



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

Taíssa de Souza Menezes da Silva

**Qualidade microbiológica do Rio Carioca-RJ: isolamento e identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua susceptibilidade a antimicrobianos**

Rio de Janeiro

2021

Taíssa de Souza Menezes da Silva

**Qualidade microbiológica do Rio Carioca-RJ: isolamento e identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua susceptibilidade a antimicrobianos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliana Napoleão Cozendey da Silva.

Rio de Janeiro

2021

Título do trabalho em inglês: **Microbiological quality of Rio Carioca-RJ**: isolation and identification of thermotolerant coliform bacteria and their susceptibility to antimicrobials.

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

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde  
Biblioteca de Saúde Pública

S586q Silva, Taíssa de Souza Menezes da.  
Qualidade microbiológica do Rio Carioca-RJ: isolamento e identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua susceptibilidade a antimicrobianos / Taíssa de Souza Menezes da Silva. -- 2021.  
75 f. : il. color. ; mapas. ; tab.  
  
Orientadora: Joseli Maria da Rocha Nogueira.  
Coorientadora: Eliana Napoleão Cozendey da Silva.  
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2021.  
  
1. Técnicas Microbiológicas. 2. Coliformes. 3. Águas Superficiais. 4. Suscetibilidade a Doenças. 5. Anti-Infeciosos. 6. Escherichia coli.  
I. Título.

CDD – 23.ed. – 628.3

Taíssa de Souza Menezes da Silva

**Qualidade microbiológica do Rio Carioca-RJ: isolamento e identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua susceptibilidade a antimicrobianos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 10 de maio de 2021.

Banca Examinadora

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Denise Borges dos Santos Dias  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro- Instituto de Biologia

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Shênia Patrícia Corrêa Novo  
Instituto Oswaldo Cruz- IOC

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Eliana Napoleão Cozendey da Silva (Coorientadora)  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira (Orientadora)  
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2021

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me sustentado até aqui, me dando forças para continuar em meio a tantos obstáculos e provações, principalmente nos últimos meses. Maravilhas fez em mim o Senhor. A Maria santíssima que continua passando a frente dos meus caminhos.

A Dra. Joseli Nogueira minha orientadora, por todo incentivo aos estudos, apoio emocional, pelos puxões de orelha quando foram necessários, pela parceria, dedicação a este trabalho (inclusive na ida a campo para a obtenção das amostras). A senhora foi fundamental para a realização desta conquista.

A Dra. Eliana Napoleão C. da Silva minha co-orientadora, por ter participado deste trabalho, corrigindo e contribuindo com seus conhecimentos. Pelo carinho, palavras de conforto e apoio durante todo o mestrado.

Ao Ms. Jaime Antonio Abrantes, doutorando e servidor do LabMicro do Departamento de Ciências Biológicas da ENSP/FIOCRUZ, por ter contribuído como assistente de orientação deste trabalho e me ajudado também na prática das análises microbiológicas.

Ao Laboratório de Análises Físico-Químicas do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental-DSSA/FIOCRUZ, na pessoa dos técnicos Maria Denise Neves Borges e Maicon de Carvalho Machado, que auxiliaram em nossas análises físico-químicas.

A coordenadora de Pesquisa e Manejo do ICMBio Katyucha Von Kossel e aos monitores do Parque Nacional da Tijuca, Flávio Henrique Deveza da Cunha e Carlos Alberto de Sousa Felipe, por permitirem o acesso aos locais restritos do parque e nos auxiliarem na localização da nascente do Rio Carioca.

Ao meu pai Luiz Cláudio, minha mãe Dulcinéa, minhas avós Maria Augusta e Jessí (*in memorian*) que sempre acreditaram em meu potencial e me deram todo suporte emocional e motivacional para que eu não desistisse dos meus objetivos. Amo imensamente cada um de vocês.

Ao meu noivo Jefferson, que sempre está disposto a me ajudar. Obrigada por todo carinho, companheirismo, atenção, cuidado e muita paciência ao longo desses 13 anos.

Aos amigos que fiz na ENSP, Ana Luísa, Priscila, Lílian, Ana Paula e Rafael. Gratidão

a Deus por ter permitido ter conhecido vocês durante esse processo e por termos dividido os problemas e aflições que foram surgindo ao longo desses 2 anos.

Aos coordenadores e professores do PSPMA pelo apoio e ensinamentos durante o curso.

A Vice-Presidência de Educação, Informação e Comunicação da Fiocruz, pela verba disponibilizada para compra de material de consumo utilizado no projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES), pela bolsa concedida, cujo apoio recebeu o código de financiamento 88882.442917/2019-01.

## RESUMO

Os rios estão presentes em todos os momentos da história da humanidade e de seus ambientes, exercendo influência sobre as pessoas e sociedades. O Rio Carioca foi um dos principais cursos d'água utilizado para o abastecimento da cidade do Rio de Janeiro no século XVIII. Com o adensamento populacional suas águas foram se deteriorando pouco a pouco e apesar de sua importância histórica e cultural e de ter sido tombado em janeiro de 2019, pouco se tem feito para a melhoria da qualidade de suas águas. No decorrer de seu atual percurso, esse rio passa por subterrâneo próximo a diferentes hospitais, privados e públicos, além de receber efluentes das residências do seu entorno, o que pode propiciar a seleção de bactérias multirresistentes. Tendo em vista o contínuo lançamento de efluentes domésticos e hospitalares no Rio Carioca- RJ, e que os recursos hídricos podem ser importantes reservatórios genéticos para a aquisição de resistência bacteriana aos antimicrobianos, este trabalho buscou responder, através de estudo do tipo ecológico, qual o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas e identificadas em amostras de suas águas superficiais. Para tanto, os parâmetros físico-químicos cor, turbidez, condutividade elétrica, temperatura e pH foram analisados. Realizou-se a detecção da presença/ausência de bactérias do grupo dos coliformes nas amostras obtidas, sendo realizadas posteriormente o isolamento e identificação de *E.coli*. Os isolados foram submetidos a testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Foi identificada multirresistência a 4 diferentes antimicrobianos que corresponde a 3 diferentes classes. Com os resultados, foi possível constatar a diferença da qualidade das águas do Carioca entre os pontos amostrais, além de constatar a contribuição deste manancial para a dispersão e manutenção de genes de resistência. Assim sendo, este estudo pode contribuir para uma melhor compreensão das localidades potencialmente responsáveis pela manutenção dos genes de resistência, trazendo luz a necessidade de melhorias das estratégias de promoção da saúde, sanitárias e ambientais.

Palavras-chave: Qualidade Microbiológica; Coliformes Termotolerantes; Águas Superficiais; Susceptibilidade; Antimicrobianos.

## ABSTRACT

Rivers are present at all times in the history of mankind and its environments, influencing people and societies. The Rio Carioca was one of the main water courses used to supply the city of Rio de Janeiro in the 18th century. With population densification, its waters gradually deteriorated and despite its historical and cultural importance and having been listed in January 2019, little has been done to improve the quality of its waters. During its current course, this river passes underground near different hospitals, private and public, in addition to receiving effluents from the homes in its surroundings, which can lead to the selection of multi-resistant bacteria. Considering the continuous release of domestic and hospital effluents in the Rio Carioca-RJ, and even though water resources can be important genetic reservoirs for the acquisition of bacterial resistance to antimicrobials, this thesis tries to answer, through an ecological study, what is the profile susceptibility to antibiotics of *Escherichia coli* isolated and identified in samples of its surface waters. For that, the physical-chemical parameters color, turbidity, electrical conductivity, temperature and pH were analysed. The presence / absence of bacteria from the coliform group was detected in the samples obtained, and the isolation and identification of *E.coli* was performed later. The isolates were subjected to antimicrobial susceptibility tests. Multidrug resistance to 4 different antibiotic was identified, corresponding to 3 different classes. With the results, it was possible to verify the difference in the quality of the waters of Carioca between the points where we collect the water, in addition to verifying the contribution of this source to the dispersion and maintenance of resistance genes. Therefore, this study can contribute to improve the understanding of which locations are potentially responsible for the maintenance of resistance genes, clarifying the need for improvements in health promotion, health and environmental strategies.

Keywords: Environmental Hazards; Surface Waters; Natural Springs; Drug Resistance, Microbial

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Iconografia da praia do Carioca, representação do ano de 1565. Atual bairro do Flamengo .....	17
Figura 2- Lagoa do Boqueirão e o Aqueduto Carioca. ....	18
Figura 3- Principais mecanismos de ação dos fármacos .....	26
Figura 4- Principais mecanismos de resistência bacteriana.....	27
Figura 5– Bairros e o Rio Carioca .....	31
Figura 6– Mapa dos pontos de amostragem na Sub Bacia do Rio Carioca-RJ. ....	33
Figura 7- Parâmetros físico-químicos avaliados. ....	34
Figura 8- Espectrofotômetro bioChrom. ....	35
Figura 9- Turbidímetro de bancada. ....	35
Figura 10- Medidor de bancada multiparâmetros.....	36
Figura 11- Representação do frasco utilizado para a coleta e reagente do Kit.....	37
Figura 12- Fotos representativas dos locais de amostragem pertencentes a Floresta da Tijuca. ....	40
Figura 13- Fotos representativas dos locais de amostragem na cidade. ....	40
Figura 14- Resultado da presença/ausência de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes. ....	44
Figura 15- Resultado positivo para a presença de <i>E.coli</i> no ponto anterior a UTR-Flamengo. ....	45
Figura 16- Teste da produção de Indol confirmatório para <i>E.coli</i> em algumas amostras.45	
Figura 17- Amostra semeada após 24 horas de incubação. ....	45
Figura 18- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos realizados em <i>E.coli</i> isoladas de algumas amostras.....	47
Figura 19. Percurso atual do Rio Carioca-RJ. Destaque para os hospitais próximos ao rio e a Unidade de Tratamento de Rio instalada próxima a foz.....	50

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Interpretação de presença/ausência das bactérias do grupo dos coliformes...	37
Tabela 2- Tabela de antimicrobianos selecionados para a realização dos testes de susceptibilidade, com as suas respectivas categorias. ....	38
Tabela 3- Resultados dos parâmetros físico-químicos analisados.....	41
Tabela 4- Resultado do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, comparativo entre CLSI e BrCAST. Fonte: Própria. ....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina-clavulanato
AMES	Aminoglicosídeos
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ASB	Ampicilina-Sulbactam
ATM	Aztreonam
AWWA	<i>American Water Works Association</i>
BrCAST	Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
CAZ	Ceftazidima
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CFO	Cefoxitina
CFZ	Cefazolina
CIP	Ciprofloxacino
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COMLURB	Companhia Municipal de Limpeza Urbana
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPM	Cefepime
CPTEC	Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos
CTX	Cefotaxima
DEA	Disfunção Entérica Ambiental
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

DSSA	Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMB	Eosina Azul de Metileno
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
ETA	Estação de tratamento de água
ETE	Estação de tratamento de Esgoto
ETP	Ertapenem
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
FTR	Fator de Transferência de Resistência
GEN	Gentamicina
I	Intermediário
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade
INEPAC	Instituto Estadual do Patrimônio Cultural
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
IPM	Imipenem
ITAL	Instituto Tecnológico de Alimentos
LABMICRO	Laboratório de Microbiologia
LVX	Levofloxacino
MER	Meropenem
mS/cm	Milisiemens por centímetro
MUG	Caldo Lauryl Sulfato MUG
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão

PPT	Piperacilin-Tazobactam
R	Resistente
S	Sensível
SDD	Susceptibilidade Dose-Dependente
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SUT	Sulfametaxazol-Trimetropim
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
uC	Unidade de cor
UNT	Unidade Nefelométrica de Turbidez
UTR	Unidade de Tratamento de Rio
WEF	<i>Water Environment Federation</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1	HISTÓRICO DO RIO CARIOCA- RJ.....	17
2.2	SANEAMENTO, SAÚDE E AMBIENTE. ....	19
2.3	BIOINDICADORES DA QUALIDADE DAS ÁGUAS .....	22
2.3.1	<b>Enterobacterales</b> .....	22
2.3.2	<b>Coliformes totais e termotolerantes</b> .....	23
2.3.3	<i>Escherichia coli</i> .....	23
2.4	RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS .....	24
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	30
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1	TIPO DE ESTUDO .....	31
4.3	QUESTÕES ÉTICAS.....	32
4.4	AMOSTRAGEM.....	32
4.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA .....	33
4.5.1	<b>Parâmetro Cor</b> .....	34
4.5.2	<b>Parâmetro Turbidez</b> .....	35
4.5.3	<b>Parâmetro Condutividade</b> .....	35
4.6	IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO .....	36
4.7	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) .....	38
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
5.1	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS .....	41
5.2	IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO .....	44
5.3	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	46
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
	ANEXO A- Parecer de dispensa.....	71
	ANEXO B - Validação de método de análise microbiológica.....	72

## 1. INTRODUÇÃO

No ano de 1504, o navegante Português Gonçalo Coelho aportou na foz de um largo rio, quando, num de seus braços próximo ao morro da Viúva os portugueses ergueram uma casa de comércio pertencente à Coroa, apelidada pelos índios Tamoios de “Cari-Óca” (“Casa de Branco”). Este rio foi fundamental para o estabelecimento da cidade do Rio de Janeiro, devido à facilidade de se obter água limpa em abundância, sendo também chamada de Aguada dos Marinheiros, pois era um dos locais em que os marinheiros proviam-se de água (DELGADO, 1990).

