da água;
- (4) o enquadramento dos corpos d'água em classes de uso e
- (5) o Sistema Nacional sobre Recursos Hídricos.

O item 2, ou seja, a outorga de direito de uso dos recursos hídricos é um instrumento pelo qual o usuário recebe uma autorização para fazer uso da água. Este instrumento disciplina o uso dos recursos hídricos e constitui-se, assim, no elemento central de controle para o seu uso racional (MMARH 1997).

A Constituição Federal de 1988 e as Constituições Estaduais de 1989 permitiram que os estados também elaborassem sua própria legislação sobre recursos hídricos. As leis estaduais devem seguir os princípios da lei federal, porém podem detalhar aspectos específicos da região e criar seus próprios sistemas de gestão com diferentes estruturas institucionais (Rato & Macedo 1997). No Rio de Janeiro, a Política Estadual de Recursos Hídricos foi instituída em agosto de 1999, pela Lei nº 3.239, quando também foi criado o Sistema Estadual de Gerenciamento de Recursos Hídricos. A Lei Estadual segue os mesmos fundamentos e diretrizes da Lei Federal nº 9.433/97, porém expande sua abrangência para as águas subterrâneas.

2.2. Disponibilidade hídrica: a visão regional

O potencial hídrico do estado do Rio de Janeiro é de aproximadamente 30 km³/ano, o que resulta em disponibilidade *per capita* em torno de 2,2 mil m³/ano (Setti et al. 2001). Esta disponibilidade hídrica é suficiente para atender às

demandas atuais de consumo, mas está próxima a uma potencial escassez, e coloca o estado em sétimo lugar entre os de menor disponibilidade no país.

Estima-se que as demandas para usos preponderantes (abastecimento público, irrigação e uso industrial) estejam na faixa de 10% da disponibilidade (Demanboro & Mariotoni 2001), o que indica que investimentos significativos serão necessários no futuro.

A Serra do Mar, que atravessa longitudinalmente o estado do Rio de Janeiro, é o grande divisor de águas desse estado, separando a drenagem natural em duas principais vertentes, a do Rio Paraíba do Sul e a Atlântica.

A vertente Atlântica corresponde a cerca de 40% do território fluminense, agrupando cerca de 80% da população do estado. Como o divisor de águas é vizinho ao litoral, não há o desenvolvimento de uma grande bacia hidrográfica, mas a formação de dezenas de bacias, de variados tamanhos, que nascem na Serra do Mar e deságuam nas lagoas costeiras, baías ou diretamente no Oceano Atlântico. Geralmente, essas bacias possuem uma grande amplitude altimétrica e um canal de drenagem principal pouco extenso, resultando em alta declividade no alto curso, o que gera uma abrupta ruptura de declive, quando os canais alcançam as planícies costeiras, predominantemente, de pequenas extensões (Francisco & Carvalho 2004).

A bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul é a maior do estado, com uma área correspondente a 57% no território fluminense. Esta bacia é responsável pelo fornecimento hídrico de cerca de 11 milhões de habitantes, residentes entre os

municípios de Resende e Campos. Por atravessar três estados: Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, o rio Paraíba do Sul é de âmbito federal. Em território fluminense, sua bacia é formada por diferentes sub-bacias cujas nascentes estão no reverso da Serra do Mar e são responsáveis pelo provimento dos municípios serranos (Francisco & Carvalho 2004).

A região abrangida pela bacia hidrográfica do rio São João está localizada na zona leste do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, entre as coordenadas de 22° 22' e 22°50' da latitude sul e de 42°00' e 42°4 0' de longitude oeste e possui aproximadamente de 2190 km² de área, abrangendo 06 municípios: Silva Jardim (45,5%), Araruama (17,7%), Casimiro de Abreu (16,4%), Rio Bonito (11,4%), Cabo Frio (8,3%) e Cachoeiras de Macacu (0,6%) (Saunders & Rezende 2003).

O rio São João nasce na Serra do Sambê, nos contrafortes da Serra do Mar, a uma altitude de 740m, no município de Cachoeiras de Macacu, percorre a região no sentido oeste-leste, indo desaguar no Oceano Atlântico após 150 km de extensão (Saunders & Rezende 2003).

2.3. O abastecimento de água

No estado, o principal sistema de suprimento de água é o rio Guandu, que abastece a cidade do Rio de Janeiro e a Baixada Fluminense, apresentando uma capacidade compatível com a necessidade de 9,6 milhões de habitantes. Apesar do Guandu se localizar na Vertente Atlântica, recebe águas do rio Paraíba do Sul, através de uma transposição em Barra do Pirai, com desvio de 120 m³/s, enquanto a

sua vazão média original é de apenas 3,2 m³/s. A vazão distribuída para o abastecimento pelo sistema é de 40 m³/s (Selles 2002).

A cidade do Rio de Janeiro e a Baixada Fluminense também são abastecidas por Ribeirão das Lajes, além de outros mananciais menores que formam pequenos sistemas de abastecimento. A represa de Ribeirão das Lajes apresenta uma capacidade de atendimento de 1,1 milhão de habitantes, com uma vazão distribuída de 5 m³/s (Francisco & Carvalho 2004).

A bacia do rio Macacu, localizada na Vertente Atlântica e com um total de 1.260 km² é responsável, através do sistema Imunana-Laranjal, pelo abastecimento dos municípios de Itaboraí, São Gonçalo e Niterói, atendendo a 8% da população total do estado, ou seja, 1,2 milhão de habitantes (Francisco & Carvalho 2004).

Localizada na bacia do rio São João, com uma área de 2.190 km², a lagoa de Juturnaíba, também na Vertente Atlântica, abastece os municípios da região dos lagos. Atendendo uma população de aproximadamente 490 mil habitantes, este sistema distribui uma vazão de 1,3 m³/s, sendo que durante os feriados e o período de verão, a população quase quadruplica (Planágua 2001). Deve-se destacar que esta região é a mais seca do estado, e que o rio São João não corta esta região, ou seja, a solução de abastecimento desta área já é feita pela transposição de águas entre regiões (Francisco & Carvalho 2004).

Diante disto, as pequenas bacias hidrográficas irão sofrer impacto crescente, não só para atender à demanda de água nas cidades médias, como também pelo

próprio crescimento demográfico nestas cidades, levando à ocupação, nem sempre planejada, destas bacias. Ao lado disso, as soluções para atender à nova demanda devem ser adotadas por municípios, onde recursos econômicos e humanos são restritos (Tucci et al. 2000) e a responsabilidade político-administrativa sobre corpos d'água que cruzam o território não está contemplada na esfera municipal, conforme a legislação federal e estadual (Milaré 2000).

Outros fatos devem ser destacados em relação ao abastecimento de água no estado do Rio de Janeiro:

- a) O rio Paraíba do Sul, principal manancial do estado, possui alto nível de poluição. Segundo o Comitê para Integração da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul (CEIVAP), a bacia recebe 1 bilhão de litros de esgoto não tratado, além dos lançamentos industriais tóxicos e de resíduos sólidos (Planáguia 2001).
- b) Na região serrana, ocorre a maior regularidade das chuvas, demonstrando a importância da preservação dos retalhos de Mata Atlântica ainda presentes na área, garantindo assim a reposição de água das pequenas bacias hidrográficas do estado.
- c) Os municípios se situam geralmente, em pequenas bacias hidrográficas, portanto as soluções para o provimento de água são baseadas nestes mananciais.
- d) A existência de uma região no estado (região dos lagos), onde há *déficit* hídrico, e que já está sendo abastecida pela bacia do rio São João, situada fora da região.
- e) A potencial insuficiência hídrica do estado agravada pela poluição do principal manancial do estado, rio Paraíba do Sul, fazendo com que as pequenas e médias bacias hidrográficas, cujas nascentes se encontram no estado, tornem-se alternativas de abastecimento para as cidades médias, como já ocorre com as

bacias de Cachoeiras de Macacu e São João, que juntas abastecem cerca de 14% da população fluminense.

Na década de 70, a bacia hidrográfica do rio São João sofreu intensas modificações, sendo a principal delas a construção da barragem de Juturnaíba, objetivando armazenar 100 milhões de metros cúbicos de água (a segunda reserva de água doce do estado do Rio de Janeiro), abastecer os municípios da Região dos Lagos, fornecer água para a Companhia Nacional de Álcalis em Arraial do Cabo e propiciar a irrigação no baixo curso do rio São João. A Barragem de Juturnaíba tem como seus principais formadores os rios Bacaxá, Capivari e São João (Cide 2001, Rios & Berger 2002, Saunders 2003).

Visando o saneamento da região, os leitos dos principais rios da bacia foram retificados, porém, na época, não se realizaram estudos de impacto ambiental. Esse conjunto de obras trouxe diversos problemas ambientais. Uma vez que essas obras foram realizadas em área de várzea, que apresenta restrições à drenagem, provocando contaminação das águas e toxidez, tanto para as plantações predominantemente de arroz, quanto para os organismos aquáticos (Barroso 1988).

Na maioria dos países da Europa, durante a primeira metade do século XIX, houve a retificação de muitos rios e córregos, com o objetivo de proteger zonas urbanas, vias de transporte e terras agrícolas contra enchentes. A tecnologia empregada usualmente era alterar os leitos dos rios em perfis regulares e muitas vezes revestidos, sem considerações ou estudos de impactos ambientais. Essas

obras tiveram resultados negativos, causando o desaparecimento de cerca de 75% da fauna dos rios e baixadas (Binder 1998).

Os estudos dos efeitos de retificação de rios na América do Norte também são importantes. Em suas pesquisas, realizadas entre 1940 e 1985, Brookes (1988), descreve igualmente um desequilíbrio na biota local, levando a uma redução de 80% dos peixes. Segundo a SEMADS (2001), nesses casos, é necessária, dentre várias medidas gerais importantes para uma renaturalização, a busca da manutenção da morfologia mais natural dos rios, através de técnicas de engenharia ambiental; arborizar e/ou estabelecer a vegetação espontânea marginal; restabelecer a continuidade dos cursos d'água para fauna migratória (piracema), bem como restabelecer os locais para desova e biótopos aquáticos.

No Brasil, esse tipo de estudo foi realizado no Município de Macaé, no Rio de Janeiro. Através de um esforço interdisciplinar, o rio São Pedro foi renaturalizado com aplicação de obras de engenharia ambiental e arborização, tendo sido também promovido o crescimento da mata ciliar. Existem também propostas para renaturalização de rios da bacia hidrográfica do rio São João. Local onde foi realizada a pesquisa (Saunders & Nascimento 2006).

2.4. Poluição dos recursos hídricos e efeitos na saúde humana

Segundo Soares & Ferreira (2004), sob aspectos da gestão ambiental, o termo contaminação é usado para expressar as modificações das características naturais ambientais, causada por elementos que, lançados na água, no ar, no solo, os tornam diferentes e nocivos, seja pela presença de substâncias tóxicas, ou pela

existência de agentes patogênicos, prejudicando o substrato, ou o entorno, em tal grau que crie ou ofereça riscos reais à vida e à saúde. O elemento contaminante é de caráter ativo e deve ser encarado como um problema de saúde pública.

A palavra contaminar tem origem latina “*contaminare*”, significando misturar, como também, infectar, sujar, manchar. A palavra poluição advém do latim “*polluere*”, significando manchar, sujar, sendo usada desde épocas em que se reconheciam apenas os efeitos estéticos e sensoriais oriundos do despejo de resíduos putrefatos ao ambiente (Pádua 2003). Portanto, poluição é considerada como qualquer modificação nas características do meio e ou ambiente, capaz de torná-los nocivos à saúde, à natureza, à segurança e ao bem-estar, prejudicando o equilíbrio natural.

A nocividade da poluição é de caráter passivo, originada pelo agente chamado poluente, através de práticas irracionais e desfavoráveis como, por exemplo, o uso abusivo de fertilizantes químicos e o lançamento de águas servidas em um corpo receptor (Pádua 2003).

A água ou corpo receptor funciona como veículo do possível agente contaminante, apresentando ou não perturbações visíveis. A “água servida”, por exemplo, pode funcionar como poluente, já que pode possuir contaminantes, como organismos patogênicos e elementos tóxicos, produzindo, em estado avançado de contaminação e concentração, alterações visíveis, estéticas, concretas ou mesmo sensoriais, no meio ambiente(Pádua 2003).

Muitos microrganismos (ex: *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Candida albicans* e *Vibrio* spp.) estão presentes em esgotos, os quais podem ser despejados nos diversos sistemas aquáticos, entre eles rios e áreas costeiras. O monitoramento destes microrganismos é difícil e, sobretudo, dispendioso se comparado ao efetuado com outros indicadores da qualidade sanitária das águas, tais como os coliformes fecais, provenientes das fezes humanas.

O grupo das bactérias, mais numeroso entre os citados, pode causar sérios agravos na população que venha a entrar em contato com a água contaminada desses ambientes, provocando algumas enfermidades como gastroenterites, dermatites, cólera, entre outras (Vinten et al. 2004).

Gastroenterite é um termo geral que se refere a um grupo de distúrbios infecciosos, cujos sintomas incluem a perda de apetite, náusea, vômito, dores de estômago, diarreia de leve a intensa, dor tipo cólica e desconforto abdominal (Viana et al. 1986, Pavan et al. 1988, Obi et al. 2003). Juntamente com a perda de água do organismo, são perdidos também eletrólitos (sobretudo sódio e potássio) (Esteves et al. 2005). Para o adulto saudável, o desequilíbrio eletrolítico pode ser apenas inconveniente; entretanto, ele pode causar uma desidratação potencialmente letal em indivíduos muito doentes, muito jovens ou idosos (Brasil 2004).

2.4.1. Indicadores Comuns de Poluição Hídrica

2.4.1.1. Coliformes

Um microrganismo, para ser considerado indicador da qualidade da água e/ou de um produto, deve, com sua presença e quantidade, ou ainda com a sua ausência, apontar para uma possibilidade maior ou menor de haver organismos patogênicos no substrato, servindo de indicativo de contaminação. Como exemplo clássico, temos os microrganismos do grupo coliforme, considerados sugestivos de contaminação por material de origem fecal (Lee Liao et al. 1984, Dorner et al. 2007). O indicador ideal é aquele que pode ser aplicável a todos os tipos de água e produtos; ter uma população mais numerosa no ambiente que os patógenos; sobreviver melhor que os possíveis patógenos, em especial em água clorada, água do mar e alimentos diversos; ser incapaz de se multiplicar no ambiente aquático natural ou de qualidade ideal; possuir resistência equivalente à dos patogênicos aos processos de autodepuração; ser detectado por uma metodologia simples e barata (Cunha et al. 2005). Porém, na prática, não se apontam indicadores ou um indicador ideal de qualidade sanitária da água, mas sim alguns organismos que se aproximam dessas exigências.