Segundo Ogeda e colaboradores (2016), os índios que habitavam próximo a foz do Rio Carioca, tinham uma relação mística com as águas deste manancial, acreditando que essas águas eram sagradas. Pois, aqueles que a bebessem teriam boa voz para cantar, as mulheres ficariam mais formosas e os homens recuperariam seu vigor perdido.

Após a chegada dos portugueses, o Rio Carioca acabou passando por diversas transformações. De local sagrado e místico para os índios e principal fonte para o abastecimento da cidade, o rio foi se transformando ao longo do seu curso e sofrendo várias interferências, devido às modificações na urbanização do seu entorno associadas ao aumento da população (SCHLEE et al., 2007).

O avanço populacional e a ocupação dos espaços territoriais sem um adequado planejamento urbano a médio e longo prazo têm, como principal impacto antropogênico, o lançamento de efluentes, propiciando além da degradação da qualidade da água, a disseminação de microrganismos patogênicos (vírus, bactérias e protozoários), causadores de várias doenças (OLIVEIRA, 2017). Não obstante, essa mudança tem gerado também um impacto perceptível na qualidade do Rio Carioca.

Esse problema, não é um caso isolado, e já existem padrões internacionais que utilizam a detecção de alguns microrganismos como indicadores da qualidade das águas, os chamados “coliformes”. A maior parte das espécies bacterianas pertencentes ao grupo dos coliformes totais, são dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, sendo *Escherichia coli* a principal espécie representante deste grupo (CROXEN et al., 2013).

Apesar de ser imprescindível à vida, a água também pode se caracterizar como um ambiente propício para a manutenção e propagação de microrganismos patogênicos. O que coloca um corpo d’água como o Rio Carioca, como uma potencial fonte de transmissão de doenças de veiculação hídrica. Já que no decorrer do seu curso, inúmeros efluentes são despejados em seu leito, muitas vezes sem tratamento prévio.

Nas águas de um rio, bactérias podem se reproduzir e também entrar em contato com

várias substâncias que podem afetar seu desenvolvimento, com isso podem vir a selecionar bactérias que possuam genes de resistência a fármacos e metais, por exemplo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A utilização destes fármacos, de modo geral, tem ganhado destaque mundial devido a sua utilização crescente e de forma indiscriminada (NOVAES et al., 2018).

A falta de saneamento básico adequado e o lançamento de efluentes oriundos da aquicultura, indústrias e hospitais, entre outros, têm contribuído para o aumento de bactérias resistentes em corpos d'água. Essa resistência pode ocorrer não só por meio da seleção natural por genes cromossômicos, mas também pode ser devida a diversos mecanismos, dentre eles a aquisição de plasmídeos (OLIVEIRA, 2017).

A resistência bacteriana pode ser aos metais pesados ou diretamente aos antimicrobianos presentes no meio ambiente. Peixoto e colaboradores (2012) ressaltam que no ambiente aquático a permuta de genes de resistência é estimulada devido à movimentação e interação dos microrganismos e elementos genéticos móveis como, por exemplo, os plasmídeos. Segundo os autores, os plasmídeos podem possuir vários genes que codificam para resistência a metais pesados, sugerindo ainda uma associação direta da resistência aos antimicrobianos e aos metais pesados. Tal evento pode ser explicado, segundo Yates e colaboradores (2004), pela vantagem ambiental da co-seleção destas informações em um único plasmídeo, especialmente em ambiente aquático poluído.

Júnior e colaboradores (2014) constataram que ambientes com forte pressão seletiva induzem a seleção de genes de resistência. A resistência aos fármacos tornou-se um sério problema de saúde pública, sendo de extrema importância o isolamento dos microrganismos, sua identificação e realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos no laboratório (OPAS, 2017).

Apesar das associações entre a qualidade da água e saúde já estarem comprovadas, ainda existe uma lacuna no Brasil no que tange a estudos que auxiliem na avaliação de múltiplos fatores associado à qualidade da água e suas particularidades ambientais, socioeconômicas e culturais (FUNASA, 2013).

Entre as várias possibilidades de estudo da qualidade da água e de sua contaminação, pode-se destacar o problema gerado por efluentes hospitalares, pois suas características complexas podem acarretar em menor biodegradabilidade dos compostos, presença de microrganismos patogênicos, desinfetantes, antibióticos, agentes de limpeza, entre outros. Essas propriedades atribuem caráter nocivo a esses efluentes, causando complicações no tratamento biológico de uma Estação de Tratamento de Água (ETA) e apresentando riscos aos ecossistemas aquáticos nos quais são lançados (BERTO et al., 2009; SOUZA, 2012). Além

disso, em alguns casos, esses resíduos são despejados diretamente nos rios sem ter nenhum tipo de tratamento prévio ou em sistemas públicos de esgotamento, que não tem a capacidade para tratar esse tipo de efluente (BERTO et al., 2009).

Mundialmente, é sabido que a qualidade das águas tem um impacto significativo na saúde da população. Deste modo, sua qualidade passou a ser avaliada através da utilização de microrganismos indicadores, os “coliformes”. Os coliformes totais compreende um grande grupo de bactérias Gram-negativas em forma de bastonete, aeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, que fermentam lactose com produção de gás a aproximadamente 35°C em 24-48 horas e compreendem gêneros e espécies entéricas e não entéricas. Do qual *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* constituem os principais representantes (HEALTH CANADÁ, 2012; CROXEN et al., 2013; WHO, 2018).

Já os coliformes termotolerantes ou também denominados como coliformes fecais, constituem um subgrupo dos coliformes totais e diferenciam-se pela capacidade de crescer e fermentar a lactose com produção de gás em elevadas temperaturas (44 ±0.5°C). Este grupo possui *E.coli* como seu representante principal, além de outros entéricos como *Klebsiella* que também possui a capacidade de fermentar a lactose em elevadas temperaturas (BARTRAM, BALLANCE, 1996; FENG et al., 2020). Maiores detalhes a respeito destes grupos serão abordados posteriormente.

Por fazer parte do grupo dos coliformes, algumas características de *E. coli* são compartilhadas com outras espécies deste grupo, todavia em alguns aspectos ela se destaca (HEALTH CANADÁ, 2012). A bactéria *E.coli* é um bastonete Gram-negativo, oxidase-negativo, que cresce em meio rico a 44-45°C, fermenta lactose e manitol com a produção de ácido e gás, além de produzir indol a partir do aminoácido triptofano (KONEMAN, 2018). Por fazer parte do trato gastrointestinal de homens e animais, *E. coli* tornou-se um indicador de contaminação fecal, sendo o mais específico dentre os coliformes termotolerantes (CONAMA, 2000; ADEOLU et al., 2016).

Embora o Rio Carioca tenha sido um importante afluente para a cidade do Rio de Janeiro, conforme descrito anteriormente, esse vem sofrendo uma série de impactos antropogênicos. No decorrer de seu atual percurso, passa pelo subterrâneo próximo a diferentes hospitais, privados e públicos, além de receber efluentes das residências do seu entorno, o que pode ter propiciado, por exemplo, na detecção de bactérias multirresistentes no Rio em questão (DE ARAÚJO et al., 2016).

Tendo em vista esse contínuo lançamento de efluentes domésticos e hospitalares no Rio Carioca, e que os recursos hídricos podem ser indiretamente, importantes reservatórios

genético para a seleção de resistência bacteriana aos antimicrobianos, justifica-se o estudo deste corpo aquático, para o isolamento e a identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e verificação da sua susceptibilidade aos principais antimicrobianos, a fim de subsidiar mecanismos que assegurem a qualidade dos mananciais e a redução de impactos à saúde pública e ambiental.

Nessa perspectiva, levando em consideração a presença de coliformes em ambientes impactados e considerando a presença do despejo de efluentes de origem hospitalar e doméstica no Rio Carioca, este estudo busca responder: qual o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas e identificadas em amostras de águas superficiais do Rio Carioca-RJ, levando em consideração as especificidades de cada ponto amostral, uma vez que o Carioca nasce em uma área preservada, na tentativa de relacionar esse fenômeno à presença de hospitais ou outros pontos de contaminação ao longo do curso deste Rio, fator de extrema importância para a saúde pública e o meio ambiente.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 HISTÓRICO DO RIO CARIOCA-RJ

Os rios estão presentes em todos os momentos da história humana e de seus ambientes, seja física ou espiritualmente, e exercem influência sobre as pessoas e sociedades. Contudo os rios são ambientes naturais extremamente sujeitos a alterações de diferentes níveis (MAUCH; ZELLER, 2008).

Com a fundação da cidade do Rio de Janeiro, uma série de intervenções foram pouco a pouco modificando a configuração da bacia do Rio Carioca (SCHLEE; CAVALCANTI; TAMMINGA, 2007).

De acordo com Ogeda et al. (2016), o Rio Carioca foi um dos principais cursos d'água utilizado para o abastecimento da cidade do Rio de Janeiro no século XVIII. Entretanto, este rio não era de fácil acesso, pois para se obter água, se fazia necessário percorrer até a sua nascente ou solicitar a um escravo aguadeiro, que se encarregava de coletar a água e levar até o centro da cidade.

Embora o Rio Carioca tenha sido muito importante para o desenvolvimento da cidade do Rio de Janeiro, ainda durante o período colonial, ele foi sofrendo grandes alterações, tanto em seu percurso quanto na qualidade de suas águas. No ano de 1503, por ordem de Gonçalo Coelho, foi construída uma casa na foz do Rio Carioca. Os Tamoios, nativos daquela região (Figura 1) a chamavam de "casa de cascudo", dando origem ao nome *akarioka* (CEZAR, 2016; OGEDA et al., 2016).

Figura 1- Iconografia da praia do Carioca, representação do ano de 1565. Atual bairro do Flamengo



Fonte: César, 2016.

Em 1703, após desvio do rio, inaugurou-se o primeiro chafariz no centro da cidade, passando a ser chamado de Largo da Carioca. Durante muito tempo o Rio Carioca continuava a ser o fornecedor primordial de água, porém várias modificações foram sendo incorporadas ao seu cenário. Durante os séculos XVII ao XVIII, a região era composta por diversas chácaras. Os escravos pertencentes a elas utilizavam as águas do Rio Carioca para o descarte de resíduos de dejetos humanos, incluindo animais. Essa prática tem lugar no processo histórico de degradação que foi transformando o Rio Carioca, pouco a pouco, em um riacho extremamente poluído (SCHLEE; CAVALCANTI; TAMMINGA 2007; OGEDA et al., 2016).

Obras de saneamento começaram a ser realizadas no ano de 1719, sendo construído um importante aqueduto que conduzia as águas do Carioca até determinados chafarizes espalhados pela cidade. O Aqueduto da Carioca (Figura 2), inaugurado em 1723, atualmente conhecido como Arcos da Lapa (FRANCA, 2007; OGEDA et al., 2016), finalizava na Lagoa do Boqueirão à sua frente, que depois de sucessivos aterros deu lugar ao Jardim do Passeio Público (1779-1783) (DIAS; ROSSO; GIORDANO, 2012).

Figura 2- Lagoa do Boqueirão e o Aqueduto Carioca.



Fonte: DIAS; ROSSO; GIORDANO, 2012.

Com o início do século XX, novos moradores foram chegando a Laranjeiras e estes pleitearam junto a Câmara dos vereadores a canalização do Rio Carioca, objetivando incentivar o desenvolvimento imobiliário da região (REBOISSON, 2016).

Em Santa Tereza, Gomes Freire construiu o reservatório do Carioca, adjacente ao que ele denominou de “Mãe D’água”, fonte coletiva para coleta de água (FRANCA, 2007). Em janeiro de 2019, o trecho denominado de “Mãe D’água” e o reservatório do Rio Carioca

foram tombados pelo Estado do Rio de Janeiro (INEPAC, 2019).

Atualmente, grande parte de seu percurso corre por subterrâneo através de diversos bairros (Figura. 2) (OGEDA et al., 2016), passando por alguns hospitais e residências, que contribuem para a redução da qualidade de suas águas.

Com sua nascente na Floresta da Tijuca, o Rio Carioca percorre a Rua Cosme Velho, adentra a Rua das Laranjeiras, passa pela Rua Ipiranga, Rua Conde de Baependi, posteriormente passa brevemente pela Praça José de Alencar, Rua Barão do Flamengo, em seguida avança pela Unidade de Tratamento de Rio- Flamengo (UTR-Flamengo) e, por fim, deságua na praia do Flamengo (REBOISSON, 2016).

Segundo Dias e colaboradores (2012), na tentativa de melhoria das condições de balneabilidade da praia do Flamengo foi estabelecida em 1992 pela prefeitura, uma galeria de cintura (parte subterrânea e outra aberta) modificando o curso final do rio, com o objetivo de minimizar o aporte de águas poluídas na praia. Elas então passaram a ser concentradas e direcionadas para a Estação de Despoluição do Rio Carioca (também denominada como Unidade de Tratamento de Rio), cujo tratamento das águas, somente no desemboque, não acarreta melhorias para o curso d'água e não agrega melhoramentos diretos para a qualidade da água do rio. Além disso, os mesmos autores afirmam que a estação somente funciona nos períodos de seca com vazão máxima de projeto de 300 L/s. e que em caso de chuvas o processo é interrompido liberando a passagem do fluxo direto para a praia (DIAS; ROSSO; GIORDANO, 2012).

Portanto, o Rio Carioca, a despeito de ter sido um importante afluente para os índios Tamoios e também fundamental para o desenvolvimento da cidade do Rio de Janeiro (SCHLEE; CAVALCANTI; TAMMINGA, 2007), acabou, gradativamente, devido ao adensamento populacional, tendo suas águas deterioradas. Apesar de sua importância histórica e cultural e de ter sido tombado em janeiro de 2019, pouco se tem feito para a melhoria da qualidade de suas águas (REBOISSON, 2016), que podem inclusive estar funcionando como um reservatório de microrganismos resistentes a serem despejados muitas vezes diretamente na praia.

## 2.2 SANEAMENTO, SAÚDE E AMBIENTE.

A água é um recurso fundamental para a manutenção de variadas formas de vida, sendo fundamental também em distintos processos industriais. No entanto, a ausência do saneamento ambiental adequado, está atrelada à poluição e a contaminação das águas, sendo um dos principais problemas enfrentados pela população (PAIVA; SOUZA, 2018).

A carência e a baixa efetividade dos serviços de esgotamento sanitário geram impactos negativos. Sendo necessário reconhecer o ambiente como um fator determinante de agravos à saúde, no qual modificações podem vir a reduzir a qualidade de vida da população. Entretanto, a crescente demanda por espaços territoriais, vem causando uma forte pressão no meio ambiente, impactando tanto o ecossistema quanto a saúde da população (TEIXEIRA et al., 2011; OLIVEIRA, 2017).

De acordo com Heller (1998), ao versar sobre saúde e saneamento, é essencial incorporá-los no contexto da relação entre saúde e ambiente. De modo particular, o conjunto de problemas associados ao saneamento está estritamente associado ao modelo socioeconômico aplicado, sendo que a população mais vulnerável é aquela que está à margem dos benefícios do desenvolvimento, ou seja, a insalubridade do meio acomete com maior intensidade nas populações com menor *status* socioeconômico (HELLER, 1998).

O saneamento constitui o controle de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem ou podem exercer efeitos deletérios sobre seu estado de bem-estar físico, social e mental. Deste modo, o saneamento seguro é primordial para a saúde, pois proporciona a redução de infecções, melhorando e mantendo a saúde mental e bem-estar social (WHO, 2018).

A falta de sistemas de saneamento adequados gera diferentes distúrbios à população, incluindo infecções e doenças como diarreia, doenças tropicais negligenciadas, doenças transmitidas por vetores, disfunção entérica ambiental (DEA), entre outras. De modo particular, a DEA vem sendo amplamente debatida e é caracterizada como um distúrbio subclínico do intestino delgado, que gera inflamações crônicas e alterações derivadas no intestino, sendo apresentada como uma importante causa de nanismo infantil. Embora as causas da DEA sejam difíceis de pormenorizar, conjectura-se que seja causada através da exposição a bactérias de origem fecal, devido a sistemas de saneamento inseguros (WHO, 2018).

No Brasil, a lei nº 11.445/2007 estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico, que é fundamental para a promoção da saúde. No artigo 3º dessa lei, o saneamento básico é definido como um conjunto de serviços, infraestrutura e instalações operacionais, que inclui abastecimento de água potável, esgotamento sanitário, manejo de resíduos sólidos e manejo de águas pluviais, devendo esses serem fornecidos de forma universal (BRASIL, 2007). No entanto, as condições de saneamento ambiental no Brasil ainda são insatisfatórias.

Conforme dados apontados pela Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB), em 2008, somente 55% dos municípios brasileiros possuíam rede coletora de esgoto, sendo

que desses, somente 68,8% sofria algum processo de tratamento antes de ser lançado em corpos hídricos (PAIVA; SOUZA, 2018). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, apenas 38, 2% dos municípios brasileiros informaram possuir uma política nacional de saneamento básico em 2017, não atingindo metade dos municípios do país. Ressalta-se ainda uma tendência da aplicação de uma política de saneamento básico em municípios mais populosos (IBGE, 2018).

Em diversas localidades, a qualidade da água diminui devido impactos antropogênicos como, lançamento de efluentes de fontes difusas, desmatamento, uso de pesticidas agrícolas, entre outros (OLIVEIRA et al., 2013). Embora os corpos d'água possuam uma capacidade de autopurificação, o fluxo de contaminantes lançados nos corpos hídricos é tão grande que excede a capacidade do sistema de se recuperar (NUÑEZ et al., 2016).

Deste modo, os ambientes aquáticos têm se constituído como importantes condutores e reservatórios indutores da aquisição de diferentes resistências microbianas (YOUSFI et al., 2019), devido a sua diversa composição química como, por exemplo, desinfetantes, resíduos farmacêuticos não metabolizados e radionuclídeos (isótopos instáveis) (EMMANUEL et al., 2005; WASEEM et al., 2017).

Efluentes hospitalares possuem um elevado nível de bactérias resistentes a antibióticos, comprovando que em países como Argélia, Índia, China, Romênia e Croácia, houve a contribuição desses efluentes na disseminação de microrganismos com esse perfil no ambiente (ZHANG et al., 2012).

O efluente hospitalar constitui uma ampla gama de produtos, incluindo além da presença de bactérias de origem hospitalar, portadoras ou não de genes de resistência, nutrientes, produtos químicos variados, metais pesados, drogas metabolizadas ou não. Propiciando para que este se torne um ambiente seletivo e facilitador para a transferência de genes de resistência e propagação destes (EMMANUEL et al., 2005; NOVAES et al., 2018).

Antibióticos com concentrações inibitórias e microrganismos resistentes que estejam presentes no efluente hospitalar podem ser liberados em um corpo receptor, mesmo após processos de tratamento do efluente (RIZZO; FIORENTINO; ANSELMO, 2013). Em seu estudo, Santoro et al. (2015), relataram a presença de *Pseudomonas* em diferentes etapas do processo de tratamento de um efluente hospitalar, no qual também sinalizaram a importância deste microrganismo para o efetivo tratamento do efluente. Entretanto, evidenciaram a persistência de hormônios e bactérias multirresistentes mesmo após o tratamento do efluente (SANTORO et al., 2015).

Não menos importante, o efluente doméstico ou águas residuais também constituem

importantes reservatórios de genes de resistência que são disseminados ao serem lançados em um corpo receptor. As águas residuais podem ser consideradas as principais rotas de dispersão de resíduos farmacêuticos juntamente com o efluente hospitalar (LE CORRE et al., 2012). Assim, autores recomendam um tratamento prévio desses efluentes antes mesmo de serem conduzidos para uma unidade de tratamento de efluente final (RIZZO; FIORENTINO; ANSELMO, 2013).

A OMS vem relatando o crescente aumento no consumo de medicamentos em todo o mundo (WHO, 2017), conduta com influência direta na disseminação de resíduos fármacos no ambiente aquático. Sabe-se que no Brasil, nem todos possuem acesso a um sistema de saneamento adequado (IBGE, 2018), deste modo grande parte do esgoto gerado é conduzido de forma *in natura* para o ambiente. Estudos tem apontado para a detecção de resíduos fármacos em variados corpos aquáticos receptores de águas residuais. Entretanto, o número de compostos ativos fabricados para tratamentos terapêuticos é amplamente superior do que os que são detectados no ambiente, além do fato de que muitos dos fármacos que são frequentemente utilizados são pouco investigados nos corpos aquáticos (LE CORRE et al., 2012; RUNNALLS et al., 2010).

## 2.3 BIOINDICADORES DA QUALIDADE DAS ÁGUAS

### 2.3.1 Enterobacterales

A ordem Enterobacterales é formada por um grupo grande e diverso de Bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos e em forma de bastonetes, da classe *Gammaproteobacteria* (ADEOLU et al., 2016), Os membros desse grupo habitam variados nichos ecológicos, sendo encontrados no solo, na água e em associação com organismos vivos (BRENNER; FARMER, 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Muitos membros desta ordem têm sido implicados como patógenos em humanos e animais, como as espécies *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* (ADEOLU et al., 2016).

Grande parte dos gêneros desta ordem corresponde a mais de 250 espécies, estando estas incluídas na família *Enterobacteriaceae*, (grupo monofilético, catalase-positivos e oxidase-negativos) sendo uma das famílias bacterianas mais diversas taxonomicamente e frequentemente denominadas como entéricas (ADEOLU et al., 2016).

Segundo Tortora e colaboradores (2012) os membros desta família possuem estruturas denominadas de fímbrias, que os auxiliam na aderência a superfícies ou membranas mucosas.

Estruturas semelhantes os *pili*, são especializadas na troca de informações genéticas entre as células, que constantemente abarca a resistência a antibióticos ou a habilidade de degradar seu meio com maior eficiência (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

### 2.3.2 Coliformes totais e termotolerantes

Os coliformes totais incluem gêneros e espécies entéricas e não entéricas, ou seja, que não fazem parte do trato gastrointestinal do homem e animais de sangue quente como, por exemplo, a *Serratia* e a *Aeromonas*. Este grupo é caracterizado por serem bastonetes Gram-negativos, aeróbios facultativos, não formadores de esporos, de oxidase-negativos, que fermentam lactose com produção de gás a ~35°C em 24 a 48 horas (CROXEN et al., 2013).

A detecção da presença dos coliformes totais é considerada pouco útil para se reconhecer o ambiente como contaminado (origem fecal). Mas, pode ser importante para se atestar a qualidade sanitária de um ambiente ou até mesmo alimento. Quando constatada sua presença nos corpos aquáticos, pode ser indicativo da possível presença de patógenos entéricos, sendo *Escherichia coli* e enterococos considerados os melhores indicadores de contaminação fecal (HEALTH CANADA, 2012).

Por sua vez, os coliformes termotolerantes, também conhecidos como coliformes fecais, são bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais, estando presentes no excremento humano e animal, além de solo, plantas ou efluentes que contenham matéria orgânica. Este grupo é caracterizado pela presença da enzima  $\beta$ -galactosidase e pela sua capacidade em fermentar a lactose, com produção de gás em 24 horas a 44-45°C em meio composto por sais biliares ou outros agentes tenso-ativos com propriedades inibidoras semelhantes (CONAMA, 2000).

Alguns organismos deste grupo, não necessariamente possuem origem fecal, mas sua presença pode estar associada à presença de bactérias de origem fecal (BARTRAM; PEDLEY 1996). Representa este grupo, *Escherichia coli*, algumas bactérias do gênero *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*.

### 2.3.3 *Escherichia coli*

Pertencente da família *Enterobacteriaceae*, *E. coli* é um bastonete Gram-negativo, oxidase-negativo, como outros membros de sua família, mas cresce em meio rico a 44-45°C, fermenta lactose e manitol com a produção de ácido e gás, além de produzir indol a partir do aminoácido triptofano (CONAMA, 2000; CROXEN et al., 2013).

Devido ao fato de *E. coli* ser encontrada abundantemente no trato intestinal e nas fezes

de humanos e animais, tornou-se um indicador ideal de contaminação fecal das águas. Embora grande parte dos tipos de *Escherichia coli* seja inofensiva, alguns sorotipos (ou cepas) possuem características que as tornam patogênicas. Ainda, vale destacar que como indicador de contaminação fecal, dentro do grupo dos coliformes termotolerantes, a espécie *E. coli* é a mais específica para a contaminação fecal recente (HEALTH CANADA, 2012; WHO 2018).

Apesar de ser um organismo comensal do trato gastrointestinal em animais de sangue quente, ganhos e perdas de genes em algumas cepas permitiram que *E.coli* se tornasse um patógeno diversificado e adaptado. Deste modo, dependendo do sorotipo, *E. coli* pode ocasionar uma vasta gama de doenças, podendo acometer o trato gastrointestinal, trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central (CROXEN et al., 2013).