As bactérias do grupo coliforme são habitantes normais (simbiontes), do intestino humano ou de outros animais homeotermos (sangue quente), onde vivem saprofiticamente, não causando, em geral, nenhum dano ao hospedeiro, sendo importantes para a saúde pública, pois a sua presença na água indica a presença de fezes ou esgoto doméstico (Bordalo et al. 2002, Dorner et al. 2007).

A grande importância sanitária das bactérias enquadradas como coliformes, está na sua presença obrigatória em toda fonte poluída por despejos domésticos que tiveram contato com excretas humanas, o que não acontece com as bactérias patogênicas intestinais, que somente existem, e em pequeno número, em águas de esgoto procedentes de residências onde existam pessoas doentes ou portadoras, nesse caso enquadrado como fonte contaminada. Existem no grupo coliforme algumas bactérias intestinais capazes de viver e reproduzir-se em vida livre, como habitantes do solo, como por exemplo, *Klebsiella* spp. ou *Enterobacter aerogenes*. As bactérias de vida livre compreendem organismos de nutrição saprófita e autotrófica, podendo ser, estes últimos, quimiossintetizantes ou fotossintetizantes (Leal 1998).

Como já foi dito, os coliformes apontam a possibilidade da presença de poluição fecal, ou seja, ocasionada por organismos que ocorrem em grande número na flora intestinal humana ou de animais de sangue quente, em especial os mamíferos. O número total de coliformes (coliformes totais) encontrados pode ser traduzido como risco potencial para o encontro nas águas de agentes biológicos com certa possibilidade de ação patogênica, incluindo bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Por isso, sua enumeração em água é menos representativa como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração de coliformes fecais ou *Escherichia coli* (anaeróbia facultativa) (Dorner et al. 2007).

2.4.1.2. Coliformes Totais e Coliformes Fecais

Atuam como indicadores de lançamentos orgânicos, sendo expressos em densidade, ou seja, como o “número mais provável (NMP) em cada 100 mL”. O

grupo coliforme inclui todos os bacilos aeróbios, anaeróbios, ou facultativos, Gram negativos, não esporulados, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, entre 24 e 48 horas a 35°C. Podemos dizer que o grupo inclui cerca de 20 espécies de bactérias, dentre as quais se encontram, tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal, como diversas espécies de bactérias não entéricas, como a *Serratia* spp. e *Aeromonas* spp. (Pianetti et al. 1998, Dorner et al. 2007).

O Número Mais Provável (NMP) de bactérias coliformes, obtido através da técnica de colimetria, deve ser entendido como um parâmetro que visa avaliar o potencial de contaminação da água (e não o imediato grau de contaminação) por patógenos de origem fecal, uma vez que os mesmos podem persistir por vários dias no ambiente. O NMP baseia-se na determinação empírica (mais provável pela formação e pela contagem das colônias) da concentração de coliformes totais e fecais em um dado volume de água. A contagem dos chamados coliformes totais corresponde ao total de microrganismos “Gram-negativos” encontrados em uma amostra, patogênicos ou não. Já a contagem dos coliformes fecais indica a quantidade dos possíveis microrganismos oriundos de excretas humanos, portanto com riscos mais ativos de serem possivelmente patogênicos. Em saúde pública e/ou quando do processamento e da comercialização de produtos destinados ao consumo humano (organismos aquáticos), é obrigatória a implantação de um processo de monitoramento desses coliformes, ou seja, dos coliformes totais e dos fecais (Collares 2000, Bordalo et al. 2002, Vinten et al. 2004, Cunha et al. 2005).

A definição de coliformes fecais é a mesma de coliformes totais, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em período

de 24 horas a 44,5°C - 45,5°C (termotolerantes), em meios contendo sais biliares ou outros agentes tensoativos com propriedades inibidoras semelhantes, caracterizadas pela presença da enzima Beta-galactosidade, objetivando-se selecionar os coliformes originários do trato gastrintestinal (Bordalo et al. 2002, Vinten et al. 2004, Cunha et al. 2005).

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, caracterizada pela presença das enzimas Beta-galactosidade e Beta-glicuronidase, em meio de cultura complexo à 44,0 - 45,5°C em 24 horas, fermentando lactose e manitol com produção de ácido e gás (o que não é feito por importantes bactérias patogênicas, como os gêneros *Salmonella* e *Shigella*) e produzindo indol a partir do aminoácido triptofano. É encontrada em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido despejo fecal recente, morrendo em pouco tempo, pois dificilmente encontra condições para multiplicar-se. Faz parte da flora intestinal normal do homem (simbionte) estando sempre presente nas fezes e, normalmente, sem ocasionar nenhum sintoma, com exceção às crianças pequenas, causando surtos de diarreia aguda e, em adultos que tenham contato direto com o microrganismo, a “diarreia do viajante”, com duração de menos 48 horas, caracterizada por cólicas, náuseas, vômitos e diarreia aquosa, chegando a hemorragias e infecções. Vive otimamente em temperatura de 35°C a 37°C e pH de 6,5 a 7,5, sendo capaz de, em condições anaeróbias, realizar reações de redução dos compostos nitrogenados, transformando os nitratos presentes no meio, em nitritos ou até mesmo em amônia e em nitrogênio gasoso. Quando ingerida é enquadrada como patogênica, sendo por isso a mais utilizada

como indicadora de poluição fecal no ambiente (Collares 2000, Bordalo et al. 2002, Vinten et al. 2004, Cunha et al. 2005).

2.4.1.3. *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* foi proposto em 1963 (Sebald & Veron 1963) e é constituído por bastonetes curvos em forma de vírgula, "S", asa de gaivota ou espiral, cujas dimensões variam entre 0,2 a 0,9 μm de largura por 0,5 a 5 μm de comprimento (figura 1). Em culturas antigas ou em condições ambientais ou de cultivo adversas, suas células podem adquirir forma esférica ou cocóide. São bactérias Gram-negativas, microaerófilas, não hemolíticas em meio contendo sangue de ovinos, não esporuladas e com colônias não pigmentadas. Móveis por meio de flagelo único em uma ou em ambas as extremidades, possuem movimento característico de "saca-rolha", que pode ser observado claramente em microscópio de contraste de fase ou de campo escuro (Rees et al. 1995, Moore et al. 2001).

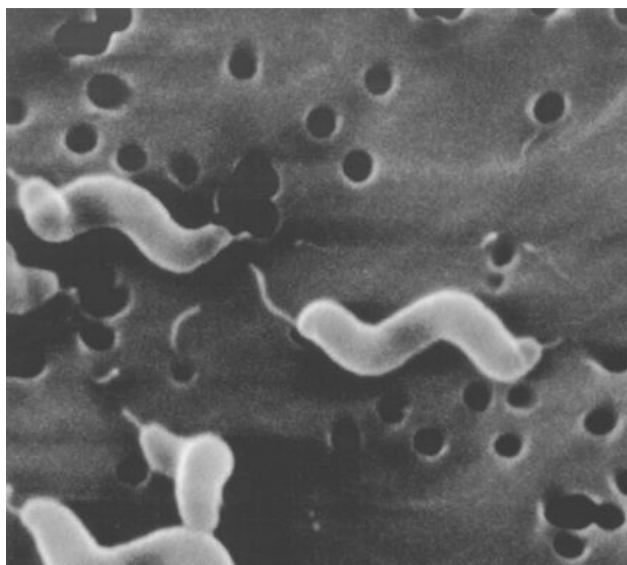


Figura 1. Fotografia por Microscopia Eletrônica - demonstração da morfologia celular típica de bactérias do gênero *Campylobacter*. Fonte: Centers for Disease Control (CDC).

Campylobacter spp. é invasor de tecido epitelial em animais de sangue quente e necessita de gás carbônico para sua multiplicação, ($\cong 10\%$ de C), sendo altamente sensível a presença de sal e dotado da capacidade de sobreviver em água com temperatura entre 30°C e 47°C. As temperaturas ótimas para crescimento variam entre 25°C e 42°C, de acordo com a espécie (Skirrow 1977, Arvanitidou et al. 1995, Scarcelli et al. 1998, Daczowska-Kozon & Brzostek-Nowakowska, 2001).

O gênero *Campylobacter* engloba 16 espécies, 6 subespécies e 3 biotipos, sendo pertencente à família *Campylobacteraceae*. *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis* representam o grupo de bactérias denominadas termofílicas, devido à temperatura ótima de incubação oscilar entre 42° C e 43° C, sendo que *C. jejuni* e *C. coli* constituem as espécies mais freqüentemente isoladas de enterites humanas (Rees et al. 1995, Moore et al. 2001, Fernandez et al. 2003).

Nos últimos anos, algumas espécies do gênero *Campylobacter* vêm sendo amplamente estudadas, notadamente *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, devido ao papel que desempenham no contexto das diarreias humanas. Nos países desenvolvidos, o *C. jejuni* não é normalmente encontrado como participante da flora bacteriana do trato intestinal humano (Ruiz-Esquide et al. 2003), ao contrário do que se observa em países em desenvolvimento, onde o saneamento básico é precário e esse microrganismo é isolado com freqüência bastante elevada de indivíduos assintomáticos (Pavan et al. 1988, Tosin & Machado 1995, O'Reilly et al. 2007).

Campylobacter jejuni predominantemente causa gastroenterite em animais e humanos, mas infecções ocorrendo durante a gestação podem induzir a

abortamentos, natimortos, prematuros e sepsis neonatais (Butzler 1984, Bolton et al. 1987). Nos Estados Unidos, estima-se que, anualmente, ocorram mais de 2 milhões de casos de enterite por este patógeno, casuística duas vezes mais freqüente que as infecções ocasionadas por *Salmonella* spp. (CDC 1984). Segundo o *Food and Drug Administration* (FDA 2009), sua freqüência como causador de diarréia tem ultrapassado as contagens combinadas de *Shigella* e *Salmonella*. Além disso, nos últimos anos, estudos demonstraram associação entre a infecção por *C. jejuni* a duas doenças neurológicas emergentes: síndrome de Guillain-Barré (GBS) e a síndrome parálitica chinesa, mais recentemente denominada de neuropatia axonal motora (Kusiluka et al. 2005). Em análises sorológicas realizadas no Japão, observou-se que 35% dos pacientes com síndrome de Guillain-Barré tinham sido infectados de maneira prévia e recente, sugerindo que os anticorpos dirigidos contra determinados sorotipos de *C. jejuni* reagem de forma cruzada com as proteínas dos nervos periféricos, causando a sua degeneração (Ruiz-Esquide et al. 2003).

2.4.1.3.1. Características da doença: campilobacteriose

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, sendo o *C. jejuni* considerado um microrganismo extremamente ubiqüitário, encontrado tanto disperso no ambiente, como também assumindo o papel de agente patogênico ou comensal do trato gastrintestinal de animais domésticos e selvagens (Butzler & Skirrow 1979, Scarcelli et al. 1998, Sandberg et al. 2006).

A sintomatologia da campilobacteriose (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*) pode manifestar-se de várias formas, sendo a enterocolite a mais comum. É clinicamente semelhante a causada por diversos outros patógenos

entéricos. O período de incubação varia normalmente de dois a cinco dias, podendo se estender até 10 dias. A doença caracteriza-se por causar diarreia acompanhada de febre baixa e dores abdominais. Em alguns casos, a febre aguda da diarreia dura dois e três dias, mas as dores abdominais podem persistir por até três semanas (Scarcelli et al. 1998, Smith et al. 2006). Nos Estados Unidos, o gênero *Campylobacter* é considerado a causa mais comum de doença diarreica em humanos com número superior a 100 óbitos ao ano (CDC 2009a).

Campylobacter jejuni tem sido caracterizado como agente de enterocolite em diversas partes do mundo (Butzler & Skirrow 1979, Rees et al. 1995, Jones 2001, CDC 2009b). Na Suécia, acredita-se que seja mais freqüente que *Salmonella* e *Shigella* juntos (Martin et al. 2006). Na Irlanda, a freqüência é semelhante a de *Salmonella*, e vem aumentando ultimamente (Moore et al. 2001). No Brasil, tem-se demonstrado que *C. jejuni* também é um importante agente de gastroenterite aguda e crônica, afetando principalmente crianças (Viana et al. 1986, Lima et al. 1993, Scarcelli et al. 1998). Nos países em desenvolvimento, a enterocolite é endêmica e a freqüência de casos assintomáticos é elevada (OMS 2001, Richardson et al. 2007).

O mecanismo pelo qual *C. jejuni* causa processos diarreicos ainda não está suficientemente esclarecido. Resultados obtidos até o momento indicam que sua patogenicidade é multifatorial, associada à adesão da mucosa intestinal e produção de toxinas, essas últimas já demonstradas em algumas cepas de *C. jejuni* (produção de enterotoxina termolábil semelhante à toxina colérica e citotoxinas). Muitos pacientes apresentam sangue e muco nas fezes, o que sugere um mecanismo invasivo. Em alguns casos, *C. jejuni* penetra na mucosa intestinal, multiplicando-se

na lâmina própria, tal como ocorre com *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* (Scarcelli et al. 1998, Smith et al. 2006).

3. PERGUNTAS CONDUTORAS

As condições ambientais da bacia do rio São João e seus afluentes permitem a manutenção natural de bactérias do gênero *Campylobacter*?

O isolamento de *Campylobacter* spp. de origem fecal em amostras de conveniência em indivíduos residentes na localidade, pode sugerir a potencial participação deste microrganismo nos surtos diarréicos episódicos e reiterados nesta região?

4. JUSTIFICATIVA

A contaminação microbiana em sistemas aquáticos assume destacada relevância, nos seus diferentes segmentos, como no âmbito da saúde pública, pelo risco de transmissão de agentes patogênicos aos seres humanos e animais causando doenças de natureza e complexidade diversas.

As doenças diarréicas, em particular as de natureza infecciosa, constituem um dos mais significativos problemas de Saúde Pública, sendo responsáveis por elevadas taxas de morbi-mortalidade em seres humanos.

A concentração, ou densidade, de coliformes fecais no meio aquático tem sido tradicionalmente empregada como indicador da qualidade sanitária das águas, embora exista a ressalva de que o risco de contaminação por doenças de veiculação hídrica não depende exclusivamente do valor desta concentração, já que outros organismos, patogênicos, podem se comportar de forma distinta no meio aquático.

Em países em desenvolvimento, devido ao precário sistema de saneamento básico, *C. jejuni* está freqüentemente associado a infecções do sistema gastrointestinal, apresentando índices de isolamento superiores aos de gêneros classicamente associados à diarréia, como *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* (OMS 2000).

Os surtos diarréicos relacionados ao *Campylobacter*, notadamente *C. jejuni* e *C. coli* são provocados pelo consumo de água e alimentos contaminados.