Alguns pressupostos são importantes para se reconhecer um organismo como um indicador fecal, a saber (HEALTH CANADA, 2012):

- Fazer parte do trato gastrointestinal dos animais de sangue quente;
- Estar presente em águas contaminadas quando patógenos estão presentes;
- Incapaz de crescer em meio aquático, mas capaz de sobreviver por mais tempo quando comparados aos patógenos;
- Aplicável em todos os tipos de águas naturais;
- A densidade da bactéria deve estar correlacionada com o grau de contaminação das águas;
- A densidade da bactéria deve estar correlacionada a doenças associada aos nadadores;
- Os testes de detecção e enumeração devem ser rápidos.

Entretanto, nem todas as bactérias atendem tais requisitos. Por tanto, *E.coli* juntamente com *Enterococcus* foram considerados os melhores indicadores de contaminação fecal recente. Estando *E.coli* melhor classificada como um bioindicador ideal de contaminação fecal em águas doces, por melhor se enquadrar nos requisitos citados a cima e *Enterococcus* como um bioindicador em águas salinas. (HEALTH CANADÁ, 2012).

A Fundação Nacional da Saúde (Funasa) e o Ministério da Saúde (MS-Brasil), também estabelecem que seja verificada, na água para consumo humano para garantir sua potabilidade, a ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* (FUNASA, 2013).

#### 2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

De acordo com Martinez (2014), a resistência frente a um fármaco é definida do ponto de vista operacional, classificando a bactéria como sensível/ susceptível, intermediária ou

resistente, a depender da possibilidade de se tratar as infecções ocasionadas pelo agente microbiano. Ainda de acordo com o autor, a resistência é uma característica adaptativa, que é conferida após exposição aos antimicrobianos. Mas, de acordo com a ANVISA (2007), algumas bactérias possuem resistência intrínseca, possuem genes que podem desenvolver um fenótipo de resistência.

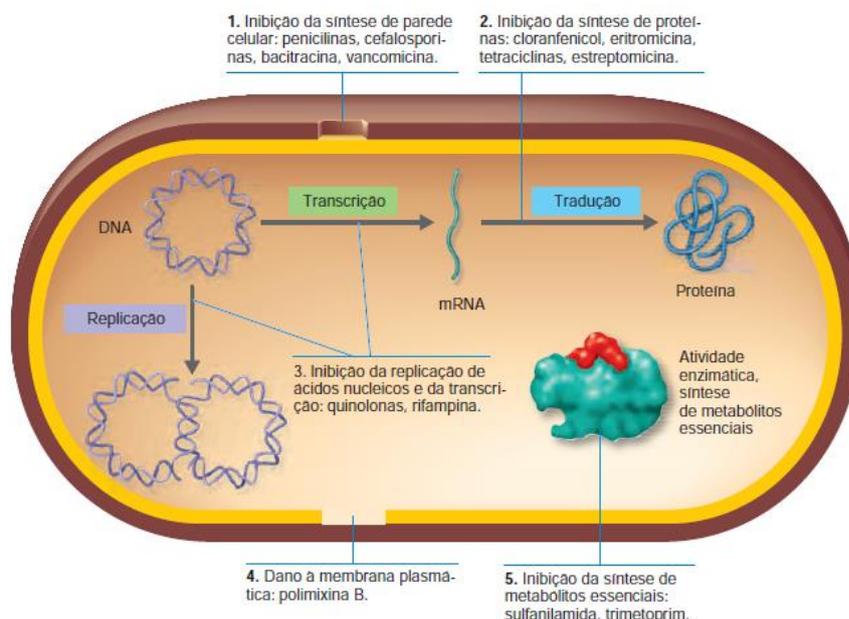
A introdução da penicilina no combate a infecções foi um marco importante na história da medicina, gerando a falsa ideia de que pacientes não perderiam mais suas vidas por conta de doenças infecciosas. Entretanto, a resistência à penicilina foi documentada em 1940, gerando uma nova preocupação para o tratamento eficaz das infecções (PAITAN, 2020).

De acordo com a Organização Pan Americana de Saúde-OPAS (2017), observa-se um crescente número de infecções difíceis de serem tratadas, devido à baixa eficácia dos antimicrobianos. Este fato se torna de relevante preocupação no âmbito da saúde, pois gera um maior período de tratamento do paciente, maior tempo de internação, aumento dos custos referentes ao tratamento e maior incidência de mortalidade (OPAS, 2017).

Atualmente, um dos principais problemas associados aos fármacos está relacionado com a utilização incorreta destes e sua utilização de forma massiva, propiciando a manifestação e a dispersão de novas linhagens de microrganismos resistentes aos antimicrobianos. Mudanças genéticas nas bactérias, por exemplo, possibilita que um fármaco anteriormente inibidor sobre um determinado organismo, passe a não surtir mais efeito, o que torna esta questão de emergente preocupação mundial (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As mudanças genéticas ocorridas nos microrganismos são amplas, podendo abranger desde deficiência de porinas até a produção de enzimas que inativam a ação de drogas antimicrobianas (ABRANTES; NOGUEIRA, 2017). A Figura 3 resume o espectro de atividades de alguns fármacos, indicando os seus principais mecanismos de ação.

Figura 3- Principais mecanismos de ação dos fármacos



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

Em resumo, os principais mecanismos de ação dos fármacos incluem a inibição da parede celular, inibição da síntese proteica, danos à membrana plasmática, inibição da síntese dos ácidos nucleicos e inibição da síntese de metabólitos essenciais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Para que seja eficaz e atue como um antimicrobiano, alguns pressupostos devem ser atendidos (ANVISA, 2019):

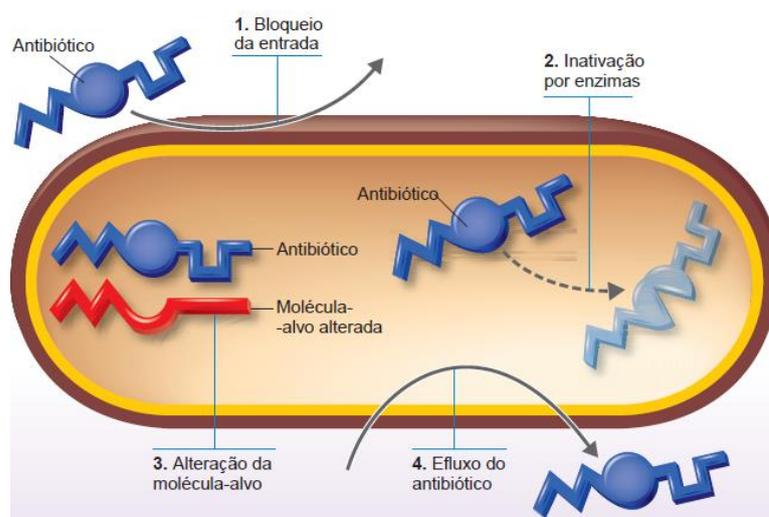
- Ser capaz de atingir alvos moleculares, devendo necessariamente ultrapassar a barreira da membrana celular da bactéria;
- Suscitar a morte da célula através da interação do fármaco com a molécula alvo;
- Preservar-se da ação das bombas de efluxo que lançam os antimicrobianos para fora da célula da bactéria;
- Por fim, reprimir a inativação mediada por enzimas que tem a capacidade de modificar o fármaco tanto no interior quanto no exterior da célula bacteriana.

Em contrapartida, as bactérias desenvolvem mais de uma estratégia de ação para se defender dos antimicrobianos, modificando por vezes seu material genético (ANVISA, 2019). Além disso, as bactérias também contam com rápida reprodução por divisão binária (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009) o que propicia a seleção natural das cepas resistentes.

Os mecanismos que conferem resistência bacteriana aos antibióticos são distintos e amplamente estudados, podendo se disseminar através de um ou mais mecanismos no que tange a transferência de genes que conferem resistência (DAVIES; DAVIES, 2010). Dentre os

mecanismos, podemos destacar a mutação, transferência horizontal de genes, modificação da célula antibiótica, alterações químicas do antibiótico, destruição da molécula do antibiótico, modificação na permeabilidade, bomba de efluxo, modificação dos sítios de destino e adaptações celulares (MUNITA; ARIAS, 2016). Entretanto, alguns mecanismos são considerados principais, para conferir resistência bacteriana (Figura 4).

Figura 4- Principais mecanismos de resistência bacteriana



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

Martinez (2014) associa a resistência aos antimicrobianos a dois processos, a mutação e a transferência horizontal de genes. A mutação pode ocorrer em três diferentes tipos de genes, genes que codificam o alvo do antibiótico; genes que codificam os transportadores dos antibióticos e genes que codificam os reguladores responsáveis em reprimir a expressão dos transportadores ou elementos de descontaminação dos antibióticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

A mutação é um processo natural que ocorre ao acaso, devido a vários fatores. Quando selecionadas pelo meio ambiente, elas podem favorecer a sobrevivência e adaptação das espécies ao meio em que estão inseridos. Os genes mutados considerados benéficos ao organismo, podem ser repassados de geração em geração ou entre bactérias em um meio de cultura. A transferência desses novos genes pode ocorrer através de um organismo para os seus descendentes, sendo denominado por transferência vertical de genes (WATFORD; WARRINGTON, 2020). Ou, a transferência também pode ocorrer de uma bactéria para outros microrganismos de uma mesma geração, no qual este processo denomina-se transferência horizontal de genes (MADIGAN et al., 2016).

A transferência genética em bactérias também pode ocorrer através da conjugação ou transdução. O processo de conjugação ocorre entre bactérias geneticamente diferentes, sendo

necessário o contato entre os organismos. Este processo é mediado por um plasmídeo (pequeno fragmento de DNA circular) que transfere a informação de uma célula doadora de gene para uma célula receptora de gene, no qual este será transferido durante o processo de replicação. No caso da transdução, a troca da informação genética ocorre por intermédio de um bacteriófago (vírus que infecta bactéria) que ao entrar na célula bacteriana seu DNA é misturado com o DNA do hospedeiro. Caso infecte outra bactéria, pode ocorrer uma incorporação entre o DNA da primeira e da segunda bactéria infectada. Esta nova informação genética é então replicada a cada nova divisão (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009).

Alterações na base genética tem frequentemente conferido resistência aos antimicrobianos devido a processos de mutação. Os genes das enzimas  $\beta$ -lactamases, por exemplo, deram origem a catalisadores modificados que codificam um amplo espectro de resistência (afetam uma ampla variedade de bactérias), tendo se demonstrado mundialmente crescente (DAVIES; DAVIES, 2010).

Alterações na base genética também tem conferido a resistência bacteriana frente a antimicrobianos da classe das quinolonas, estando associada a mutações cromossômicas que alteram as enzimas alvo e sua afinidade de ligação ao fármaco; mutações cromossômicas que conduzem à redução do acúmulo de drogas através da diminuição da captação ou aumento do efluxo e através da aquisição de genes de resistência através dos plasmídeos produtores de proteínas de proteção alvo (CORREIA et al., 2017).

Outro mecanismo de resistência bacteriana frente ao fármaco é através da produção de enzimas que tem como função inativar a droga ou destruir a molécula (MUNITA; ARIAS, 2016). O processo de inativação enzimática afeta em sua maioria antibióticos de produtos naturais como, por exemplo, as Penicilinas, Cefalosporinas e carbapenemos. Este grupo compartilha uma mesma estrutura, o anel  $\beta$ -lactâmico que é alvo de enzimas  $\beta$ -lactamases que seletivamente hidrolisam o anel (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Um exemplo de aquisição de resistência através de mecanismos enzimáticos de inativação dos fármacos é através da presença de enzimas modificadoras. Nas bactérias Gram-negativas as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) é considerado o principal mecanismo de resistência deste grupo. As AMEs são responsáveis por modificarem os grupos hidroxila ou amino ( $-OH$  ou  $-NH_2$ ) da molécula aminoglicosídeo dos fármacos, resultando na ineficácia do mesmo (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; MUNITA; ARIAS, 2016). De acordo com Ramires & Tomalsky (2010), a combinação dos processos de mutação tem propiciado para uma contínua geração de novas variantes enzimáticas e os genes codificadores dessas enzimas, em conjunto com outros determinantes de resistência, acabam propiciando em

isolados multirresistentes.

O efluxo do antibiótico é outro mecanismo de defesa bacteriana contra a ação do fármaco. Basicamente, em bactérias Gram-negativas, determinadas proteínas presentes na membrana operam expelindo o antimicrobiano de forma a impedir uma concentração necessária do fármaco para que este seja eficaz. Em *E.coli*, a resistência a antimicrobianos de amplo espectro é contribuída através da atividade de bombas de efluxo, como é o caso da resistência às fluoroquinolonas, que tem sido relatada como um processo oriundo das atividades da bomba de efluxo (PUZARI; CHETIA, 2017).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar coliformes termotolerantes, presentes no Rio Carioca-RJ e avaliar sua susceptibilidade aos antimicrobianos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Pesquisar a presença de *E. coli* no Rio Carioca-RJ;
- Verificar a susceptibilidade das bactérias isoladas à diferentes antimicrobianos comerciais;
- Comparar a qualidade da água nos diferentes pontos de coleta, considerando as características físico-químicas e microbiológicas e levando em consideração a existência de águas residuais próximas a estabelecimentos de saúde e áreas urbanas domésticas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

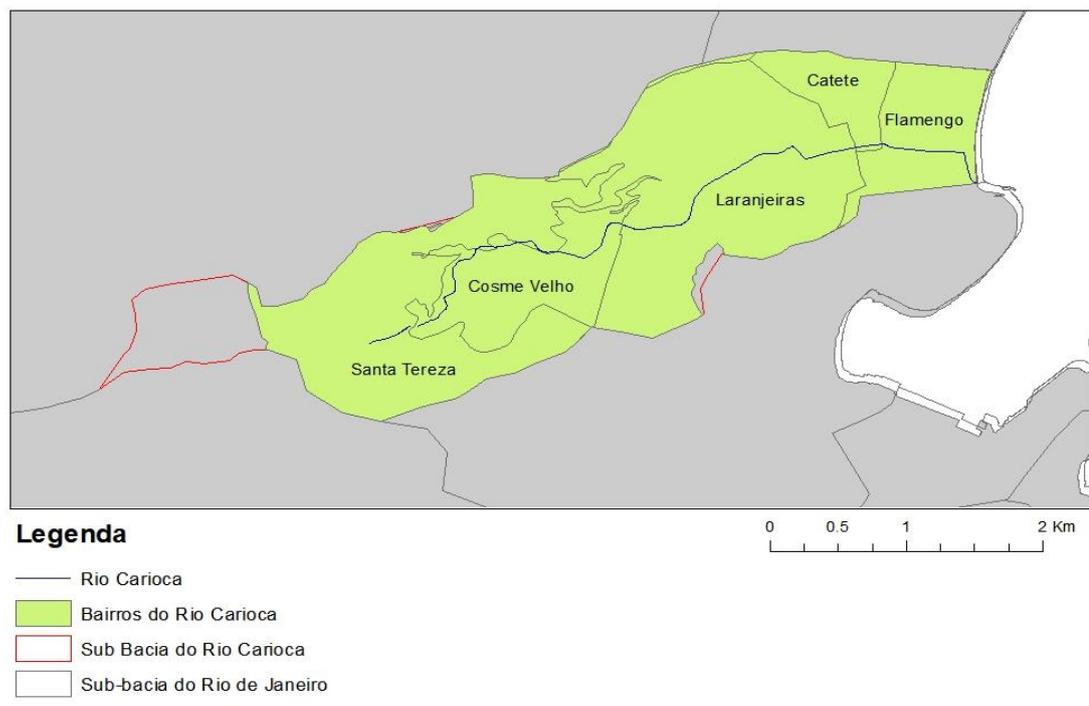
### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo é do tipo ecológico, caracterizado pela utilização de medidas agregadas e/ou ambientais. As medidas agregadas resumem as características de um determinado grupo como, média, taxa de incidência e prevalência. Já as medidas ambientais, descrevem os atributos físicos de uma localidade geográfica como, horas diárias de sol, clima, temperatura, entre outras (SZKLO, 2000).

### 4.2 ÁREA DE ESTUDO

Pertencente da Bacia da Baía de Guanabara (trecho Oeste) no município do Rio de Janeiro, o Rio Carioca nasce em uma área de preservação ambiental, na Floresta da Tijuca-RJ. O rio passa por subterrâneo por alguns bairros (Cosme Velho, Laranjeiras e Flamengo) até desaguar na praia do Flamengo (DE ARAÚJO et al., 2016), conforme apresentado na Figura 5. Atualmente, suas águas são visíveis em sua nascente, aqueduto/reservatório Mãe D'água (trecho tombado), no trecho do Largo do Boticário, antes da UTR-Flamengo e posterior à mesma, onde deságua na praia do Flamengo.

Figura 5– Bairros e o Rio Carioca



Fonte: Taíssa de Souza.

### 4.3 QUESTÕES ÉTICAS

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014 do ICMBio, o pesquisador deverá solicitar a autorização para a realização das atividades previstas no art. 3º da instrução. Devendo realizar o registro de forma voluntária, para a coleta de material botânico, fúngico e microbiológico no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBio, estando vinculado ao ICMBio.

Seguindo essas instruções normativas, este projeto foi submetido ao SISBio, tendo sua aprovação (Nº. 73355) para a realização de coletas no período de 02/12/2019 a 04/01/2021.

Considerando os aspectos éticos do âmbito da Resolução CNS nº 466/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, CEP/ENSP, foi consultado e emitiu o documento de dispensa de avaliação do projeto (Anexo A).

Este projeto também foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado-SisGen, sob código A3A15E4.

### 4.3 AMOSTRAGEM

A escolha do momento da coleta seguiu as recomendações de evitar períodos de precipitação dentro de 24 horas anteriores e considerou também que a precipitação acumulada do período estimada estivesse entre os valores médios históricos (CPTEC/ INPE, 2020).

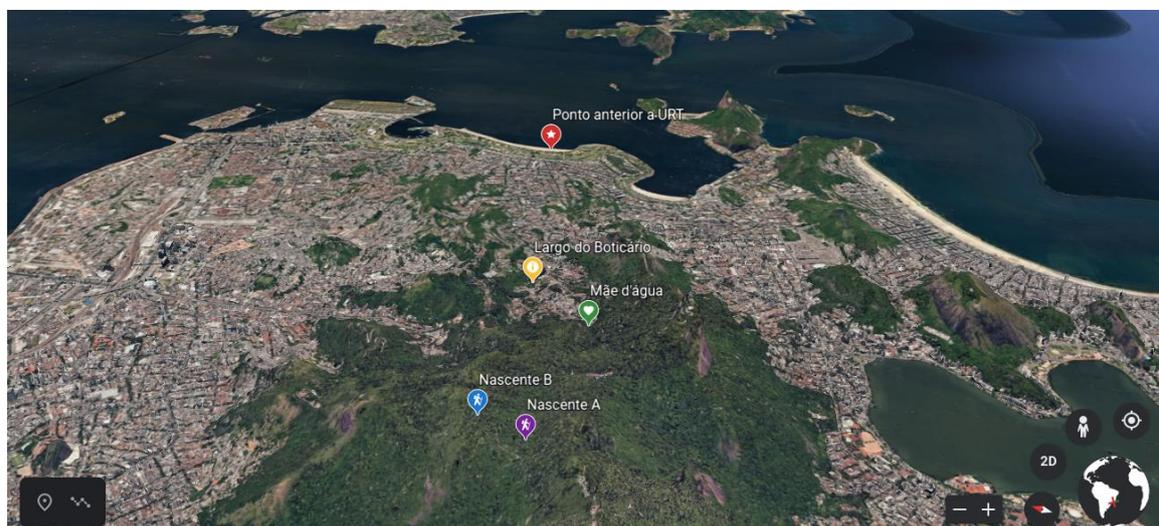
Foi utilizado para o trabalho de campo, um carro oficial da Fiocruz que permitiu, junto com a autorização do ICMBio, o acesso aos locais de coleta restritos ao público.

Foram coletadas amostras de água do Rio Carioca - RJ, em 5 diferentes pontos em que o Rio corre a céu aberto. Dois pontos correspondentes a possível nascente do Rio (Floresta da Tijuca), um no reservatório/aqueduto Mãe D'água, um no Largo do Boticário (Cosme Velho) e um ponto antes da Unidade de Tratamento de Rio do Flamengo (UTR-Flamengo) (Figura 6).

A escolha destes pontos foi realizada com base na informação de que nestes locais o rio corre a céu aberto (REBOISON, 2016; OGEDA et al., 2016). A definição do local de coleta na nascente foi realizada com o auxílio dos monitores do Parque Nacional da Tijuca, Flávio Henrique Deveza da Cunha, Carlos Alberto de Sousa Felipe e a Coordenadora de Pesquisa e Manejo do Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade-ICMBio, Katyucha Von Kossel. Como não havia informação oficial quanto ao local correto da nascente, optou-se, a partir da indicação dos monitores, em realizar a coleta em dois pontos

que convergiam para o rio, considerando que um deles provavelmente seria a nascente ou as duas nascentes viriam a formar o rio.

Figura 6– Mapa dos pontos de amostragem na Sub Bacia do Rio Carioca-RJ.



Fonte: Google Earth.

As amostras foram obtidas de acordo com as recomendações da CETESB (2011). Para as análises microbiológicas, realizou-se a coleta em triplicata. Em cada ponto amostral, foram coletadas 400 mL de amostra, sendo 100 mL em cada frasco. Deste total, 300 mL foram utilizadas para as análises biológicas, ao passo que 100 mL foram utilizadas para as análises físico-químicas. O material foi obtido a uma profundidade de aproximadamente 20 cm.

Posterior à obtenção das amostras, o material foi mantido em ambiente refrigerado (caixa térmica), não excedendo o intervalo de quatro horas entre a coleta e o processamento do material.

As análises biológicas foram todas realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da ENSP/FIOCRUZ (LabMicro), ao passo que as análises físico-químicas como cor, turbidez e condutividade, foram realizadas com a colaboração do Laboratório de Análises Físico-Químicas do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental-DSSA-ENSP/FIOCRUZ.

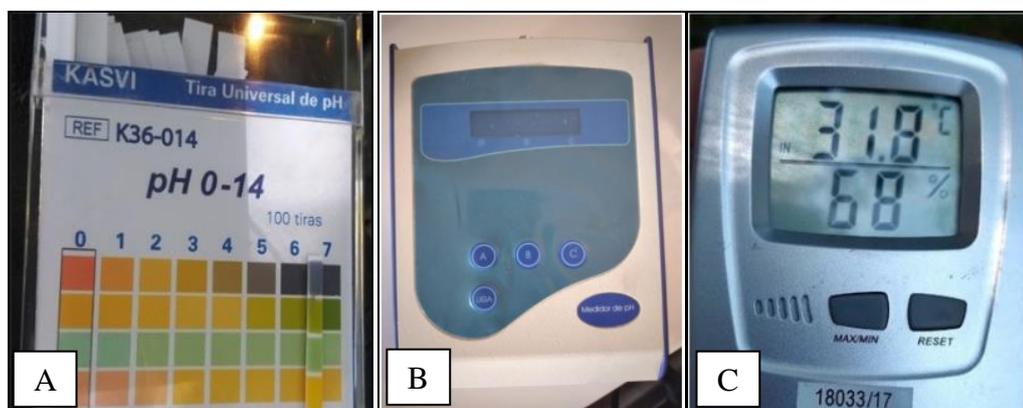
#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Parâmetros físico-químicos como pH e temperatura foram mensurados no local de amostragem. Com a finalidade inicial de determinar o pH no local e momento da coleta foi utilizada a Tira Universal de pH 0-14 da KASVI® (Figura 7.A) seguindo as instruções do fabricante. O pH foi confirmado logo que chegamos da coleta no LabMicro em pHmetro

Luca 210<sup>®</sup> (Figura 7.B), seguindo o POP (procedimento operacional padrão) do Laboratório.

Para a obtenção da temperatura *in situ*, foi utilizado o Termômetro de máxima e mínima digital da INCONTERM (Figura 7.C).

Figura 7- Parâmetros físico-químicos avaliados.



Fonte: Taíssa de Souza.

Legenda: (A) Fita universal de pH; (B) pHmetro de mesa; (C) Termômetro digital.

A obtenção dos parâmetros cor, turbidez e condutividade seguiram as recomendações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23th ed (APHA et al., 2017) e foram realizados no DSSA-ENSP/Fiocruz.

#### 4.5.1 Parâmetro Cor

O método espectrofotométrico utilizado baseia-se na capacidade do padrão de Cloroplatinato de potássio ( $K_2PtCl_6$ ), gerar cores semelhantes à aparência natural das águas, ao receber determinadas quantidades de Cloreto de Cobalto ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ). A verdadeira cor e sua unidade é denominada como uC (unidade de cor).

O parâmetro cor foi determinado através do espectrofotômetro BioCHrom Libra S80 (Figura 8), a um comprimento de onda que variou entre 450 e 465 nm, com a utilização do padrão platina-cobalto. O espectrofotômetro foi aquecido de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizadas soluções e curvas padrões, de acordo com o método 2120 C do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA et al., 2017).