Vários estudos (Stelzer & Jacob 1991, Stampi et al. 1999), inclusive no Brasil (Filgueiras & Hofer 1989) reportam o isolamento de *Campylobacter* em esgoto e sugerem ser este uma importante fonte de contaminação para corpos hídricos, inclusive podendo ser proveniente de infecções zoonóticas (Jones et al. 1990).

As bacias hidrográficas e suas redes de drenagem, que funcionam como mananciais de água utilizáveis por boa parcela da população podem, se possibilitarem a manutenção dessas bactérias, servir como agentes dispersores desses microrganismos (Fernandez et al. 2003).

A campilobacteriose pode representar um grande problema de Saúde Pública em nosso País, tendo em vista as precárias condições sanitárias com que convive boa parte da população. Entretanto, a sua real ocorrência só poderá ser estimada a partir da investigação criteriosa, por parte dos laboratórios e da conscientização dos órgãos governamentais ligados à Saúde, de que esta zoonose está em nosso meio e precisa ser considerada.

Com base nesses dados e na escassa literatura nacional sobre o tema, este estudo levanta a hipótese de que o ambiente da bacia hidrográfica do rio São João, devido à falta de manejo adequado, possa servir como um reservatório natural de espécies bacterianas potencialmente patogênicas. A partir também do pouco conhecimento sobre o comportamento do gênero *Campylobacter*, principalmente em estudos na América Latina, optamos por utilizá-lo como modelo nessa investigação. Neste trabalho foram também incluídas, considerações sobre sua distribuição em

ambiente aquático e sua possível ocorrência em humanos e animais na área do entorno, considerando, as condições de esgotamento sanitário, e de abastecimento de água, e em parte, a situação sócio-econômica das populações locais.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

- I. Caracterizar a presença de *Campylobacter* spp. no baixo curso do rio São João, buscando-se correlacionar sua possível ação nos surtos diarréicos da população, bem como investigar sua presença no ambiente e na água de abastecimento.

5.2 Objetivos específicos

- I. Verificar a existência de *Campylobacter* spp. na área de estudo do rio São João;
- II. Verificar a existência de *Campylobacter* spp. na água de abastecimento da população do sítio de estudo;
- III. Avaliar a presença *Campylobacter* spp. em material de origem fecal de uma amostra de conveniência da população do sítio de estudo, com ou sem a presença de quadro diarréico;
- IV. Estabelecer a relação entre a existência de *Campylobacter* spp. e acometimentos diarréicos na população;
- V. Subsidiar a construção de políticas públicas de vigilância em saúde para a formulação de estratégias de intervenção local.

6. METODOLOGIA

6.1 Área de estudo

O sítio de estudo aqui focado, localizado na Região dos Lagos, especificamente nos arredores de Barra de São João (Casimiro de Abreu) e do segundo distrito de Cabo Frio, ambos no Estado do Rio de Janeiro, serve como modelo de uma das regiões que apresentam importantes atividades turísticas e econômicas, pois conta com um imenso afluxo populacional, que promove desequilíbrios na distribuição demográfica (Collares 2000).

Na região onde o estudo foi realizado, poucas moradias próximas ao rio, contam com um sistema de abastecimento de água e coleta de esgoto, fazendo-se, muitas vezes, uso da água de poços e o descarte dos efluentes líquidos, em fossas sépticas ou lançando diretamente no rio São João e seus afluentes.

A bacia hidrográfica do rio São João está localizada na zona leste do Estado do Rio de Janeiro, na região sudeste do Brasil, entre as coordenadas de 22° 20' e 22° 50' de latitude sul e de 42° 00' e 42°40' de longitude oeste. Está contida na MRA-4 - bacia da região dos lagos, do rio São João e zona costeira adjacente. A MRA-4 é gerida pelo Consórcio Ambiental Lagos - São João. (SEMADS 2001).

Com cerca de 2190 km² de área, a bacia hidrográfica do rio São João abrange 06 municípios: Silva Jardim, Araruama, Casimiro de Abreu, Rio Bonito, Cabo Frio e Cachoeiras de Macacu (Saunders & Rezende 2003).

O rio São João nasce na Serra do Mar (Serra do Sambe) a uma altitude de 740m, no município de Cachoeiras de Macacu. Percorre a região até entrar em Silva Jardim a uma altitude aproximada de 15m, indo desaguar no Oceano Atlântico após percorrer 150 km.

Na figura 2, observa-se o leito do rio São João. De acordo com o mapa, podemos verificar a mudança do leito do rio por obra de retificação (Saunders & Rezende 2003).



Figura 2: Bacia Hidrográfica do rio São João.

6.2. Delineamento do estudo

A abordagem metodológica foi realizada através de estudo exploratório. A unidade de análise escolhida para a pesquisa foi o baixo curso do rio São João, a partir da qual foram feitas pesquisas bibliográficas e documentais, abordando os aspectos físicos e antrópicos.

6.2.1. Amostras ambientais

De acordo com a foto de satélite a (Figura 3), observa-se a área que delimitada para realização das coletas do trabalho. Gostaríamos de frisar que os pontos 1 a 5 estão na área mais urbanizada. Já o ponto 6 se localiza na barragem de Juturnaíba.



Figura 3: Localização dos pontos de coleta no baixo curso do rio São João.

Os pontos de coleta foram selecionados em função da acessibilidade para a realização da amostragem d'água. Fatores como condições das vias de acesso, localização dentro de propriedades particulares e de reserva, além da disponibilidade de veículo de transporte apropriado, foram quesitos que pesaram na localização e distribuição dos pontos.

Os locais de coleta receberam denominações para facilitar a visualização e identificação da importância de cada ponto dentro do contexto da pesquisa e sendo caracterizados da seguinte forma: ponto 1, denominado como ponto igreja, localizado no píer em frente a igreja de São João Batista na foz do rio São João; ponto 2, denominado como ponto restaurante, localizado no píer em frente ao restaurante Por do Sol na rua Bernado Gomes; ponto 3, denominado como ponto fazenda, localizado em frente a porteira de acesso a propriedade particular Fazenda da Barra ao final da rua Andrade Silva. Esses três primeiros pontos localizados nas margens do lado de Casimiro de Abreu. Ponto 4, denominado como ponto Avenida do Contorno, localizado na avenida de mesmo nome e ponto 5, denominado como ponto Rua Beira Rio, localizado na rua de mesmo nome, ambos localizados nas margens do lado de Cabo Frio. Por fim o ponto 6, denominado como ponto Barragem, localizado na barragem da lagoa de Juturnaíba, próximo ao portão de acesso ao complexo da barragem.

A obtenção das amostras ambientais de água de rio, ocorreu durante o período de 24 de agosto de 2007 e 06 de junho de 2008, sendo realizadas um total de dez viagens a campo, para a aquisição da amostragem.

6.2.2. Amostras de fezes de origem humana

As amostras de fezes foram solicitadas através de contatos realizados com dois Postos de Atendimento Médico (PAM), duas unidades do Programa de Saúde da Família (PSF), uma associação de serviços à comunidade e duas creches. Todos localizados na região do entorno da foz do rio São João. Pela dificuldade de obtenção de material de origem fecal, optamos pela utilização uma amostra de

conveniência. Esse tipo de amostragem, apesar de poder fornecer resultados interessantes, não tem o mesmo peso de uma amostra probabilística, já que o pesquisador acaba selecionando membros da população mais acessíveis (Oliveira 2001).

Dos dois Postos de Atendimento Médico (PAM) locais contatados, somente um concordou em participar do estudo, propiciando que o pesquisador tivesse acesso autorizado a quatro amostras de material de origem fecal de pacientes com sintomas de problemas gastrointestinais.

Os dois Postos do Programa de Saúde da Família (PSF) procurados forneceram seis amostras de pessoas que procuraram atendimento com queixa de problemas gastrointestinais (uma do PSF de Barra de São João e cinco do PSF do Segundo Distrito de Cabo Frio).

Em quatro creches da região visitadas (uma da prefeitura e três particulares) somente duas particulares aceitaram participar da pesquisa, sendo obtidas 20 amostras de fezes de crianças até 3 anos e 5 de indivíduos adultos com ou sem diarreia.

Em uma associação comunitária do local no estudo (Segundo Distrito de Cabo Frio) foram obtidas 20 amostras entre adultos e crianças com e sem diarreia. Nessa mesma associação, obtivemos autorização para recolher duas amostras de poço de moradores locais assintomáticos, que haviam apresentado resultados positivos na pesquisa de *Campylobacter*.

Os indivíduos que aceitaram participar do estudo receberam dispositivos do tipo "swab" com meio de transporte "Cary-Blair" (conservante) e foram solicitados a preencher uma ficha de acompanhamento de amostra de origem fecal (anexo 1).

As amostras de fezes foram obtidas através da introdução dos "swabs" nas fezes, (formadas ou diarréicas) pelo próprio participante. O material foi então entregue aos serviços de saúde pública locais (PAM e PSFs), ou obtidas junto as creches e a Associação de Amigos do Segundo Distrito (Cabo Frio). Em caso de indivíduos incapazes de coletar a amostra por meios próprios (crianças), a obtenção do material foi realizada por um responsável.

Para a obtenção do material de origem fecal foram realizadas visitas semanais aos locais de coleta, onde foram obtidos os swabs coletados assim como a respectivas fichas de acompanhamento de amostras fecais.

6.2.3. Amostras de fezes de origem animal

A partir de duas amostras humanas positivas para o gênero *Campylobacter*, buscou-se coletar amostras de fezes dos animais presentes no entorno. Como somente uma residência permitiu esta coleta, foram recolhidas as amostras dos animais domésticos relacionados com essa casa, perfazendo um total de 5 amostras colhidas (provenientes de dois frangos, um suíno e dois bovinos). As amostras de fezes de origem animal foram obtidas seguindo a mesma metodologia utilizada para a coleta de amostras humanas, com o auxílio de "swabs" com meio de transporte "Cary-Blair" mantidos em ambiente refrigerado até o momento da semeadura no

meio seletivo, como explicado, mais minuciosamente no item da metodologia laboratorial.

6.3. Metodologia Laboratorial

Para as análises laboratoriais contamos com a colaboração do Setor de *Campylobacter* do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do IOC-FIOCRUZ, a partir da possibilidade do uso de suas instalações, equipamentos e material de consumo para realização das atividades práticas.

6.3.1 Metodologia para análise de amostras de água

Para a análise de amostras de água, originárias tanto do rio quanto da água de abastecimento, foram coletados aproximadamente 200mL em frascos estéreis com tampa para o processamento. Nas coletas de água de rio, o material foi obtido nas margens do mesmo a uma profundidade de aproximadamente 20cm, onde também foram realizadas as provas de caráter físico-químico (como temperatura e pH) para a caracterização das condições ambientais locais no momento da coleta. Ressalta-se que a coleta nessa profundidade (20cm), foi adotada para obtenção de uma amostragem mais estável, sem a influencia direta das condições climáticas, como insolação, vento, chuva e o próprio movimento da água no rio.

Após a obtenção do material para a análise, este foi mantido e transportado sob refrigeração em caixa térmica, até o momento do processamento, não excedendo o intervalo de seis horas entre a coleta e o processamento. Esta etapa visou a manutenção das características microbiológicas da amostragem, desde o

momento da coleta até o processamento, com o menor grau de alteração possível entre essas etapas.

Ao chegar ao laboratório, o material foi centrifugado com o intuito de se concentrar o material biológico em suspensão. Dos 200mL originais, foram aliqüotados 150mL em tubos de centrífuga do tipo FALCON[®], originando três tubos de 50mL por amostra, sendo o volume excedente (aproximadamente 50mL) descartado. Em seguida, as amostras foram submetidas a 3000 rpm por um período de trinta minutos para a formação de uma fase sedimentada de interesse. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 5mL de material concentrado no fundo de cada tubo, sendo que o volume final de sedimento corresponde à união do “pellet” dos três tubos de cada amostra era de aproximadamente 15mL.

A semeadura do material foi realizada em placa de Petri contendo meio enriquecido e seletivo [Agar Columbia com 5% de sangue desfibrinado de carneiro ou 0,4% de carvão ativo, acrescido de 5% de uma solução redutora de oxigênio (FBP) e 0,5% de uma solução de antibióticos], sendo que o inóculo em meio de cultura foi efetivado com a deposição de 0,1mL da ressuspensão do sedimento (“pellet”) em uma das extremidades da placa, seguindo então a semeadura com alça bacteriológica, espalhando-se o material por toda a superfície do meio através de estrias características de uma semeadura em “T” (Filgueiras 1992, Andrade et al. 2007).

Após a semeadura, as placas de Petri eram colocadas em jarra metálica hermética com atmosfera de microaerofilia e incubadas a 37°C por um período mínimo de 72 horas. Esta temperatura é adequada tanto para o isolamento de *Campylobacter* termofílicos como para os não termofílicos, permitindo o crescimento de todos os membros do gênero (Vandamme & De Ley 1991, Vandamme & Goosens 1992).

A leitura do crescimento foi realizada após o período de incubação, onde colônias de característica incolor, transparentes e com brilho, lembrando gotas d'água foram selecionadas como sendo suspeitas de *Campylobacter* spp. (Andrade et al. 2007).

A partir da obtenção de colônias suspeitas, a identificação em caráter presumível foi realizada por microscopia, utilizando-se o método de Gram em microscópio de luz (campo claro), para a observação das características celulares típicas do gênero bacteriano. A identificação presumível das amostras é obtida pela observação de bacilos (bastonetes) curvos ou em forma de "S", Gram negativos ou pela presença de células cocóides, características de amostras em estágio degenerativo (Montolio et al. 2005).

As amostras de colônias típicas, que se desenvolveram nos meios seletivos e que se enquadraram como suspeitas de *Campylobacter* spp., foram então submetidas a provas bioquímicas clássicas para a confirmação de gênero bacteriano e identificação ao nível de espécie (Filgueiras & Hofer 1989, Vandamme & De Ley 1991, Vandamme & Goosens 1992) sendo que, antes da avaliação bioquímica, uma

alíquota da amostra foi armazenada em tubo contendo água peptonada pH 7,0-7,2, com 20% de glicerol e congelada a -70°C.

Utilizou-se também técnicas de biologia molecular para a confirmação dos resultados obtidos na metodologia clássica, ou para eliminação de dúvidas de identificação, onde cepas controle de *C. jejuni* e *C. coli* foram incluídas em todos os testes como controles positivos. Essas técnicas serão posteriormente descritas no item experimentos de biologia molecular.

6.3.2 Metodologia para análise de amostras de origem fecal (humana e animal).

Como já explicado, as amostras de fezes foram obtidas com “swabs” introduzidos nas fezes ou quando necessário, por raspagem destes em dispositivos do tipo fralda e entregues pelos participantes da pesquisa ou seus responsáveis, ou ainda, coletadas pelo próprio pesquisador, no caso de amostras de origem animal.