Uma célula do espectrofotômetro foi preenchida com água e posteriormente, o aparelho foi zerado. Por conseguinte, lavou-se uma célula do aparelho com a amostra, sendo, por conseguinte preenchida pela mesma. A leitura da cor foi realizada através da utilização de leituras de absorvância e curva padrão relativos à absorvância e uC (APHA et al., 2017).

Figura 8- Espectrofotômetro bioChrom.



Fonte: DSSA/ENSP

#### 4.5.2 Parâmetro Turbidez

Foi utilizado o Turbidímetro de bancada TL2350 da HACH (Figura 9) que mensura unidades nefelométricas de turbidez (UNT), de acordo com APHA (2017). Este método está fundamentado na comparação da intensidade da luz dispersa pela amostra, sob condições definidas (LEÃO et al., 2014; APHA et al., 2017).

Figura 9- Turbidímetro de bancada.



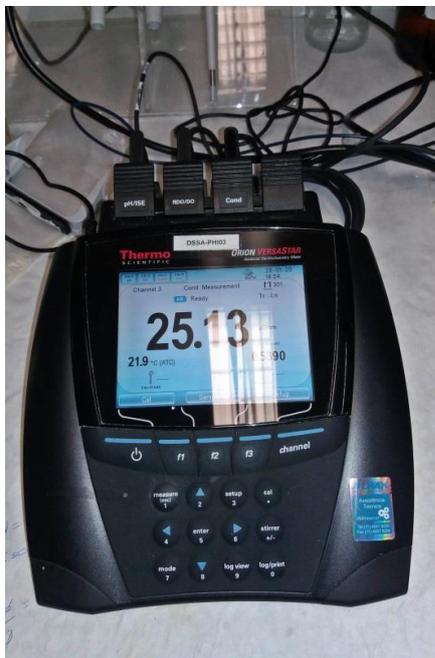
Fonte: DSSA/ ENSP

#### 4.5.3 Parâmetro Condutividade

A condutividade elétrica foi utilizada como medida indireta da salinidade, sendo definida como a capacidade que uma substância aquosa possui de transportar correntes elétricas. Sendo assim, a condutividade foi mensurada com o auxílio do medidor de bancada multiparâmetros Thermo Scientific Orion Versa Star<sup>TM</sup> (Figura 10) que mede a condutividade através de uma célula de condutividade que foi calibrado no momento do uso, seguindo o

método 2510 B do *Standards Methods* (APHA, 2017).

Figura 10- Medidor de bancada multiparâmetros.



Fonte: DSSA/ENP

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO

A detecção das bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes foi realizada através do Kit comercial COLItest® (LKP, 2019). O COLItest, é um método cromogênico e fluorogênico baseado na capacidade de *E. coli* produzir  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucuronidase, gerando cores amarelas ou fluorescentes ao metabolizarem nutrientes presentes no meio de cultura. O kit foi elaborado para a detecção simultânea da presença de coliformes totais e fecais. O substrato é composto por substâncias químicas, nutrientes, MUG (4-methylumbeliferil-b-D-glucuronide) e inibidores de bactérias Gram positivas, que na proporção correta, favorece o crescimento de bactérias Gram negativas e propiciam a identificação de *E. coli*, por meio do uso da fluorescência e o teste do indol (LKP, 2019). O COLItest® é validado frente a APHA/AWWA/WEF, descrito no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (LKP, 2019), pelo ITAL (Instituto Tecnológico de Alimentos) sob análise nº: MB -1836/05 (Anexo B) e aprovado e utilizado no Brasil por laboratórios de pesquisas e universidades (MORAIS, et.al., 2016; DOZZO, 2011).

Para a identificação da presença ou ausência de bactérias do grupo dos coliformes, foi adicionado um substrato (reagente) do kit (Figura 11.B) em cada frasco contendo amostra (Figura 11.A). O recipiente foi devidamente fechado e agitado, sendo submetido à incubação

à  $35 \pm 1$  °C por 24 horas. O procedimento foi realizado em cada uma das amostras. Os resultados foram lidos e interpretados de acordo com a tabela disponibilizada pelo fabricante (Tabela 1).

Figura 11- Representação do frasco utilizado para a coleta e reagente do Kit



Fonte: Taíssa de Souza.

Legenda: (A) Recipiente transparente e não fluorescente (B) Substrato do Kit Colitest.

Tabela 1- Interpretação de presença/ausência das bactérias do grupo dos coliformes.

COLItest®	Crescimento (turbidez)	Mudança de cor para amarelo	Fluorescência	Reativo de Kovacs (Indol)
Negativo	- ou +	-	-	-
Coliformes totais	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+

Fonte: Adaptado, LKP (2019).

Após a detecção da presença de *E. coli* (fluorescência positiva), foi realizado o teste do Indol, com utilização de reativo confirmatório (Kovacs) para a presença de *E. coli*. Nos casos confirmados, procedeu-se o isolamento da bactéria, de acordo com metodologia adaptada, proposta por Costa e Hofer (1972).

Placas de Petri contendo meio cromogênico indicador (UriSelect™4) solidificado, e meio EMB foram utilizadas para a semeadura por esgotamento, com o auxílio de uma alça bacteriológica contendo a amostra, sendo este procedimento realizado em todas as amostras positivas para *E.coli*. O método da semeadura por esgotamento permite isolar as bactérias que estão em grande quantidade e obter colônias isoladas (TORTORA, 2016). Após a semeadura, as placas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas.

#### 4.6 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

O teste de sensibilidade foi realizado de acordo com o manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, 2019, disponibilizado de forma gratuita pela ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2019).

A partir da cultura descrita anteriormente, foi retirada uma colônia isolada da placa, sendo adicionada a um recipiente com solução fisiológica estéril, que foi ajustado de acordo com o tubo 0.5 da escala de McFarland, correspondendo a uma escala de grandeza de  $1,5 \times 10^8$  bactérias. Seguindo os procedimentos indicados, um swab estéril foi mergulhado neste recipiente e com o auxílio deste, foi realizado o esgotamento por induto contínuo na superfície de outra placa de Petri contendo meio Müeller Hinton. Posteriormente, após tempo de secagem determinado, foram alocados sobre o meio de cultura os discos de antimicrobianos listados nos manuais supracitados, que estavam disponíveis no Brasil e de uso rotineiro no laboratório (Tabela 2). Subsequentemente, a placa foi incubada a  $35 \pm 1$  °C durante 16-18 horas em estufa bacteriológica.

Tabela 2- Tabela de antimicrobianos selecionados para a realização dos testes de susceptibilidade, com as suas respectivas categorias.

<b>Penicilina</b>		
Ampicilina (AMP) 10 µg		
<b>β-lactâmicos</b>		
Amoxicilina-clavulanato (AMC) 30 µg	Piperaciclina-tazobactam (PPT) 110 µg	
Ampicilina-sulbactam (ASB) 20 µg		
<b>Cefens</b>		
Cefazolina (CFZ) 30 µg	Cefoxitina (CFO) 30 µg	Ceftazidima (CAZ) 30 µg
Cefepime (CPM) 30 µg	Cefotaxima (CTX) 30 µg	
<b>Monobactamas</b>		
Aztreonam (ATM) 30 µg		
<b>Carbepenêmicos</b>		
Ertapenem (ETP) 10 µg	Meropenem (MER) 10 µg	Imipenem (IPM) 10 µg
<b>Aminoglicosídeos</b>		
Amicacina (AMI) 30 µg	Gentamicina (GEN) 10 µg	
<b>Fluoroquinolonas</b>		
Ciprofloxacino (CIP) 5 µg	Levofloxacino (LVX) 5 µg	
<b>Antagonista da via do folato</b>		
Sulfametoxazol-Trimetoprim (SUT) 25 µg		

Fonte: Adaptado, CLSI (2019).

Para a verificação da susceptibilidade da bactéria ao antimicrobiano, foi realizada a medição dos halos formados com o auxílio de um paquímetro, sendo o halo medido em mm. A susceptibilidade foi avaliada de acordo com a tabela disponibilizada nos manuais CLSI (2019) e BrCAST-EUCAST (2019), a partir dos quais, dependendo do tamanho do halo de ausência de crescimento formado, a bactéria foi classificada como Resistente (R), Intermediária (I), Susceptibilidade Dose-Dependente (SDD) ou Sensível (S).

Vale destacar que alguns antimicrobianos possuem concentrações diferentes entre os manuais BrCAST e CLSI. Deste modo, seriam necessárias concentrações menores do CAZ e CTX para a avaliação da susceptibilidade de acordo com o BrCAST (2019). Concentrações menores desses antimicrobianos não estavam disponíveis para uso no laboratório no momento das análises, portanto foi possível testar CAZ e CTX apenas de acordo com o manual CLSI (2019).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coleta realizada no dia 28 de janeiro de 2020, data definida pelo fato de não ter sido registrada precipitação nas últimas 24 horas anteriores ao dia da coleta, permitiu a obtenção de amostras nos cinco pontos onde o rio não estava subterrâneo (Figuras 12 e 13), abrangendo a nascente (Figura 12.A e 12.B), reservatório Mãe D'água (Figura 12.C), largo do boticário (Figura 13.A) e antes das águas receberem tratamento na UTR-Flamengo (Figura 13.B).

Figura 12- Fotos representativas dos locais de amostragem pertencentes a Floresta da Tijuca.



Fonte: Taíssa de Souza.

Legenda: (A) Nascente 1A, (B) Nascente 1B e (C) Mãe D'água.

Figura 13- Fotos representativas dos locais de amostragem na cidade.



Fonte: Taíssa de Souza.

Legenda: (A) Largo do Boticário e (B) Anterior a UTR-Flamengo.

Um sexto ponto seria coletado após a UTR, mas, de acordo com um funcionário da Companhia Municipal de Limpeza Urbana - COMLURB que se encontrava dentro da Unidade de Tratamento, a mesma não estava operando naquele dia, devido à falta de energia que ocorreu em torno das 10hs da manhã. Ainda de acordo com este funcionário, a Unidade estava sem nenhum responsável técnico. Mesmo com o auxílio de um gerador externo, a Unidade não estava conseguindo realizar suas operações. Deste modo, a mesma água que estava entrando na UTR, estava saindo na Foz do Carioca, no caso a Praia do Flamengo. Sendo assim, não se realizou a coleta de amostras de água na Foz do Carioca.

Esse fato corrobora a informação de Dias e colaboradores (2012), de que a estação

nem sempre está operando de forma adequada, o que acarreta possíveis riscos à saúde dos banhistas (DIAS; ROSSO; GIORDANO, 2012).

### 5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A Tabela 3 apresenta os resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos (temperatura, pH, turbidez, condutividade elétrica, salinidade e cor aparente).

A temperatura média foi de 30.04°C, apresentando menor temperatura na nascente e maiores no Largo do Boticário e no Flamengo (anterior a UTR). Todos os pontos apresentaram temperaturas superiores a 25°C.

Tabela 3- Resultados dos parâmetros físico-químicos analisados.

Variáveis	Nascente A	Nascente B	Mãe D'água	Lg. do Bot.	Antes da UTR
Coordenada	22°24'34.07"S 43.22'47.33"O	22°94'34.34"S 43°22'47.65"O	22°56'43.73"S 43°12'31.72"O	22°56'22.68"S 43°12'04.99"O	22°56'00.48"S 43°10'20.56"O
Hora da coleta	09:45	10:13	11:19	11:48	12:30
Temperatura (°C)	27.6	29	29.9	31.9	31.8
pH	6	6	6	6	6
Turbidez (NTU)	6.1	0.501	1.16	2.2	30.2
Condutividade elétrica (mS/cm)	62.4	51	69.7	212.6	374
Salinidade	41.72	33.49	47.04	158.09	292.12
Cor (Uc média)	42	7	10	44	460

Legenda: Nasc- Nascente. Lg. do Bot- Largo do Boticário

Tais resultados estão de acordo com os encontrados pelo projeto de monitoramento da qualidade das águas, intitulado “Observando os rios” estando vinculada a Fundação SOS Mata Atlântica. De acordo com os dados disponibilizados, a temperatura da água na altura de Cosme Velho e na Foz do Rio Carioca (Flamengo), apresentava-se em janeiro de 2020 com 26°C e 30°C, respectivamente (SOSMA, 2020).

Temperaturas a cima dos 30°C observadas no Largo do Boticário e no Flamengo (anterior a UTR), podem estar associadas às ações antrópicas nessas localidades, uma vez que nesses pontos, o Rio Carioca já cursou próximo a residências e estabelecimentos de saúde. No entanto, alguns autores associam temperaturas elevadas à incidência solar na lâmina d'água na

estação do verão (SILVA; SARCOMANI, 2001; COSTA, 2016).

Alvarenga et. al (2012), associaram a cobertura vegetal e o baixo fluxo das águas como um fator importante na regulação da temperatura das águas. Não obstante, Costa (2016) constatou temperaturas superiores a 25°C em rios contribuintes a Baía de Guanabara-RJ, valores esses encontrados posterior às 8h da manhã, atribuindo este fato a incidência solar ao longo do dia. Percebon et al.(2005), analisaram a temperatura das águas dos principais rios de Blumenau-SC, observando temperaturas frias/baixas em áreas que possuíam vegetação e temperaturas elevadas/quentes com médias superior aos 20°C em áreas consideradas poluídas devido ao adensamento populacional (PERCEBON, et al.2005).

O Rio Carioca segue seu curso em sua maioria por subterrâneo, aflorando novamente em poucos trechos. Na nascente, este rio segue encoberto pela vegetação, bem como no Aqueduto/reservatório Mãe d'água. No Largo do Boticário o rio segue com pouca luminosidade, devido à presença de algumas construções e árvores que bloqueiam a total incidência solar no rio. A maior incidência solar sobre este Rio ocorre em um pequeno trecho no Flamengo, antes das águas serem tratadas na UTR. Deste modo, temperaturas superiores aos 30°C encontradas nos dois últimos pontos amostrais podem estar associadas a outros fatores que não seja relacionado à incidência solar. Do ponto de vista físico, a temperatura é inversamente proporcional a concentração de oxigênio dissolvido, podendo-se dizer que, quanto menor sua concentração, mais poluído o curso d'água se encontra (BUZELLI; CUNHA-SANTINO, 2013). Esse dado corrobora visivelmente com a qualidade da água nos pontos de coleta, sendo o último ponto, o mais comprometido pela poluição.

O parâmetro pH, foi comum em todos os pontos de amostragem, apresentando um potencial hidrogeniônico igual a 6,0 (ácido). A Resolução Conama 357/2005 estabelece um pH entre 6 e 9 para as águas doces de classe I a IV, de modo a preservar o equilíbrio das comunidades aquáticas.

O enquadramento dos corpos hídricos em classes foi instituído em 1997, estando o enquadramento dos corpos aquáticos a cargo dos Comitês de Bacias Hidrográficas-CBH, sendo dever do Conselho estadual dos recursos hídricos validar. Atualmente, o Rio Carioca não possui um enquadramento de suas águas, o que de certo modo dificulta assegurar sua qualidade, uma vez que enquadrado a Resolução Conama 274 assegura a obrigatoriedade de se alcançar e manter a qualidade deste recurso de acordo com o seu enquadramento preponderante (INEA, 2010; CONAMA, 2005).

Bumen et al. (2010) associaram os valores de pH (6.8-7.3) encontrados no rio Sinos no sul do Brasil ao lançamento de efluente industrial e doméstico ao longo do rio, observando

uma pequena variação entre os pontos amostrados. Chatanga et. al (2019) ao analisarem os parâmetros físico químicos do rio Mohokare em Lesoto na África, observaram variações significativas entre os pontos de amostragem em todos os parâmetros analisados, exceto o pH. Os autores associaram tais diferenças ao lançamento de efluentes de indústrias têxteis, assentamentos humanos e a sistemas de tratamento de águas residuais naquela região.

Por outro lado, alguns autores associam o pH das águas às características geológicas e de relevo. Segundo Maier (1978), rios que percorrem sobre formações ígneas (que se originam no interior da terra), tende a ter um pH ácido, comumente em torno de 6. Ainda de acordo com o autor, rios ácidos encontram-se, frequentemente em terrenos alagadiços e de formações silicosas. De acordo com o plano de manejo do Parque Nacional da Tijuca, o Rio Carioca está inserido em uma área geomorfológica que possui em sua formação o quartzo e solo do tipo latossolo (ICMBIO, 2008), ambos ácidos.

O parâmetro turbidez apresentou maior valor no ponto anterior a UTR-Flamengo, com 30.2 NTU e menor na nascente B, com 0.501 NTU. Conforme apresentado na tabela 3, houve uma considerável diferença entre o valor encontrado na nascente A e na nascente B, que pode estar associado à maior presença de partículas de solo presentes na amostra da nascente A no momento da análise. Na Figura 12A e 12B pode-se evidenciar que o local de coleta da nascente A possuía uma maior quantidade de lama, diferentemente da nascente B.

Do mesmo modo que a turbidez, o parâmetro cor também apresentou considerável diferença entre a nascente A e a nascente B, sendo que dentre os pontos amostrais, o que apresentou o maior valor de cor média foi o ponto anterior a UTR.

Tanto a turbidez quanto a cor são influenciados por distintos fatores, entre eles a presença de matéria orgânica e substâncias em suspensão. Maier (1978) documentou que a existência de poluentes orgânicos, aumentam os valores de turbidez e cor. Observando os valores encontrados, nota-se uma tendência no aumento desses parâmetros entre a nascente B e o ponto anterior a UTR. Ressalta-se ainda o elevado valor desses parâmetros no local de amostragem anterior a UTR-flamengo, valores estes consideravelmente superiores aos demais pontos.

Devem-se levar em consideração as especificidades de cada ponto amostral. Uma vez que o Rio carioca nasce em uma área preservada e posteriormente adentra na malha urbana, valores tão elevados para os parâmetros de turbidez e cor no último ponto de amostragem podem sinalizar a deterioração das águas do Rio Carioca ao longo de seu percurso, estando o último ponto amostral mais degradado.

Os parâmetros condutividade elétrica e salinidade, também apresentam valores

crecentes entre a nascente B e o último ponto amostral (UTR-Flamengo).

Assim como outros parâmetros, a condutividade elétrica e a salinidade são influenciadas por diferentes fatores. A salinidade pode estar associada tanto ao tipo do solo e sua composição geoquímica (BRITO, 2005) quanto ao impacto das atividades antrópicas e influência das marés (COSTA, 2016). As águas de uma nascente geralmente possuem baixa salinidade, em torno de 0.5‰ (OLIVEIRA; CAMPOS; MEDEIROS, 2010). Deste modo, a salinidade na nascente (A e B) e reservatório Mãe D'água podem estar associadas a composição geoquímica daquela localidade. Entretanto, os crescentes valores observados no Largo do Boticário e anterior a UTR-Flamengo podem ser explicadas devido ao aumento do total de sais dissolvidos, em virtude do possível lançamento de efluentes nessas localidades, corroborando parcialmente com os estudos de Santos et al. (2009), que atribuíram o aumento dos teores de sais à influência do despejo de efluentes no Rio de Contas.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO

Nos testes realizados para a confirmação da presença ou ausência de bactérias do grupo dos coliformes (Figura 14), 99,9% foram positivas e 0,1 % (que correspondeu a uma das triplicatas da Nascente B), foi negativa para a presença de bactérias deste grupo, não ocorrendo a fermentação da lactose após 24 horas de incubação.

Figura 14- Resultado da presença/ausência de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes.



Fonte: Taíssa de Souza.

Legenda: (A) Nascente 1A (B) Nascente 1B, (C) Mãe D'água, (D) Largo do Boticário, (E) Anterior a UTR-Flamengo, (F) controle negativo para a presença de bactérias do grupo dos coliformes, (G) controle positivo para a presença de bactérias do grupo dos coliformes

Das 15 amostras, as 14 positivas foram submetidas ao transiluminador, resultando em

fluorescência em todas as amostras, conforme ilustrado (Figura 15). O teste da presença do indol, evidenciado após adição do reativo de Kovacs (Figura 16) foi também positivo em todas as 14 amostras, confirmando a presença de *Escherichia coli*.

Figura 15- Resultado positivo para a presença de *E.coli* no ponto anterior a UTR-Flamengo.



Fonte: Taíssa de Souza

Figura 16- Teste da produção de Indol confirmatório para *E.coli* em algumas amostras.



Fonte: Taíssa de Souza

Das amostras com crescimento no meio cromogênico (UriSelect™4) e meio EMB (Figura 17) foi retirada uma colônia de *E.coli* correspondente a cada ponto amostral, para a realização do TSA.

Figura 17- Amostra semeada após 24 horas de incubação.



Fonte: Taíssa de Souza

Legenda: (A) Meio cromogênico e (B) EMB.

As águas ambientais estão sujeitas a contaminação por *E.coli* através da ação humana

(SOUZA; GASTALDINI, 2014; SUZUKI et al., 2019) ou através de outros animais de sangue quente, todavia, a detecção de bactérias entéricas em animais de sangue frio já foi anteriormente relatada (MORENO et al., 1973), sugerindo que esses também possam contribuir para a detecção dessas bactérias no ambiente. Dentre as ações humanas, destacam-se vazamento de esgotos, fossas sépticas e descarga de águas residuais. Dentre as fontes de contaminação de origem animal, podemos destacar resíduos provenientes de animais de estimação e selvagens em parques e escoamento de fazendas de gado (CHO, et al. 2020).

Os pontos amostrais do reservatório/ aqueduto Mãe D'água, Largo do Boticário e anterior a UTR-Flamengo, constituem importantes regiões de ocupações residenciais (SCHLEE; CAVALCANTI; TAMMINGA, 2007), além de possuir unidades hospitalares próximos ao Rio que podem ter contribuído para a detecção de bactérias de origem fecal nessas localidades (DE ARAÚJO et al., 2016).

Fazendo um paralelo com os testes físico-químicos apresentados anteriormente, é possível que a detecção do aumento desses parâmetros estudados sejam um forte indício da contribuição do lançamento dos efluentes para a detecção da presença de isolados de *E.coli* resistentes.

### 5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Na Tabela 4, apresentamos a classificação comparativa da susceptibilidade dos isolados de *E.coli* frente aos discos de antimicrobianos utilizados, de acordo com o manual CLSI (2019) e o BrCAST-EUCAST (2019), estando suscintamente representado pela Figura 18.

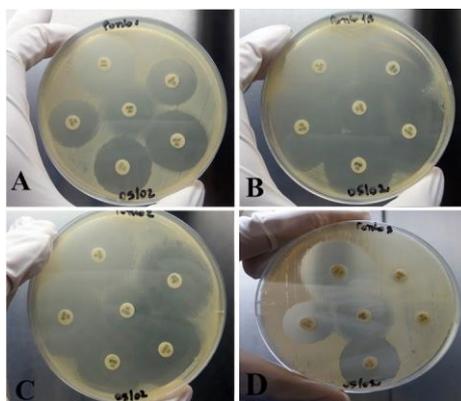
Como é possível observar (tabela 4), no que se refere às amostras analisadas, não houve diferença significativa entre as duas publicações (CLSI e BrCAST). Entretanto, ao seguir a recomendação do CLSI (2019) foi possível testar a susceptibilidade frente ao CAZ e CTX, análise que de acordo com o BrCAST, não poderia ser realizada, já que seriam necessários discos destes antimicrobianos com concentrações menores do que as disponíveis para uso no LabMicro.

Tabela 4- Resultado do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, comparativo entre CLSI e BrCAST. Fonte: Própria.

Agente antimicrobiano	Nascente A	Nascente B	Mãe D'água	Largo do Boticário	Antes da UTR
CPM 30 µg	S/S	S/S	S/S	<b>SDD/I</b>	S/S
CFO 30 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
CAZ 30 µg	S/*	S/*	S/*	S/*	S/*
ATM 30 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
CTX 30 µg	S/*	S/*	S/*	S/*	S/*
AMC 30 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
SUT 25 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	<b>R/R</b>
AMP 10 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	<b>R/R</b>
PPT 110 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
ASB 20 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
CFZ 30 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
AMI 30 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
LVX 5 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	<b>R/R</b>
CIP 5 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	<b>R/R</b>
MER 10 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
IPM 10 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
ETP 10 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S
GEN 10 µg	S/S	S/S	S/S	S/S	S/S

Legenda: Sensível (S), Susceptibilidade dose-dependente (SDD), Intermediário (I), Resistente (R), Não testado (\*). Interpretação CLSI/BrCAST

Figura 18- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos realizados em *E.coli* isoladas de algumas amostras.



Fonte: Taíssa de Souza.

Legenda: Teste de sensibilidade realizado em meio Müller Hinton (A) Nascente A, teste de susceptibilidade frente a Piperaciclina-tazobactam (halo formado-28 mm), Ampicilina (halo formado-22mm), Amicacina (halo formado-21 mm), Sulfametoxazol-Trimetoprim (halo formado-26 mm), Cefazolina (halo formado-24 mm) e Ampicilina-sulbactam (halo formado- 22 mm). (B) Nascente B, teste de susceptibilidade frente ao Levofloxacino (halo formado-28 mm), Ciprofloxacino (halo formado-31 mm), Imipenem (halo formado-26mm), Ertapenem (halo formado-34 mm), Gentamicina (halo formado-20 mm) e Meropenem (halo formado-33mm). (C) Largo do Boticário, teste de susceptibilidade frente ao Levofloxacino (halo formado-28 mm), Ciprofloxacino (halo formado-27mm), Gentamicina (halo formado-18 mm), Meropenem (halo formado-29 mm), Imipenem (halo formado-27mm) e Ertapenem (halo formado-30 mm). (D) Anterior a UTR-Flamengo, teste de susceptibilidade frente a Piperaciclina-tazobactam (halo formado-28 mm), Ampicilina (halo formado-7 mm), Sulfametoxazol-Trimetoprim (halo formado- 0 mm), Cefazolina (halo formado-25 mm), Ampicilina-sulbactam (halo formado-18 mm) e Amicacina (halo formado-23 mm).