Os “swabs” coletados e mantidos em meio de transporte “Cary-Blair” permaneceram sob refrigeração no local da coleta (temperatura entre 2-8°C) e o transporte para o laboratório ocorreu em caixa térmica, permanecendo as amostras sob refrigeração, até o momento do processamento.

Entre a coleta e o processamento do material, o tempo transcorrido não ultrapassou um período total de uma semana, evitando-se assim, a perda de viabilidade por parte dos possíveis microrganismos presentes nesta amostra.

A semeadura foi realizada em placa de Petri contendo meio de cultura com as mesmas características dos usados para o isolamento em amostras de água, sendo que o diferencial entre as duas técnicas se deu no momento do inóculo do material, que neste caso foi efetuado com o próprio “swab”, em uma das extremidades da placa, seguindo-se então a semeadura em “T”, feita com alça bacteriológica.

A incubação, leitura do crescimento, confirmação e identificação ao nível de gênero e espécie seguiram, a partir desse ponto, os procedimentos utilizados para as amostras de água.

6.3.3 Experimentos de Biologia Molecular

Em todas as amostras em que houve isolamento de *Campylobacter*, e foi obtida quantidade suficiente de material, a partir da massa de crescimento bacteriano após semeadura em Agar Columbia, partiu-se para confirmação de *Campylobacter* através da técnica de PCR Multiplex (Harmon et al. 1997, Vilardo et al. 2006).

A extração e purificação do DNA total foram realizadas por métodos clássicos e por kits comerciais seguindo seus protocolos próprios. Posteriormente foram procedidas as técnicas da PCR e eletroforese em gel de agarose.

6.3.3.1 Extração do DNA

Algumas colônias provenientes do crescimento já descrito, em placas de meio de Ágar Columbia foram ressuspendidas em 100 µL de tampão estéril TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0), a fim de obter 2×10^9 células (Englen & Kelley 2000).

Para a extração do DNA bacteriano, foram aplicados dois diferentes métodos com o intuito de avaliar a melhor eficácia: o método da extração pela guanidina e o método utilizando o Kit de extração GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation (G&E 2006).

6.3.3.1.1 - Método da Lise com Isotiocianato de Guanidina:

A extração do DNA bacteriano pelo método da Guanidina não utiliza reagentes orgânicos, e é um dos métodos mais usados para obtenção de DNA. Ele é baseado na ruptura de células em uma solução lise (guanidina-detergente), que hidrolisa o RNA e permite a precipitação seletiva de DNA.

Para realização desse procedimento, uma alçada proveniente do crescimento bacteriano foi adicionada em um tubo contendo 100 µL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA pH 8,0 - 1mM). Nesta etapa adicionam-se 500µL de uma solução de lise GES (guanidina 5M, EDTA 100 mM, Sarcosil 0,5%v/v) e homogeniza-se brevemente no vortex, deixando em repouso a mistura, entre 5 a 10 minutos em temperatura ambiente. Transfere-se os tubos para o gelo e adicionam-se 250 µL de acetato de amônio frio (temperatura de refrigerador). Após homogeneizar, deve ser mantido em repouso por 10 minutos. Adicionam-se 500 µL de clorofórmio-2-pentanol frio, misturando bem as fases. Leva-se a mistura à centrífuga refrigerada (4°C) por 15 min a 13000 rpm. Transfere-se o sobrenadante para outro tubo no qual adiciona-se 2 volumes de etanol absoluto. O álcool precipita o DNA.

A mistura deve ser cuidadosamente agitada por inversão (1 minuto) e colocada no gelo por 20 minutos, sendo centrifugada em seguida a 13000 rpm por

10 minutos. Separa-se a fase aquosa para um novo tubo limpo e seco, desprezando o sobrenadante com cuidado. Ao final, o sedimento correspondendo ao DNA genômico é lavado 3 vezes com etanol 70%, adicionando 500 µL de álcool e invertendo o tubo para lavagem do pellet, centrifugando todas as vezes por 2 a 5 minutos. Após essa etapa, seca-se bem o “pellet” e ressuspende-se o DNA em 100 µL de TE 1X, guardando em refrigerador “overnight” para hidratar o DNA. Após esse tempo o tubo poderá ser guardado a -20°C .

Posteriormente realiza-se a eletroforese em gel de agarose a 1% para verificar a integridade do DNA, utilizando 10µL dessa solução (Pitcher et al. 1989, Sambrook et al. 2001).

6.3.3.1.2 - Método de extração e purificação através do kit comercial G&E.

Nesse método, obtivemos o DNA das bactérias isoladas na pesquisa, utilizando um Kit de extração de DNA. Segundo o fabricante, o Kit é adequado para o isolamento de DNA bacteriano de diferentes tipos de substrato. Neste método emprega-se especial atenção quando da manipulação dos reagentes, utilizando-se uma capela própria para manusear essas substâncias, ou mesmo um fluxo laminar.

Para este procedimento, seguimos o manual do Kit G&E: GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit. Segundo esse protocolo (G&E, 2006), para a obtenção e purificação do DNA genômico com alta qualidade, a partir de culturas bacterianas, as amostras utilizadas devem ter, em média, 10^2 a 10^8 células bacterianas. O kit utiliza precipitação de sal na etapa de retirada de proteínas, ao invés de extração com substâncias orgânicas tóxicas, como o clorofórmio (Sambrook

et al. 2001) o que diminui os riscos para o manipulador. O DNA extraído foi mantido em temperaturas de -20°C (Freezer).

6.3.3.2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA extraído após a cultura foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) através da amplificação em um termociclador automático (*PTC 150* - MJ Research, Incorporation).

Os iniciadores (*primers*) utilizados na experimentação foram definidos com base em seqüências conhecidas e utilizadas para os microrganismos de interesse (Quadro 1).

Nomenclatura dos <i>Primers</i> *	Seqüência dos Oligonucleotídeos	Gene
pg3	(5'- GAACTTGAACCGATTTG - 3')	<i>flaA</i>
pg50	(5'- ATGGGATTTTCGTATTAAC - 3')	<i>flaA</i>
C1	(5'- CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3')	não-determinado
C4	(5'-GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT - 3')	não-determinado
C412F	(5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3')	16S rRNA
C1288R	(5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3')	16S rRNA
F2B	(5'-TGGAGGGTAATTTAGATATG-3')	<i>cadF</i>
R1B	(5'-CTAATACCTAAAGTTGAAAC-3')	<i>cadF</i>

Quadro 1- *Primers* usados para PCR neste estudo

6.3.3.2.1 - Genes associados ao gênero:

Segundo Linton et al. (1996) existem algumas regiões 16S rRNA que se mantém conservadas nas espécies do gênero *Campylobacter* por eles estudados, mas que diferem de outros microrganismos semelhantes como *Arcobacter* e *Helicobacter*. Desse modo, seria possível realizar uma análise mais direcionada para o gênero. Com base nesses trabalhos, sintetizamos os *primers* sugeridos pelos

pesquisadores, em função dessas regiões. Duas delas ocorrem entre os nucleotídeos 412-430 e nucleotídeos 1211-1128, um iniciador de 19pb (C412F) e uma seqüência reversa complementar de 18-pb (C1228R): as seqüências são: C412F, 5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3' e C1288R, 5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'. Segundo os autores, sob as condições sugeridas, esses *primers* amplificam um fragmento de 816-pb, somente encontrado nas espécies de *Campylobacter* urease positivos termotolerantes (UPTC) e *Ureolyticus*.

As condições da PCR com 25 ciclos usaram uma desnaturação de 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C durante 1 minuto e extensão de 72°C por 1 minuto.

Em todas as reações de amplificação realizadas, utilizamos controles positivos e negativos, sendo que, nos controles negativos, utilizamos somente os reagentes e *primers* com água pura e, nos controles positivos, amostras isoladas de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* (ATCC 33560 e ATCC 33291).

6.3.3.2.2 - Gene flaA

De acordo com Fischer & Nachamkin (1991), evidências experimentais sugerem o importante papel da proteína flagelina (que forma o flagelo) na patogênese das infecções associadas à mobilidade bacteriana. O gene flagelina subunidade A como método de tipagem de *Campylobacter* tem sido sugerido como um método relativamente simples e fácil de genotipagem, com maior capacidade discriminatória que os métodos sorológicos (Ioannidis et al. 2006). A tipagem pelo gene flagelina é baseada na análise RFLP dos produtos de PCR pertencentes aos genes altamente conservados da subunidade A de flagelina de *Campylobacter jejuni*

(Ioannidis et al. 2006). As seqüências de primer pg3 (5'- GAACTTGAACCGATTTG - 3') e pg50 (5'- CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT-3'), baseadas nesta subunidade, foram escolhidas para esse trabalho, com base nas pesquisas de Vilaro et al. (2006).

6.3.3.2.3- Reação com os iniciadores C1 e C4

Segundo De Dominicis (2006), esses *primers* são específicos para *Campylobacter jejuni*, gerando fragmentos de aproximadamente 160 pb e facilitando a diferenciação com a espécie *C. coli*, quando utilizados em conjunto com os iniciadores pg3 e pg50. Neste caso *C. jejuni* determina dois fragmentos de DNA de 460 pb e 160 pb, enquanto *C. coli* irá gerar um único fragmento de 460 pb (Pope et al. 2007).

Ambos pares de *primers* foram utilizados simultaneamente em nossa reação de Amplificação (Multiplex PCR), que foi realizada em volumes de 50 µL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, 5,5 mM de MgCl₂, dNTPs 200 mM (cada) e *primers*: pg3 e pg50 – 40 pmoles (cada); C1 e C4 - 20 pmoles (cada); 1,25U de AmpliTaq DNA polimerase e 20 ηg de DNA extraído da amostra (Harmon et al. 1997).

A amplificação foi realizada no termociclador, sendo que as condições usadas no ciclo foram as seguintes: inicialmente, uma desnaturação a 94°C durante 4 minutos, seguida por 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 45°C durante 1 minuto, e 72°C durante 1 minuto, com uma extensão final de 72 °C durante 7 minutos.

6.3.3.2.4 - Outros Genes associados à virulência

Como já explicado, as flagelinas são proteínas bem conhecidas pelo seu envolvimento na colonização de *Campylobacter* no hospedeiro. Outra proteína associada à virulência é chamada CadF (*Campylobacter* adesão à fibronectina), posteriormente, denominada como adesina de *Campylobacter*, após identificação do seu envolvimento no processo de colonização (Bang et al. 2003a, Bhavsar & Kapadnis 2007). Trata-se de uma proteína de membrana externa de 37KDa, detectada entre isolados de *Campylobacter* de diversas fontes, demonstrando que essa proteína pode ser considerada conservada (Bang et al. 2003a, b). Sua atividade e envolvimento no processo de colonização de *Campylobacter* foram demonstrados *in vivo* em diferentes cepas de *C. jejuni*.

Dois iniciadores do gene cadF, F2B e R1B, previamente descritos (Konkel et al. 1999, Bang et al. 2003a), foram utilizados em uma PCR com as amostras isoladas, utilizando também amostras padrão *C.coli* e *C.jejuni* como controles. A PCR foi realizada em um termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc. Watertown, MA), utilizando condições descritas anteriormente (Konkel et al. 1999, Bang et al. 2003a), com pequenas modificações ou seja, 94°C por 5 min seguido por 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 45°C durante 1 min e 72°C por 1 min. A etapa final foi de 72°C por 1 min. (Muller et al. 2006)

6.3.3.3-Análise dos produtos da PCR

Após a reação da polimerase em cadeia (PCR), 10µL de todos os produtos amplificados e 7µL de um marcador de peso molecular de 100pb (invitrogen) foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, onde, após a etapa de

corrida (TBE 0,5x), o gel foi corado com solução de brometo de etídio (Sigma, St. Louis, IL, EUA), numa concentração de 0,5 mg/mL, descorado em água e observado em sistema de transiluminação (Sambrook et al. 2001). A fotografia digital do gel e das bandas de DNA separadas eletroforeticamente foi realizada em aparelho tipo Gel Doc UVP GDS 7.500 (Gel Documentation System, Califórnia, EUA).

7. RESULTADOS

A caracterização conclusiva das amostras se baseou nos resultados aferidos nas provas bioquímicas realizadas e na sua comparação com o perfil esperado.

7.1. Amostras ambientais

Como informado na metodologia, foram realizadas 10 viagens a campo para a coleta de água do rio São João. O esquema de amostragem, onde o pH e temperatura da água foram medidos no momento das coletas, estão discriminadas na quadro 2. No quadro 3, encontra-se a estimativa da maré no momento da coleta e o perfil de positividade das amostras.

		2007				2008					
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta	6ª coleta	7ª coleta	8ª coleta	9ª coleta	10ª coleta
		24/ago	02/set	14/set	27/out	28/jan	22/fev	01/abr	18/abr	30/mai	06/jun
Ponto 1	pH	NV	NV	#	NV	5.5	8.0	5.5	6.5	7.5	7.0
	Temp.	NV	22.8°C		23.7°C	23.9°C	24.1°C	25.8°C	25.9°C	24.3°C	23.3°C
Ponto 2	pH	NV	NV	#	NV	5.5	7.5	5.5	7.0	7.5	6.0
	Temp.	NV	22.9°C		23.8°C	23.9°C	23.8°C	25.4°C	25.8°C	24.3°C	22.2°C
Ponto 3	pH	NV	NV	NV	NV	5.5	5.5	6.0	6.5	7.0	6.0
	Temp.	NV	22.9°C	25.8°C	25.2°C	23.7°C	27.3°C	26.8°C	26.4°C	24.5°C	23.6°C
Ponto 4	pH	NV	NV	NV	NV	5.5	5.5	5.5	6.5	7.0	6.0
	Temp.	NV	22.6°C	24.0°C	24.7°C	24.5°C	26.7°C	25.5°C	25.8°C	23.9°C	22.0°C
Ponto 5	pH	#	NV	NV	NV	5.5	5.5	5.5	6.0	7.0	6.0
	Temp.		22.7°C	23.6°C	24.6°C	23.8°C	26.7°C	25.0°C	25.4°C	23.7°C	26.4°C
Ponto 6	pH	#	#	#	#	#	#	5.5	6.5	6.5	6.5
	Temp.							24.0°C	25.9°C	24.3°C	21.3°C

= coleta não realizada NV = parâmetro não verificado

Quadro 2- Perfil de pH/ temperatura das amostras de água por ponto de coleta.

		2007				2008					
		1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	4ª coleta	5ª coleta	6ª coleta	7ª coleta	8ª coleta	9ª coleta	10ª coleta
		24/ago	02/set	14/set	27/out	28/jan	22/fev	01/abr	18/abr	30/mai	06/jun
Maré alta		13:08	17:15	15:53	14:58	17:53	15:13	11:38	13:24	11:17	17:30
Maré baixa		18:56	12:21	10:15	09:26	12:06	09:41	18:00	20:00	17:45	10:56
Ponto 1	Hora da coleta	13:00	13:50*	#	10:45	12:21	16:20*	15:30	14:10	13:00	14:30*
Ponto 2	Hora da coleta	12:40	13:30*	#	10:30	11:55	16:00	15:10*	13:50*	12:38	14:12
Ponto 3	Hora da coleta	12:25	13:05*	13:00*	10:10	11:40	15:45*	14:50*	13:26*	12:25	13:50
Ponto 4	Hora da coleta	14:05*	12:15*	14:00*	11:05	12:45	16:40*	15:55	14:58	13:20	14:50
Ponto 5	Hora da coleta	#	12:30*	13:45*	11:15	13:01	16:45*	16:10	14:47	13:35	15:07
Ponto 6	Hora da coleta	#	#	#	#	#	#	11:40*	10:40	10:30*	11:00*

* - coletas cujos resultados foram positivos para o isolamento de *Campylobacter*.

Quadro 3- Altura do nível do rio/ horário das coletas baseado na tabela de marés do Porto do Forno – Arraial do Cabo/RJ.

Do total de 125 amostras analisadas, 55 foram ambientais (51 do rio e 2 de água de poço, 1 de reservatório de chuva, 1 de caixa d'água), onde obtivemos positividade de isolamento de *Campylobacter* em 22 amostras, 21 do rio São João e uma de água de poço, comprovadas pelas provas morfo-tintoriais e bioquímicas (Quadro 4).

Nº da amostra	Ponto	Resultado genérico (gênero)	Resultado específico (espécie)
04	ponto 4	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
05	ponto 4	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
06	ponto 5	<i>Campylobacter</i>	sp.
07	ponto 3	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
08	ponto 2	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
10	ponto 1	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
12	ponto 3	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
15	ponto 5	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
16	ponto 4	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
32	ponto 3	<i>Campylobacter</i>	sp.
35	ponto 1	<i>Campylobacter</i>	sp.
36	ponto 4	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
37	ponto 5	<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>
38	ponto 6	<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>
39	ponto 3	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
40	ponto 2	<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>
46	ponto 3	<i>Campylobacter</i>	<i>jejuni</i>
47	ponto 2	<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>
52	ponto 6	<i>Campylobacter</i>	sp.
59	ponto 6	<i>Campylobacter</i>	<i>coli</i>
62	ponto 1	<i>Campylobacter</i>	sp.
88	*	<i>Campylobacter</i>	sp.
Total de amostras positivas para <i>Campylobacter</i>			22

* Amostra de água de poço

Quadro 4 – Resultados positivos para *Campylobacter* nas amostras de origem ambiental por pontos de coleta.

7.2. Amostras de fezes

Foram coletadas 60 amostras de origem fecal (55 humanas e 5 de animais), do total já citado de 125 amostras trabalhadas. Destas, seis amostras, quatro de animais e duas humanas, apresentaram-se positivas na identificação do gênero

Campylobacter de acordo com as provas utilizadas. No quadro 5 podemos observar os dados referentes às amostras de fezes de origem humana trabalhadas nessa pesquisa.

Número total de amostras de fezes	Grupo etário		Sexo		Diarréia		Resultado	
	< de 18 anos	≥ de 18 anos	masc.	fem.	sim	não	positivo	negativo
55	26	29	26	29	14	41	2	53

Quadro 5 - Características do material de origem fecal humano analisado.

As duas amostras fecais humanas positivas (3,64%), confirmadas pela metodologia clássica e pelas provas moleculares, eram de indivíduos do sexo feminino, sem diarreia, maiores de 18 anos que freqüentavam a mesma associação de moradores do local. Foram encontradas duas diferentes espécies de *Campylobacter* (*coli* e *jejuni*). Ambas faziam uso de água de poço em sua rotina doméstica, todavia apenas em um destes poços houve o isolamento de *Campylobacter* sp.

Uma destas pessoas, justamente a que apresentou positividade na água do poço, autorizou a coleta de material fecal provenientes dos animais domésticos existentes em sua residência, como já foi explicado, o que permitiu o isolamento *Campylobacter* em 4 dos 5 materiais analisados (80% de positividade).

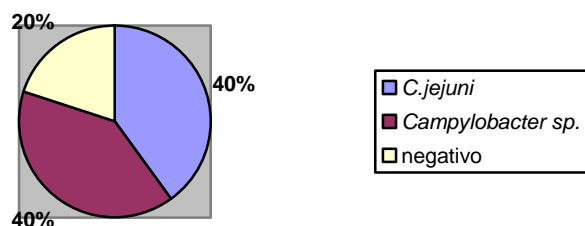


Gráfico 1 - Percentuais de positividade de *Campylobacter* em amostras coletadas de animais relacionados aos casos positivos em humanos.

Entre os isolados gerais de todas as fontes pesquisadas obtivemos 28 amostras positivas, das quais 14 foram agrupadas na espécie *jejuni* e 6 amostras na espécie *coli*. As demais ficaram agrupadas no gênero, denominadas de *Campylobacter spp.*

Após a caracterização bioquímica clássica as amostras foram submetidas, como já comentado, às extrações químicas através da Guanidina e da precipitação dos sais (kit G&E), sendo que nos dois métodos obtivemos DNA extraído com qualidade compatível com as necessidades para a execução dos testes moleculares. Em outras palavras os dois métodos de extração apresentaram eficácia similar.

De acordo com as explicações feitas no item material e métodos, foram realizadas após as extrações das amostras, as reações de amplificação em função dos iniciadores escolhidos (PCR).

A seguir (figura 4), encontram-se os resultados do primeiro gel de agarose a 1%, feito com os produtos do multiplex PCR com os *primers* associados às espécies *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*. pg3 (5'- GAACTTGAACCGATTTG - 3'),

pg50 (5'-ATGGGATTTTCGTATTAAC-3'), C1 (5'-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATG T-3'), C4 (5'-GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT- 3').

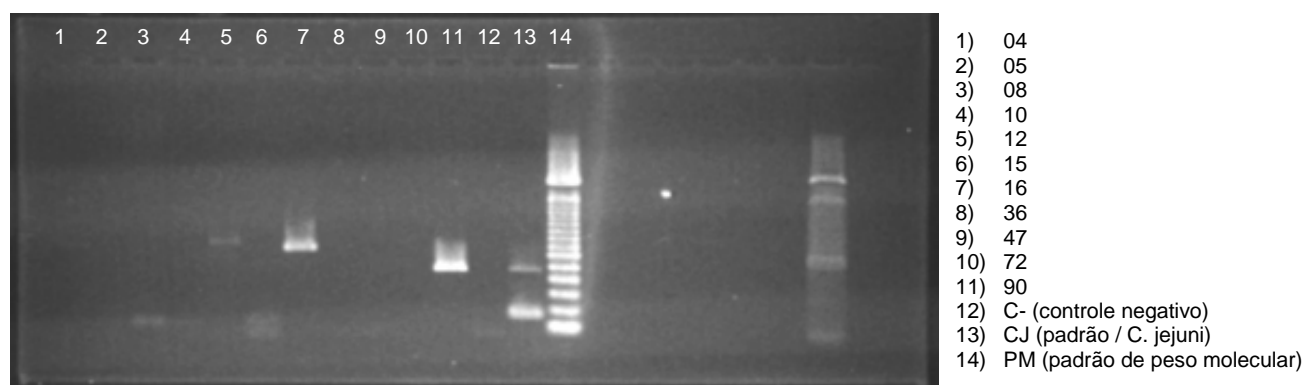


Figura 4 – Resultado da PCR associada à diferenciação das espécies.

Através deste gel, identificamos a amostra 90 como *Campylobacter coli*. Mas como não houve observação de bandas específicas para as duas principais espécies, *C.coli* e *C.jejuni*, confirmamos então, a qualidade da extração através de uma aplicação do material extraído em gel de agarose. A figura 5 demonstra a excelente qualidade da extração por esta técnica, mostrando que todas as amostras testadas possuíam DNA extraído.

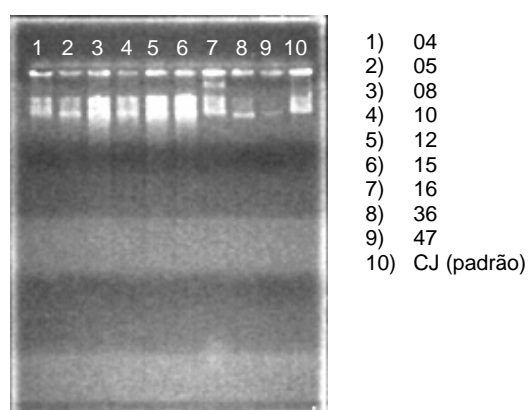


Figura 5 – Gel de agarose a 1% utilizado para visualizar a qualidade do DNA das amostras extraídas pela técnica da Guanidina.

Os géis foram repetidos com as amostras isoladas e os padrões positivos e negativos (novo PCR). As amostras 1 e 2, em ambos os géis, correspondem as amostras padrão de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*, respectivamente.

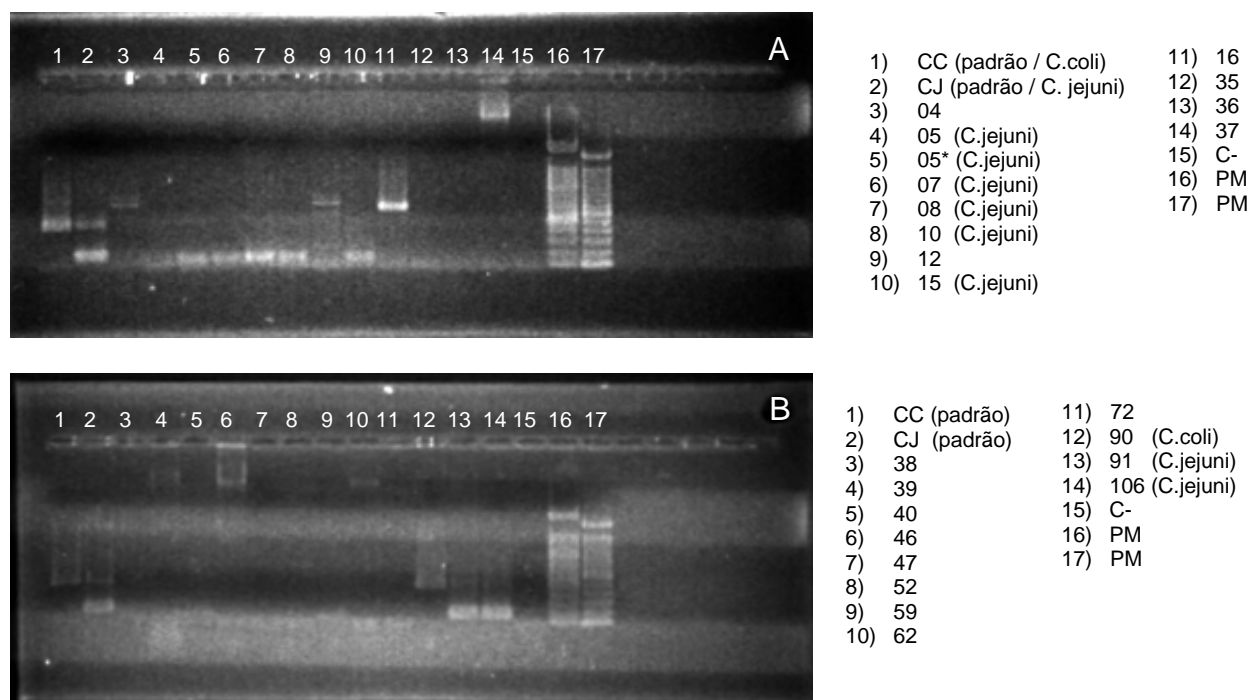


Figura 6 – Géis de agarose demonstrado o resultado da PCR com os primers associados a diferenciação das espécies.

Podemos observar na figura 6B a confirmação da espécie *C.coli* na amostra 90 (ave doméstica) e de *C.jejuni* nas amostras 5, 7, 8,10,15 (água do rio), 91 (ave doméstica) e 106 (humana).

Para a pesquisa molecular associada ao gênero, utilizamos primers que amplificam um fragmento de 816-pb somente encontrado nas espécies de *Campylobacter urease* positivos termotolerantes (UPTC) e *Ureolyticus*: C412F, 5'-GGATGACACTTTTCGGAGC-3' e C1288R, 5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'. O gel

da PCR realizada (Figura 7) mostra positividade nas amostras 47, 72 e 90, e controles.

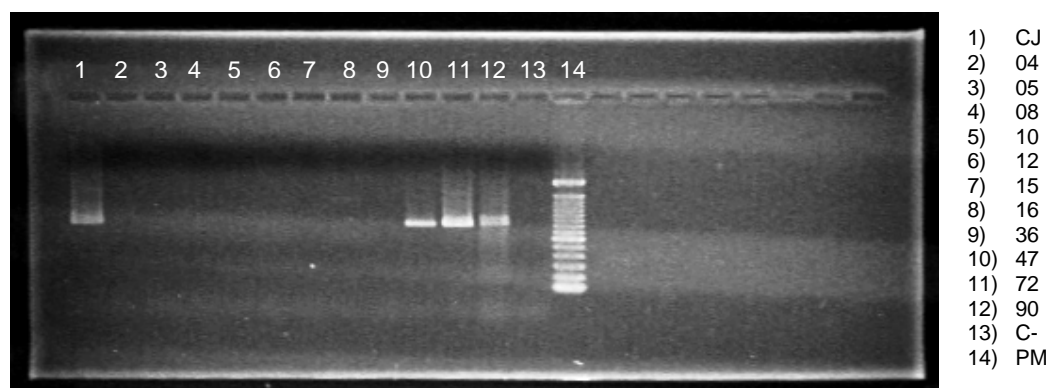


Figura 7 – Gel da PCR realizada com os *primers* de gênero (Linton et al.1996).

Como não haviam aparecido bandas em todas as amostras já confirmadas bioquimicamente como *Campylobacter*, repetimos a PCR (Figura 8):

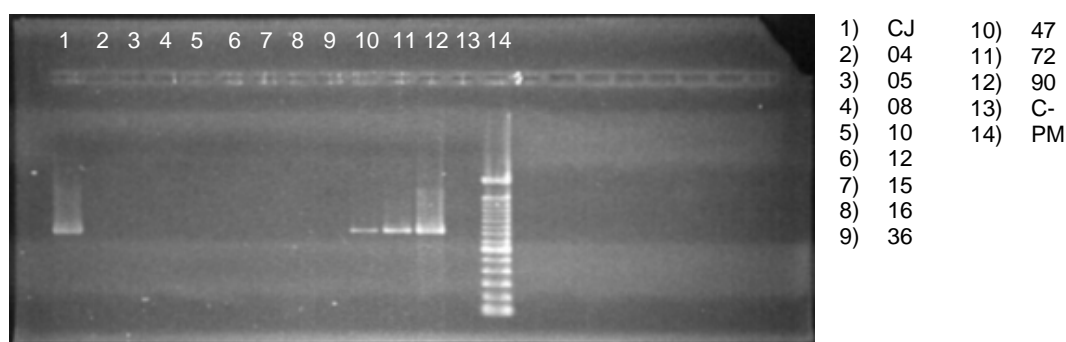


Figura 8 – Gel da PCR realizada com os *primers* de gênero, amostras extraídas pelo método da Guanidina.

Como os resultados foram semelhantes, tentamos realizar a reação com o material extraído pelo Kit G&E, utilizando inclusive novas amostras (Figura 9).



Figura 9 – Gel da PCR realizada com os *primers* de gênero, amostras extraídas pelo Kit G&E.

Observamos que a amostra 47, positiva no gel anterior, não apresentou banda neste gel. A partir desta dúvida, realizamos um gel do material extraído pelo kit (Figura 10), para confirmar a presença de material nesta amostra:

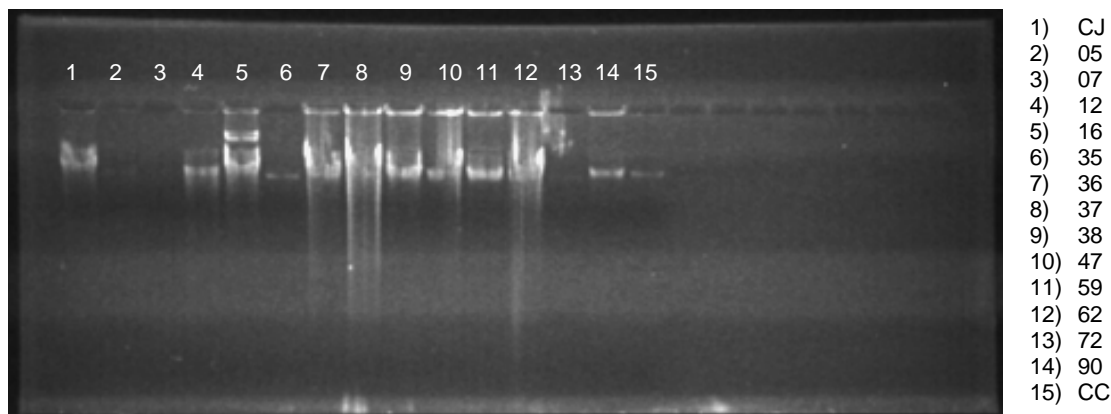


Figura 10 – Gel de agarose a 1% utilizado para visualizar a qualidade do DNA das amostras extraídas pela técnica do Kit G&E.

De acordo com a figura 10, a amostra 47 apresentou grande quantidade de DNA extraído, podemos imaginar que essa grande quantidade pode ter funcionado como um inibidor da reação, já que as amostras positivas apareceram com uma quantificação de DNA bem menor (1, 13, 14, 15). Foi realizada uma nova PCR utilizando quantidades um pouco menores de DNA, incluindo algumas amostras negativas e novas amostras extraídas (Figura11).

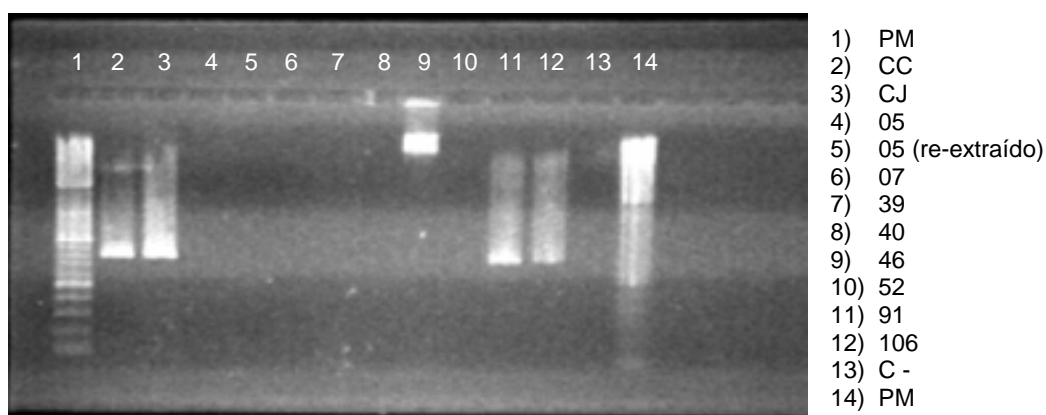


Figura 11 – Gel da PCR realizada com os *primers* de gênero, amostras extraídas pelo Kit G&E.

Outro resultado importante foi a positividade da amostra 90 (Figura 12), já confirmada como *Campylobacter coli* (Figura 4), a partir dos *primers* cadF, F2B e R1B, previamente descritos. A presença do gene associado a adesina de *Campylobacter*, que pode ser detectado entre isolados de *Campylobacter* de diversas fontes, gera uma proteína que pode ser considerada conservada (Bang et al. 2003 a, b).



Figura 12 – Gel de agarose realizado com os primers para evidenciação de presença de adesina (colonização)

8. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, e conhecendo a precariedade da rede de saneamento da região, podemos sugerir, com base na literatura científica, a existência de potencialidade para contaminação dos corpos d'água da região por cepas de *Campylobacter* spp. de origem fecal. Apesar da modesta positividade encontrada nas amostras de fezes humanas, onde houve isolamento deste microrganismo em duas amostras de conveniência de indivíduos residentes na localidade, que faziam uso de água proveniente de poço. A positividade constatada em animais do peridomicílio (80%) associada a de humanos (3,64%), vêm a contribuir para o risco acima sugerido, já que os animais também podem ser uma fonte de contaminação ambiental. Ressaltamos que as amostras de fezes de animais foram obtidas na residência de um dos indivíduos positivos para *Campylobacter*, o qual utilizava a água do poço, também positivo, para dar de beber aos animais e nas atividades domiciliares, evitando esta fonte para consumo próprio.

A ausência de sintomas diarreicos, nos indivíduos positivos, pode estar relacionado ao contato precoce e freqüente com o microrganismo, característico de populações de países em desenvolvimento, que pode levar ao desenvolvimento de imunidade parcial, ainda na infância, resultando em quadros leves ou assintomáticos na idade adulta (Tosin & Machado 1995).

A questão fundamental, em termos de saúde pública, está associada à melhoria das condições sanitárias desta população, o que levaria a diminuição no

número episódios de contato precoce e a conseqüente infecção por agentes bacterianos patogênicos diversos, entre esses o próprio *Campylobacter*.

Com base nos resultados obtidos, consideramos que a metodologia utilizada na coleta/transporte e isolamento se mostrou apropriada para este tipo de análise, propiciando o isolamento de 28 amostras positivas para *Campylobacter* em 125 amostras coletadas. Cabe ressaltar, novamente, que esta é uma bactéria fastidiosa, que muitas vezes não se consegue detectar com facilidade.

Durante o processamento das amostras de origem ambiental, observamos que as mesmas demoraram um tempo muito maior para se desenvolver nos meios de cultura clássicos, do que as amostras provenientes de animais e humanos. Nesses isolamentos, foi necessário aguardar até 96hs para obtenção de crescimento em placa enquanto que, nas outras amostras (fezes) em 48hs já era possível detectar o crescimento bacteriano. Como a necessidade de aguardar um tempo superior, ao normalmente utilizado para detectar esse crescimento, não era descrita na literatura, somente a observação insistente do pesquisador, possibilitou chegar a esses achados.

Um dos problemas encontrados durante a coleta de material ambiental, foi a dificuldade de aliar o tempo necessário para coletar as amostras em Barra de São João, com o tempo de deslocamento até o laboratório para processamento das amostras no mesmo dia, já que todo procedimento deveria ser realizado em um intervalo máximo de seis horas para não prejudicar a qualidade da amostragem.

Outra grande dificuldade encontrada foi em relação à obtenção de amostras fecais. Houve pouco interesse das autoridades contactadas em participar do estudo, apesar da apresentação de carta de solicitação da instituição. Essa pouca aceitação gerou dificuldades para a obtenção de uma amostra aleatória, sendo necessário utilizar uma amostra de conveniência, a qual pode prover resultados interessantes, mas não tem o mesmo peso na avaliação probabilística, já que o pesquisador acaba selecionando membros da população mais acessíveis.

Em relação às amostras d'água, das 51 amostras coletadas no rio São João, obteve-se 21 positivas, perfazendo um alto percentual (41,17%) de amostras positivas isoladas. Esses dados se contrapõem à Carlier (1994) que afirma não ser fácil o isolamento de *Campylobacter* do ambiente devido às suas exigências, mas corrobora outros estudos onde foi efetuado esse tipo de isolamento (Rollins & Colwell 1986, Filgueiras & Hofer 1989, Filgueiras 1992). Pode-se também inferir que o rio São João apresenta grande potencial para a manutenção destes microrganismos e, possivelmente, de outras bactérias Gram negativas menos exigentes.

Quando realizamos uma comparação entre as coletas realizadas no rio São João (Quadro 3), o material obtido na Barragem (ponto 6), local mais afastado da foz do rio, foi o que se mostrou com maior percentual de isolamento (75%), uma vez que foram realizadas 4 coletas neste local e somente uma não apresentou positividade. Este é um ponto de concentração das águas provenientes do próprio rio São João e seus afluentes e de água de infiltração de diversos locais ao redor da barragem. Por

ser uma obra feita pelo homem, o local sofre um impacto ambiental considerável, já que normalmente essas águas não permaneceriam armazenadas nesta barragem.

Gostaríamos de chamar atenção para a ausência de *Campylobacter* spp. nas amostras coletadas na rede pública de abastecimento, demonstrando que o processo de tratamento parece ser eficiente, no que diz respeito a eliminação de bactérias deste gênero. Os trabalhos da HPA (2007) afirmam que a água pode ser um importante reservatório deste microrganismo e segundo Bolton et al. (1987) diversos surtos de campilobacteriose veiculados por água de rios já ocorreram em outras partes do mundo.

Quanto às amostras fecais, a partir de conversas com moradores da região do entorno dos pontos de coleta, tomamos ciência da ocorrência de alguns episódios diarréicos na localidade. Todavia, não foram isoladas cepas de *Campylobacter* de indivíduos diarréicos. Em contrapartida, duas pessoas aparentemente saudáveis, que se propuseram, a participar deste estudo apresentaram positividade para este gênero. Em geral, o isolamento de *Campylobacter* proveniente de fezes é de mais fácil obtenção, pela quantidade de bactérias por grama de fezes nesse material, que é muito superior a geralmente obtida de material aquático, onde entra o fator diluição e, também, porque a metodologia utilizada é indicada para material fecal. Entretanto, em nosso estudo, o isolamento de *Campylobacter* foi obtido em maior número em amostras ambientais e animais, Sendo possível, que a sintomatologia diarréica associada aos humanos, que tiveram amostras analisadas em nosso estudo, fosse devido a outros tipos de microrganismos ou estivesse associada a distúrbios alimentares. Acrescentamos

que os indivíduos positivos freqüentavam a mesma associação (Associação de Amigos do Segundo Distrito de Cabo Frio) e que esta somente atende aos moradores da margem oeste do Rio São João, prestando pequenos serviços de interesse público como atendimento gratuito fisioterápico, cursos de curta duração e de informática entre outros.

Quanto aos resultados de biologia molecular, a avaliação morfo-tintorial e as análises bioquímicas propiciaram a identificação clássica de 28 isolados de *Campylobacter* sp. do total de 125 amostras coletadas. Todavia, como nem todas as amostras foram confirmadas pelas técnicas moleculares, algumas colocações são importantes.

Como podemos observar nas figuras 6, 7 e 9, várias amostras classicamente identificadas como *Campylobacter* não apresentaram, no gel de agarose, bandas compatíveis com o peso molecular do fragmento esperado para o gênero. Segundo Lund (Lund et al. 2003), concentrações muito grandes de DNA podem inibir a reação da PCR, impedindo a visualização das bandas. Apesar desses trabalhos terem sido feitos em amostras de fezes, os autores obtiveram um rendimento bem maior em suas reações para *Campylobacter*, após diluições de até 1/10 do material extraído. Realmente, observando a figura 8, podemos constatar que algumas amostras apresentaram grandes quantidades de DNA extraído, Isso indica a necessidade de estudos futuros, utilizando diferentes concentrações desse material, para avaliar a quantidade ideal de DNA a ser utilizada nestes experimentos.

Um exemplo dessa situação é a amostra de número 47, que foi positiva para gênero a partir da PCR feita com o material extraído pelo método da guanidina (Figura 8), mas que se apresentou negativa quando submetida a mesma reação após extração pelo KIT G&E (Figura 9). Novamente observando as extrações podemos comparar a figura 3 (extração pela guanidina) com a figura 8 (extração pelo KIT G&E) observamos na primeira, que a amostra 47 se apresenta com uma quantidade extremamente menor de DNA do que a segunda, o que pode explicar sua positividade nas PCRs realizadas a partir deste método.

Outro resultado importante diz respeito à positividade da amostra 90 (Figura 12), confirmada como *Campylobacter coli* (Figura 4), a partir dos *primers* cadF (F2B e R1B), previamente descritos, associados à virulência. A presença do gene associado à adesina de *Campylobacter*, que pode ser detectado entre isolados de *Campylobacter* de diversas fontes, gera uma proteína que pode ser considerada conservada (Bang et al. 2003 a, b). Segundo os autores, sua atividade e envolvimento na colonização de *Campylobacter* foram demonstrados *in vivo* em diferentes cepas de *C. jejuni*. Essa amostra foi proveniente de frango presente no peridomicílio de um dos doadores de fezes, o qual também apresentou positividade para a espécie *C. coli*, demonstrando que pode haver um contato cruzado entre o portador humano e animal.

No Brasil, poucos trabalhos têm relatado o isolamento de *Campylobacter* do meio ambiente ou de processos diarréicos, induzindo à idéia de que o isolamento dessa espécie fosse um acontecimento incomum (Carlier, 1994). Talvez esse fato tenha ocorrido devido a combinação de várias características, tais como a falta de

variação sazonal, doença branda e as elevadas taxas de infecções com múltiplos agentes patogênicos (Taylor 1992). Além disso, muitos laboratórios clínicos comumente não identificam *Campylobacter* em sua rotina, uma vez que são organismos fastidiosos e apenas um reduzido número de testes bioquímicos estão disponíveis (Vilardo et al 2006), levando o gênero a ser negligenciado nos estudos de saúde pública realizados em nosso país.

Com base em trabalhos publicados em outros países (Pianetti et al 1998, Jones 2001, Moore et al 2001, Daczowska-Kozon & Brzostek-Nowakowska 2001, Fernandez et al 2003, Devane et al 2005), e nos resultados do presente estudo, verifica-se que seu isolamento não é um fato tão incomum como se supunha, considerando o alto índice de isolamento em amostras ambientais e a presença de portadores animais e humanos assintomáticos.

Considerando a evolução das técnicas que podem ser empregadas na atualidade, verifica-se que hoje é mais fácil o estudo desse microrganismo e de seu papel como indicador de contaminação ambiental.

Já que o trato digestivo é a porta de entrada para essa bactéria e o trato intestinal, a sua forma de eliminação para o exterior, não se pode deixar de considerar os trabalhos de Jones et al. (1990), Filgueiras & Hofer (1989) entre outros, e pensar no possível papel desempenhado pelas águas de esgoto, que se lançadas sem tratamento nos mananciais hídricos podem servir de fonte de contaminação de várias formas. Na região estudada, muitos moradores não

possuem acesso ao saneamento básico e criam animais domésticos em seu peridomicílio, o que poderia contribuir para o quadro observado.

Apesar desses indicadores, o número de trabalhos que consideram o estudo de *Campylobacter* em águas de esgoto e outros ambientes ainda é muito incipiente (Filgueiras 1992). Uma das principais razões do desinteresse por esses estudos é a ausência de informação sobre a distribuição ecológica de *Campylobacter* no Brasil, apesar de ter sido amplamente estudado em outros países (Alary & Nadeu 1990, Jones 2001) que demonstraram que sistemas hídricos desprotegidos podem servir como forma de contaminação por bactérias deste gênero.

Corroboramos a metodologia de escolha, desde a coleta até o isolamento, combinando a identificação clássica com a molecular, já que possibilitava atingir os objetivos propostos no estudo, com o intuito de contribuir para a melhoria na quantidade e qualidade da água disponível e consumida pela população e para a redução dos problemas de saúde decorrentes do uso de água contaminada.

As questões ambientais atualmente estão na pauta dos debates mundiais, porém, na prática, pouco está sendo feito para proteger o elemento essencial para vida humana, a água. A degradação dos recursos hídricos é crescente, pois acompanha as atividades humanas de urbanização, desmatamento, agricultura e industrialização que provocam todo tipo de contaminação. É preciso posturas mais firmes em termos de legislação contra o desperdício de água e contra a degradação de nossos mananciais de abastecimento, para que o consumo no futuro seja garantido.

Acreditamos que este trabalho venha contribuir para aumentar as informações disponíveis em nosso país sobre a distribuição deste gênero bacteriano em ambientes aquáticos e sua possível transmissão hídrica.

9. CONCLUSÕES

O isolamento de *Campylobacter* no rio São João sugere contaminação deste manancial por bactérias potencialmente patogênicas pertencentes a esse gênero, indicando também que as técnicas disponíveis e que foram utilizadas para isolamento são adequadas.

O isolamento de *Campylobacter* spp. de amostras ambientais do rio São João indica que este ambiente possui potencial para manutenção destas espécies, representando um alerta para o monitoramento constante do local.

A ausência de *Campylobacter* spp. na água distribuída pela rede pública de abastecimento indica a possível efetividade no processo de tratamento, uma vez que a água é retirada da lagoa de Juturnaíba, um dos pontos que apresentou maior positividade de isolamento deste gênero dentro do nosso estudo.

A existência de portadores assintomáticos humanos e animais de *Campylobacter* merece atenção especial, no que diz respeito à disseminação desta bactéria no ambiente aquático, já que o sistema de tratamento de esgoto na região é precário e os dejetos *in natura* acabam sendo lançados direta ou indiretamente no rio São João ou seus afluentes. Porém a ausência de portadores sintomáticos nesse estudo, não quer dizer obrigatoriamente que estes não desempenhem importante papel na disseminação desses microrganismos para o ambiente. O uso de uma amostragem aleatória da população do sítio de estudo, pode vir a revelar dados diferentes dos obtidos com a amostragem por conveniência.

Com relação à metodologia de isolamento utilizada, podemos concluir que essa se mostrou interessantemente eficiente, uma vez que trata-se de uma técnica usada para o isolamento de *Campylobacter* spp. direto de fezes, sendo que para esse estudo, adaptamos os procedimentos de coleta e concentração por centrifugação para a obtenção de espécimens provenientes de amostras de água.

O aumento do tempo de incubação de 48 horas (recomendado para amostras de fezes) para 96 horas favoreceu a identificação de amostras positivas em materiais classificados inicialmente como negativos, após leituras realizadas com crescimentos de 48 horas. Essa adequação favoreceu o aumento dos índices de positividade (mais confiáveis), pela redução do potencial de identificação equivocada de falsos negativos.

Pudemos também observar a potencialidade de bactérias do gênero *Campylobacter* para servirem de indicadores de contaminação ambiental recente, por material fecal proveniente do lançamento de esgotos não tratados em corpos d'água como rios e lagoas. Destacamos o termo recente, em virtude das dificuldades de sobrevivência do *Campylobacter* em ambientes hostis a sua manutenção, principalmente devido a condições inadequadas de tensão de oxigênio, temperatura, disponibilidade de nutrientes e de competição com outros microrganismos.

Com relação aos resultados obtidos através das técnicas moleculares, fica a idéia da necessidade da realização de procedimentos de quantificação do DNA extraído, para obtenção de um valor, em termos de quantidade (padronização), para

a geração de dados mais substanciosos, associados ao perfil genético das trabalhadas.

10. PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS E RECOMENDAÇÕES

- Acreditamos que seja muito importante no futuro próximo, a realização de outros trabalhos:

- Na região, visando o manejo hídrico da bacia do rio São João, a melhoria ecológica e a preservação do ecossistema natural dentro de um conceito de desenvolvimento sustentável, já que a localidade serve como atrativo turístico estimulando a geração de renda local.
- A partir dos microrganismos isolados:
 - Avaliando a capacidade de sobrevivência natural de *Campylobacter* spp. em diferentes condições impostas pelo ambiente.
 - A realização de experimentos posteriores de biologia molecular:
 - Utilizando diferentes concentrações do DNA extraído para avaliação da quantificação ideal para realizar a técnica da PCR sem inibições.
 - Aumento da especificidade dos estudos incluindo seqüenciamento molecular das cepas não tipificadas na presente pesquisa.

A idéia de se realizar trabalhos de escopo semelhantes a este esta pautada na contribuição com dados para subsidiar a construção de futuras políticas públicas de vigilância em saúde para a formulação de estratégias de intervenção local, como o manejo destes corpos hídricos e melhoria do saneamento, favorecendo não só a ecologia, mas também o desenvolvimento mais sustentável da região. Este trabalho é apenas um olhar inicial sobre o assunto, nós acreditamos que, a partir destas idéias, outros poderão se seguir, contribuindo para a formação de um quadro que retrate a realidade local.

11. Referências Bibliográficas

Agenda 21: Conferência das Nações Unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento [Internet]. Cap. 18. 1992 – [acessado em 03 fev 2008]. Disponível em: <http://www.ibot.sp.gov.br/legislacao/agenda21.htm>

Alary M, Nadeau D. An outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with a community water supply. Can J Public Health. 1990 Jul-Aug; 81(4):268-71.

Andrade MCR, Gabeira SCO, Abreu-Lopes D, Esteves WTC, Villardo MCB, Thomé JDS, Cabello PH, Lauria-Filgueiras AL. Circulation of *Campylobacter* spp. in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) held in captivity: a longitudinal study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(1): 53-57.

Arvanitidou M, Constantinidis TC, Katsouyannopoulos VAS. A survey on *Campylobacter* and *Yersinia* spp. occurrence in sea and river waters in Northern Greece. The Science of the Total Environment. 1995 Oct 27; 171(1):101-06.

Bang DD, Neilsen EM, Scheutz F, Pedersen K, Handberg K, Madsen M. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. J Appl Microbiol, 2003a; 94:1003-14.

Bang DD, Scheutz F, Gradel KO, Nielsen EM, Pedersen K, Engberg J, Gerner-Smidt P, Handberg K, Madsen M. Detection of seven virulence and toxin genes of

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* isolates from different sources and cytolethal distending toxin production suggest potential diversity of pathogenic properties among isolates. *Genome Letters (J Genome Sci Technol)*. 2003b;2:62-72.

Barroso LV. Impacto ambiental na bacia do rio São João, RJ. 1988; São Paulo(SP). (Anais da Sem Reg Ecol; vol.6) 1988. p57-72.

Bhavsar SP, Kapadnis BP. Virulence factors of *Campylobacter*. *The Internet Journal of Microbiology*. [Internet]. 2007 [acessado em 05 out 2008]; 3(2):. Disponível em: <http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijmb/vol3n2/campylo.xml>

Binder, W. Rios e Córregos. Preservar – Conservar – Renaturalizar. A Recuperação de rios. Possibilidades e limites da engenharia ambiental. Rio de Janeiro: PLANÁGUA- SEMADS/ GTZ; 1998. 41p.

Bolton FJ, Coates D, Hutchinson DN, Godfree AF. A study of thermophilic *Campylobacters* in a river system. *Journal of Applied Bacteriology*. 1987 Feb; 62(2):167-76.

Bonatto, A. Uma alternativa para o esgotamento sanitário em áreas periféricas no município de Curitiba – Paraná. *Revista Espaço para a Saúde*. 2000 Jun;1(2):164-195.

Bordalo AA, Onrassami R, Dechsakulwatana C. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). *Journal of Applied Microbiology*. 2002; 93:864-871.

Brasil, Ministério da Saúde. Desenvolvimento do Sistema Único de Saúde no Brasil: Avanços, desafios e reafirmação de princípios e diretrizes. *Saúde Debate*. 2002 set-dez; 26(62):295-310.

Brasil, Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 4.ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. Doenças diarreicas agudas; p. 111-13.

Brookes A. Channelized Rivers. Perspectives for environmental management. Great Britain: WileyBlackwell; 1988. 342p.

Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*, Paris: 2004 Oct; 10(10):868-76.

Butzler JP. *Campylobacter* infection in men and animals. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1984. 232p.

Butzler JP, Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis. *Clin Gastroenterol*. 1979 Sep; 8(3):737-65.

Carlier V. Les campylobacterioses. Bulletin de la Societe Veterinaire Pratique de France. 1994; 78(6-7):333-37.

CDC: Epidemiologic notes and reports *Campylobacter* Outbreak associated with certified raw milk products - California. MMWR. 1984 Out 05; 33(39):562p.

CDC: How common is *Campylobacter*? Disease Listing [internet]. USA:Center of diseases control and Prevention. 2009a – [Acessado 20 Jan 2009]. Disponível em: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/Campylobacter_gi.html

CDC: *Campylobacter* infections. Disease Information [internet]. USA: Center of diseases control and Prevention. 2009b – [Acessado 20 Jan 2009]. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/Campylobacter_t.htm

CIDE – Centro de Informações e Dados do Rio de Janeiro. Anuário estatístico do Estado do Rio de Janeiro. 1999-2000. Rio de Janeiro: CIDE; 2001. 589p.

Collares EG. Avaliação de alterações em redes de drenagem de sub-bacias como subsídio ao zoneamento geoambiental de bacias hidrográficas: Aplicação na bacia hidrográfica do rio Capivari-SPP [Tese de Doutorado]. [Campinas(SP)]: Universidade de São Carlos; 2000. 211p.

Cook KL, Bolster CH. Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. Journal of Applied

Microbiology [internet]. 2007 [acessado 10 Jun 2007]; 103(3): 573-83. Disponível em: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2006.03285.x>

Cowden J. *Campylobacter*: epidemiological paradoxes. Br Med J. 1992 July 18; 305(6846): 132–33.

Cunha AC, Cunha HFA, Souza JÁ, Nazaré AS, Pantoja S. Monitoring of superficial waters in estuary rivers in Amapá State under fecal pollution. Bol Mus Para Emílio Goeldi, sér Ciências Naturais. 2005; 1(1): 191-99.

Daczowska-Kozon E, Brzostek-Nowakowska J. *Campylobacter* spp. in waters of three main Western Pomerania water bodies. Int J Hyg Environ Health. 2001;203:435-43.

Demanboro AC, Mariotoni CA. O Conceito de Escala e o Desenvolvimento Sustentável: Implicações sobre os Recursos Energéticos e Hídricos. [Internet]. Campinas(SP): Projeto Água – Unicamp; 2001 Jan [Acessado 20 Dez 2008]. Disponível em: <http://www.eco.unicamp.br/projetos/agua/artigos.html>

De Dominicis R. Studio ed applicazione di tecniche basate sull'analisi del DNA di microrganismi patogeni per la valutazione della sicurezza degli alimenti. [Tese de Doutorado]. [Nápoles(NA)] Università degli studi di Nápoli Federico II Facoltà di medicina veterinaria; 2006. 93p.

Devane ML, Nicol C, Ball A, Klena JD, Scholes P, Hudson JA, Baker MG, Gilpin BJ, Garrett N, Savill MG. The Occurrence Of *Campylobacter* Subtypes In Environmental Reservoirs And Potential Transmission Routes. *Journal of Applied Microbiology*. 2005; 98:980-90.

Dorner SM, Anderson WB, Gaulin T, Candon HL, Slawson RM, Payment P, Huck PM. Pathogen and indicator variability in a heavily impacted watershed. *J Water Health*. 2007 Jun;5(2):241-57.

Englen MD, Kelley LC. A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*. 2000; 31:421-26.

Esteves MLB, Cavalini LT, Estima CLW, Amaral L. Mortalidade por gastroenterite em menores de cinco anos, no Brasil, 1997 - 2001: um estudo por bacia hidrográfica. Artigo no 7º. Simpósio de Hidráulica e Recursos Hídricos dos Países de Língua Oficial Portuguesa; 2005 mai 30 – jun 2; Évora, Portugal. Lisboa: SILUSBA; 2005. p.16-18.

FDA: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Campylobacter jejuni*. [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. 2009 – [acessado 12 Jan 2009]. Disponível em: <http://www.foodsafety.gov/~mow/chap4.html>

Fernandes Neto ML, Ferreira AP. Perspectivas da sustentabilidade ambiental diante da contaminação química da água: Desafios normativos. *Interfaces - Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente*. 2007; 2:1-15.

Fernandez H, Otth L, Wilson M. Aislamiento de especies termotolerantes de *Campylobacter* de aguas fluviales utilizando dos métodos de colecta. *Arch med vet*. 2003 ene;35(1):95-7.

Filgueiras ALL, Hofer E. Ocorrência de *Campylobacter* termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Rev Microbiol*. 1989; 20:303-8.

Filgueiras ALL. Pesquisa de *Campylobacter* termofílicos em estações de tratamento de esgotos, na cidade do Rio de Janeiro, RJ [dissertação de mestrado]. [Belo Horizonte (MG)]: Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas; 1992. 80 p.

Fischer SH, Nachamkin I. Common and variable domains of the flagellin gene, *flaA*, in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*. 1991; 5(5):1151-58.

Francisco CN, Carvalho CN. Disponibilidade hídrica - da visão global às pequenas bacias hidrográficas: o caso de Angra dos Reis, no Estado do Rio de Janeiro. *Rev de Geociências* [internet]. 2004 [acessado 10 dez 2008]; 3(3): Disponível em: <http://www.professores.uff.br/cristiane/Documentos/Art%20rev%20geo%20-%20final%20revisada%20completa.pdf>

G&E Healthcare UK Limited. 27-5237-01PL. rev. B. UK; 2006. 39p.

Geo Brasil. Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil. Santos TCC e Câmara JBD, organizadores. Brasília: Edições IBAMA, 2002. 440p.

Harmon KM, Ramsom GM, Wesley IV. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 1997; 11:195-200.

HPA: Detection of *Campylobacter* species in water. National Standard Methods 8(3). [internet]. Health Protection Agency. 2007 - [acessado 21 Dez 2008]. Disponível em: <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/water/pdf/w8.pdf>

Ioannidis A, Nicolaou C, Legakis NJ, Ioannidou V, Chatzipanagiotou S. The first database comprised of flagellin gene (*flaA*) types of *Campylobacter jejuni* human clinical isolates from Greece. European Journal of Epidemiology. 2006; 21(11):823-29.

Jones K. *Campylobacters* in water, sewage and the environment. Journal of Applied Microbiology. 2001; 90:68-79.

Jones K, Betaieb M, Telford DR. Correlation between environmental monitoring of thermophilic campylobacters in sewage effluent and the incidence of *Campylobacter* infection in the community. Journal of Applied Microbiology. 1990 Aug; 69(2): 235-40.

Konkel ME, Gray SA, Kim BJ, Garvis SG, Yoon J. Identification of the Enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Based on the *cadF* Virulence Gene and Its Product. *Journal Clin Microbiol.* 1999 March; 37(3):510-17.

Kusiluka LJM, Karimuribo ED, Mdegela RH, Luoga EJ, Munishi PKT, Mlozi, MRS, Kambarage DM. Prevalence and impact of water-borne zoonotic pathogens in water, cattle and humans in selected villages in Dodoma Rural and Bagamoyo districts, Tanzania. *Physics and Chemistry of the Earth.* 2005; 30:818-25.

Leal MS, La Rovere EL. Implantação e Operacionalização do Modelo de Gestão de Recursos Hídricos. 1997; Vitória(ES). (Anais do Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos); 1997. p12. Acompanhado por: 1 CD-ROM.

Leal MS. Gestão Ambiental de Recursos Hídricos: Princípios e Aplicações. Rio de Janeiro: CPRM; 1998. 176p.

Lehtola MJ, Pitkanen T, Miebach L, Miettinen IT. Survival of *Campylobacter jejuni* in potable water biofilms: a comparative study with different detection methods. *Water Sci Technol.* 2006; 54(3):57-61.

Lee Liao PSD, Bezerra JM, Bastos OC, Barreto GMC. Análise dos indicadores bacterianos de poluição dos rios Anil e Bacanga na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 1984;18(4) 278-87.

Lima NV, Figueiroa ACTA, Prado AD, Filgueiras ALL, Hofer E. *Campylobacter* e Outros Enteropatógenos em Processos Diarrêicos Infantis no Recife, Pernambuco. Rev Bras de Análises Clínicas. 1993; 25(3):71-74.

Linton D, Owen RJ, Stanley J. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. Res Microbiol. 1996; 147:707-18.

Lund M, Wedderkopp A, Wainø M, Nordentoft S, Bang DD, Pedersen K, Madsen M. Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark. Journal of Applied Microbiology. 2003; 94:929-35.

Martin S, Penttinen P, Hedin G, Ljungstrom M, Allestam G, Andersson Y, Giesecke J. A case-cohort study to investigate concomitant waterborne outbreaks of *Campylobacter* and gastroenteritis in Soderhamn, Sweden, 2002-3. J Water Health. 2006; 4(4):417-24.

Milaré E. Direito do Meio Ambiente, São Paulo: Revista dos Tribunais; 2000. p.93.

MMARH - Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Política Nacional da Recursos Hídricos, L. No. 9.433 (Jan. 8, 1997).

Montolio TS, Jordán Vidal MM, Sanfeliu AB. Contaminación y medio ambiente. Illustrated ed. Santiago (Chile) - Castellón (España): Universitat Jaume I; 2005. 507p.

Moore JE, Caldwell PS, Millar BC, Murphy PG. Occurrence of *Campylobacter* spp. in water in Northern Ireland: implications for public health. *The Ulster Medical Journal*. 2001 Nov; 70(2):102-07.

Muller J, Schulze F, Muller W, Hanel I. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Vet Microbiol*. 2006; 113:123-29.

Obi CL, Potgieter N, Bessong PO, Matsaung G. Scope of potential bacterial agents of diarrhoea and microbial assessment of quality of river water sources in rural Venda communities in South Africa. *Water Science and Technology*. 2003; 47(3):59-64.

Oliveira TMV. Amostra não probabilística: Adequação de situações para o uso e limitações de amostras por conveniência, Julgamento e Quotas. *Administração On Line* 2(3). [internet]. Fecap. 2001 - [acessado 16 Fev 2009]. Disponível em: http://www.fecap.br/adm_online/art23/tania2.htm

OMS: *Campylobacter* – The agent [Internet]. Geneva: World Health Organization. 2000 – [Acessado 16 Fev 2009]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>

OMS: Water quality - Guidelines, standards and health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease [Internet]. Geneva: World Health

Organization. 2001 – [Acessado 10 Jun 2007]. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/whoiwa/en/index.html

O'reilly CE, Bowen AB, Perez NE, Sarisky JP, Shepherd CA, Miller MD, Hubbard BC, Herring M, Buchanan SD, Fitzgerald CC, Hill V, Arrowood MJ, Xiao LX, Hoekstra RM, Mintz ED, Lynch MF. A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004. *Clin Infect Dis*. 2007, 44(4):506-12.

Pádua HB. Informações sobre os Coliformes totais/ fecais e alguns outros organismos indicadores, em sistemas aquáticos – Aqüicultura [internet]. Goiás: Caderno de Doutrina Ambiental; 2003 Ago [Acessado 12 Out 2007]. 20p. Disponível em: http://www.serrano.neves.nom.br/helcias/018_helcias.pdf

Pavan MFB, Mamizuka EM, Martinez MB. Leucócitos fecais na diarreia aguda por *Campylobacter* sp termofílico. *Rev Farm Bioquim Univ São Paulo*. 1988 jan.-jun; 24(1):62-70.

Pianetti A, Baffone W, Bruscolini F, Barbieri E, Biffi MR, Salvaggio L, Albano A. Presence of several pathogenic bacteria in the metauro and foglia rivers. *Water Research*. 1998; 32(5):1515-21.

Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*. 1989; 8:151-56.

Planágua - SEMADS/GTZ. Ambiente das Águas no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: SEMADS, Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável; 2001. 230p.

Pope C, Wilson J, Taboada EN, Mackinnon J, Alves CAF, Nash JHE, Rahn K, Tannock GW. Epidemiology, Relative Invasive Ability, Molecular Characterization, and Competitive Performance of *Campylobacter jejuni* Strains in the Chicken Gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73:7959-66.

Rato AMGG, Macedo CEC. Saneamento básico no Estado do Rio de Janeiro. In: Gestão de Recursos Hídricos e de Saneamento - A Experiência Alemã. 1997: Rio de Janeiro (RJ): FIRJAN Anais - Projeto PLANÁGUA - SEMADS/ GTZ; 1997.

Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Highes RA. *Campylobacter jejuni* Infection and Guillain-Barré Syndrome. *N Engl J Med*. 1995; 333:1374-79.

Richardson G, Thomas DR, Smith RM, Nehaul L, Ribeiro CD, Brown AG, Salmon RL. A community outbreak of *Campylobacter jejuni* infection from a chlorinated public water supply. *Epidemiol Infect*. 2007 Oct; 135(7):1151-58.

Rios JLP, Berger SG. Estudos Sócio-Econômicos e de Demanda de Água para a RMRJ. Seminário Bacia Hidrográfica do rio Guandu - Problemas e Soluções [CD-ROM]. Seropédica (RJ): UFRRJ/SERLA; 2002. 1 CD-ROM: 4 3/4 in.

Rollins DM, Colwell RR. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol*. 1986 Sep; 52(3): 531-38.

Ruiz-Esquide F, Lafourcade M, Fernández H. Neonatal *Campylobacter coli* enteritis and bacteraemia. *B J Microbiology*. 2003; 34:341-43.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001. 2100p.

Sandberg M, Nygard K, Meldal H, Valle PS, Kruse H, Skjerve E. Incidence trend and risk factors for *Campylobacter* infections in humans in Norway. *BMC Public Health*. 2006 Jul 7; 6:179.

Saunders CAB. Diagnóstico ambiental da bacia hidrográfica do rio São João-RJ, visando à renaturalização do Canal Aldeia Velha [Dissertação de Mestrado]. [Niterói(RJ)]: Universidade Federal Fluminense; 2003.106p.

Saunders CAB, Nascimento EA. Proposta para renaturalização de rios da bacia hidrográfica do rio São João RJ. Congresso Brasileiro de Cadastro Técnico Multifinalitário; 2006 Out 15-19; Florianópolis(SC): UFSC; 2006.

Saunders CAB, Rezende VFLM, Diretrizes para a renaturalização do rio Aldeia Velha, no município de Silva Jardim – RJ [Internet]. Rio de Janeiro: 2003

[acessado 10 Nov 2008]. Disponível em: http://www.cartografia.org.br/xxi_cbc/167-H03.pdf

Scarcelli E, Genovez ME, Cardoso MV, Souza MCAM, Grasso LMPS, Souza CAI, Torres AP. Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp. por diferentes espécies animais. Arquivos do Instituto Biológico. 1998; 65(1):55-61.

Sebald M, Veron M. Teneur en bases de L'ADN et classification des vibrions. Ann Inst Pasteur (Paris). 1963 Nov; 105:897-910.

SEMADS - Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Ambiente das águas no Estado do Rio de Janeiro. Volume 10. ed. W. Weber. Rio de Janeiro: 2001. 230 p.

Selles IM. Disponibilidade Hídrica e Superficial: Aspecto Qualidade. Seminário Bacia Hidrográfica do rio Guandu - Problemas e Soluções [CD-ROM]. Seropédica (RJ): UFRRJ/SERLA; 2002. 1 CD-ROM: 4 3/4 in.

Setti AA, Lima JEF, Chaves AGM, Pereira IC. Introdução ao Gerenciamento de Recursos Hídricos. Brasília: ANA/ANEEL; 2001, 327p.

Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis: a new disease. Brit Med J. 1977; 2: 9-11.

Smith A, Reacher M, Smerdon W, Adak GK, Nichols G, Chalmers RM. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. *Epidemiol Infect Epub*. 2006 Dec; 134(6):1141-49.

Soares BEC, Ferreira AP. Desenvolvimento sustentável e biodiversidade: Gestão racional e ecológica dos recursos ambientais. *Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 2004; 33:72-75.

Stampi S, De Luca G, Varoli O, Zanetti F. Occurrence, removal and seasonal variation of thermophilic campylobacters and *Arcobacter* in sewage sludge. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. 1999 Jun; 202(1):19-27.

Stelzer W, Jacob J. Study of *Campylobacter* in sewage, sewage sludge and in river water. *Water science and technology*. 1991;24(2):117-20.

Taylor DN. *Campylobacter* infections in developing countries. In Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS (eds), *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*, American Society for Microbiology, Washington, 1992; 20-30.

Tosin I, Machado RA. Ocorrência de *Campylobacter* spp. entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da região Sul do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1995; 29(6):472-77.

Tucci CEM, Hespanhol I, Cordeiro Netto OM. Cenários da Gestão da Água no Brasil: Uma Contribuição para "Visão Mundial da Água". *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*. 2000; 5:31-43.

Vandamme P, De Ley J. Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. Int J Syst Bacteriol. 1991; 41:451-55.

Vandamme P, Goosens H. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter*: a review. Zbl Bakt. 1992; 276:447-72.

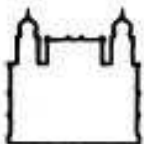
Viana ALT, Souza AL, Gomes PAS, Arruda RCA. *Campylobacter* e diarreia na cidade de Fortaleza. Rev Med HGF. 1986 jul; 3(1):23-25.

Vilardo MCB, Thomé JDS, Esteves WTC, Filgueiras ALL, Oliveira SS. Application of biochemical and polymerase chain reaction assays for identification of *Campylobacter* isolates from non-human primates. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(5):499-501.

Vinten AJA, Douglas JT, Lewis DR, Aitken MN, Fenlon DR. Relative risk of surface water pollution by *E. coli* derived from faeces of grazing animals compared to slurry application. Soil Use and Management. 2004; 20:13-22.

12. Anexos

Anexo 01 - Ficha de acompanhamento das amostras de origem fecal.

Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz		FIOCRUZ
INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS (Amostras de Fezes)		
Data da Coleta: ___/___/___		Identificação de origem: _____
Nome: _____		
Sexo:	Masculino <input type="checkbox"/>	Feminino <input type="checkbox"/>
		Idade: _____
Situação na Família: Pai <input type="checkbox"/> Mãe <input type="checkbox"/> Filho(a) <input type="checkbox"/>		
	Outros <input type="checkbox"/>	Qual? _____
Diarréia: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>		
Presença de: Dor Abdominal <input type="checkbox"/> Muco <input type="checkbox"/> Sangue <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Vômito <input type="checkbox"/> Inapetência <input type="checkbox"/>		
Uso de Antibióticos? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Qual? _____		
Número de Pessoas na Residência: _____		
Relato de Casos de Diarréia na Família: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>		
Com o Próprio? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>		
Caso negativo no item anterior: Quem? _____		
Quando? Nos últimos 6 meses <input type="checkbox"/>		
	Entre 6 meses e 1 ano <input type="checkbox"/>	
	Mais de 1 ano <input type="checkbox"/>	OBS: _____
Recorrência no Período? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>		
Quantas Vezes? _____		
Atribui os Casos de Diarréia a Algum Fator? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>		
Qual? _____		
Realiza Alguma Atividade nas Águas do Rio São João (pesca, lazer, banho, etc)?		
Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Qual? _____		
Possui animal em casa? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Qual? _____		
A Água de Consumo é Originária do Serviço de Abastecimento Público? Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>		
Caso negativo: De onde? _____		
Observações: _____		