No largo do boticário, embora a classificação frente ao CPM possua nomenclatura diferente (Tabela 4), ambas possuem o mesmo significado, já que possivelmente doses mais altas poderiam resultar na susceptibilidade do isolado frente a este antimicrobiano (RIVERA et al., 2016; CLSI, 2019; BRCAST, 2019).

Todos os isolados de *E. coli* das nascentes e Mãe D'água demonstraram-se sensíveis aos 18 antimicrobianos utilizados. Apesar desta sensibilidade ser esperada, um estudo realizado por Ogura et al. (2020) detectaram isolados de *Escherichia coli* resistentes em amostras de águas superficiais oriundas de uma área preservada, evidenciando a necessidade de maiores estudos a cerca dos percursos de distribuição e dispersão dessas cepas portadoras de genes de resistência no ambiente natural preservado (OGURA et al., 2020). Em nosso estudo, não foram identificados isolados resistentes nos pontos inseridos em área preservada.

A susceptibilidade de isolados de *E.coli* provenientes de águas superficiais frente à gentamicina, amicacina, amoxicilina-clavulanato, meropenem, imipenem, cefazolina, ceftazidima, cefepime, cefotaxima, cefoxitina, aztreonam, já foi anteriormente documentada em diferentes localidades (CANAL, 2010; VIEIRA et al., 2010; SCHNEIDER et al. 2011; OGURA et al., 2020). Esses estudos associaram o perfil de susceptibilidade encontrado à origem das águas e a emissão de efluentes. Assim sendo, corroborando com esses estudos, podemos considerar que o lançamento de efluentes de origem hospitalar e doméstico no Rio Carioca influenciou a diferença quanto ao perfil de susceptibilidade encontrado na nascente e no ponto anterior a UTR-Flamengo.

Os locais de amostragem das nascentes estão inseridos em uma área de mata, estando sob a proteção de uma unidade de conservação e sem nenhum indício de ocupação humana. Por outro lado, embora o reservatório/aqueduto Mãe D'água também esteja inserido em uma unidade de conservação e que este seja um patrimônio tombado, seu entorno possui um considerável número de edificações.

Apesar dessa diferença, se considerarmos somente a detecção de coliformes termotolerantes, a densidade populacional interferiu de forma pouco intensa na qualidade biológica das águas do Rio Carioca, já que ocorreu a detecção de bactérias de origem fecal nos três pontos amostrais que estão teoricamente mais preservados (apenas uma das triplicatas foi negativa). Todavia, por outro lado, não foram encontrados isolados resistentes nestas localidades. Esses achados reforçam a significativa contribuição dos efluentes lançados nos rios e oceanos para a detecção de bactérias portadoras de genes de resistência, a possibilidade de contribuição dos animais para a detecção de bactérias entéricas no ambiente natural

preservado e a importância das águas superficiais para a dispersão destes.

É importante considerar também que esse tipo de análise qualitativa, apesar de descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, pelo ITAL e amplamente utilizada no Brasil (TIARINI, 2020), não determina a quantidade de *E.coli* em dispersão no local, somente sua presença ou ausência, fato que pode interferir na avaliação da qualidade da água de forma geral. Por outro lado, reduz o tempo da análise e possibilita adaptação de outras metodologias como o isolamento e a detecção de resistência avaliada nesse estudo.

Isolados resistentes ao Sulfametoxazol-trimetoprim, Ampicilina, Levofloxacino e Ciprofloxacino foram encontrados no ponto amostral anterior a UTR-Flamengo (Tabela 4), Resultados similares também foram documentados em rios da cidade de Cascavel-PR que recebem efluentes, sendo identificados isolados de *E.coli* resistentes a ampicilina, ciprofloxacino e sulfametoxazol-trimetoprim, com susceptibilidade a gentamicina. Segundo os autores, a resistência encontrada foi compatível com os medicamentos que eram amplamente distribuídos pelas redes de farmácias primárias (MALAGI et al., 2020).

Semelhante ao nosso estudo, Blaak e colaboradores (2015) também detectaram a presença de isolados de *E.coli* resistentes em amostras de águas superficiais de diferentes fontes (rios, canais, riachos, lagos e Mar do Norte) da Holanda, sendo possível observar a diferença quanto ao perfil de resistência, que variou de acordo com o local de coleta, tipo do corpo d'água, nível de contaminação do corpo d'água e a época do ano. Ainda de acordo com os autores, as águas residuais comunitárias bem como as águas residuais provenientes de ambiente hospitalar colaboraram para a presença de *Escherichia coli* portadora de genes de resistência nas águas superficiais analisadas (BLAAK et al., 2015).

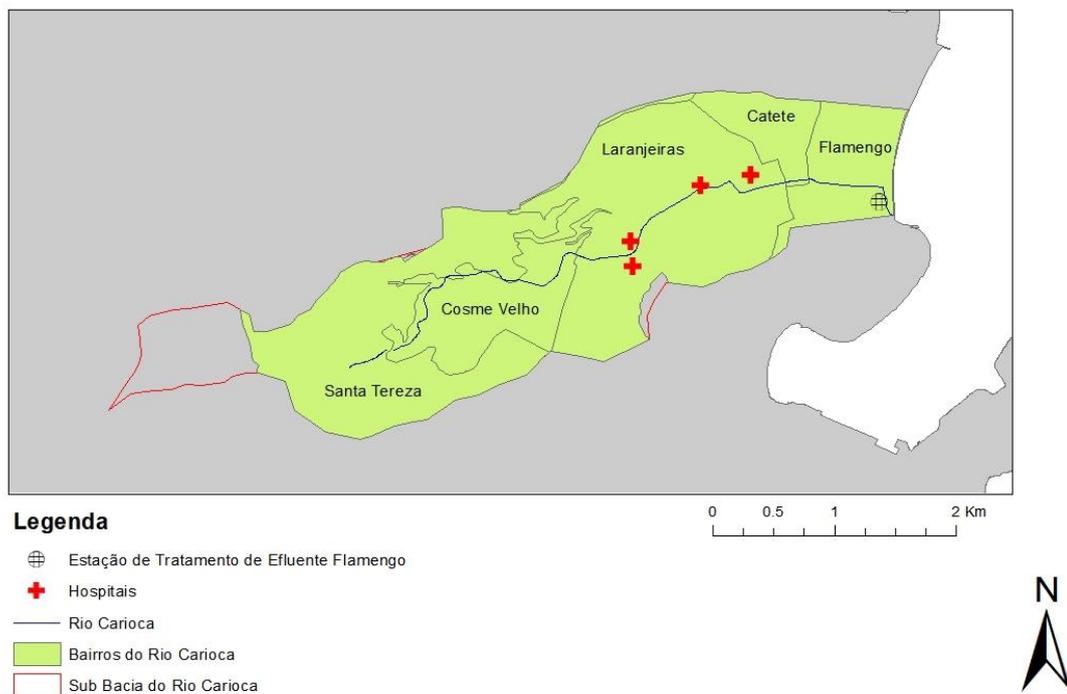
Podemos considerar que o Rio Carioca pode ser dividido quanto ao nível de contaminação de suas águas. Em nossos estudos, conforme apresentado anteriormente, foi possível observar um expressivo aumento dos valores das variáveis físico-químicas analisadas. O ponto amostral que se apresentou com os maiores valores dos parâmetros físico-químicos foi também a única localidade que foi constatada a presença de bactérias portadoras de genes de resistência, corroborando com os estudos de Blaak e colaboradores (2015) que também detectaram uma mudança do perfil de resistência de acordo com o nível de contaminação do corpo d'água.

Deste modo, o ponto anterior a UTR-Flamengo pode ser caracterizado como um ambiente seletivo, e propício para a aquisição da resistência bacteriana. Levando em consideração o aumento expressivo dos parâmetros de condutividade elétrica, salinidade e turbidez, pode-se sugerir a baixa qualidade das águas do Rio Carioca. As águas no ponto

anterior a UTR, podem estar mais degradadas devido ao somatório de todas as ações realizadas ao longo de seu percurso e por ser o ponto amostral em que as águas do Carioca já percorreram próximo a unidades de saúde, constituindo desta forma um grande reservatório para a manutenção de genes de resistência.

Conforme apresentado anteriormente, o Rio Carioca sofreu uma série de alterações em seu percurso, que propiciaram para a degradação da qualidade de suas águas. Em seu atual percurso, recebe o afluxo de diversos focos de contaminação além de percorrer próximo a unidades hospitalares (público e privado) conforme apresentado na figura 19.

Figura 19. Percurso atual do Rio Carioca-RJ. Destaque para os hospitais próximos ao rio e a Unidade de Tratamento de Rio instalada próxima a foz.



Fonte: Taíssa de Souza.

Suzuki e colaboradores (2019) ao analisarem amostras de água e sedimento do rio Kumano da cidade de Miyazaki e do esgoto tratado que é lançado no rio, observaram a presença de isolados de *E.coli* resistentes a ampicilina, cefazolina e ciprofloxicano. De acordo com a hipótese levantada por esses autores, é possível que a resistência de *E.coli* pudesse estar associada à aquisição de genes de resistência a antibióticos, enquanto essa bactéria participava do biofilme no sedimento, já que não foram encontrados isolados de *E.coli* resistentes em amostras do esgoto doméstico tratado (SUZUKI et al., 2019).

Por outro lado, um estudo sobre a variação sazonal na qualidade das águas superficiais do rio Kshipra-Índia, detectou a presença do sulfametoxazol nas amostras analisadas,

constatando também a resistência a este antimicrobiano nas *E.coli* isoladas das amostras de água e sedimento. Segundo os autores, a resistência estava associada a presença de fármacos nas amostras. O sulfametoxazol foi detectado em altas concentrações no outono e inverno, estando fortemente relacionado com a estação do ano e o pH (DIWAN et al., 2018). Em nosso estudo, embora não tenham sido realizados testes para a detecção da presença de resíduos farmacêuticos, supõe-se que estes estavam presentes, devido ao lançamento de efluentes de origem hospitalar neste rio, sendo detectada a resistência a antimicrobianos que são descartados de forma não metabolizada.

As fluoroquinolonas, assim como outros medicamentos, constituem importantes contaminantes ambientais emergentes. Este medicamento é eliminado através da urina, muitas vezes de forma não metabolizada (cerca de 70%), sendo lançado no ambiente aquático em altas concentrações, podendo persistir por longos períodos. Este fato favorece a seleção de genes de resistência a esta classe de antimicrobianos, estando a resistência de *E.coli* frequentemente associada a processos de mutação devido a interação desta bactéria com este contaminante ambiental (FINN et al., 2019; TEGLIA et al., 2019).

A resistência de *Escherichia coli* ao grupo das fluoroquinolonas surge através de processos de mutações em regiões determinantes de resistência às quinolonas (genes *gyrA* e *parC*) (MINARINI; DARINI, 2012; FINN et al., 2019). Em nosso estudo, a detecção de isolados portadores de genes de resistência ao ciprofloxacino e levofloxacino do grupo das fluoroquinolonas, pode indicar a circulação deste grupo de fármacos no corpo aquático estudado. Principalmente no ponto em que o Carioca já recebeu o aporte de efluente de origem hospitalar, que coincide com o ponto anterior a UTR-Flamengo, local de detecção de isolados resistentes às fluoroquinolonas.

De acordo com Silva et al. (2008), a resistência de *E.coli* frente ao ciprofloxacino tem sido associada à capacidade intrínseca desta bactéria de expressar genes de resistência quando exposta a um ambiente seletivo. Castrignanò et al. (2020), detectaram altas concentrações deste medicamento em amostras de águas residuais e efluentes do Reino Unido, associando a resistência dos isolados a este fato.

Em nosso estudo, foi observado resistência microbiana frente ao Sulfametoxazol-trimetoprim, um importante medicamento de primeira geração utilizado para o tratamento de infecções do trato urinário e frequentemente utilizado como tratamento padrão em unidades de terapia intensiva (UTI) (GÜNDOĞDU et al., 2011). A identificação de isolados resistentes a este fármaco pode sinalizar a possível presença de efluentes de origem hospitalar nesta localidade, contribuindo deste modo para a propagação de bactérias resistentes de origem

nosocomial.

Ao analisar o padrão de resistência aos antimicrobianos de infecções do trato urinário no nordeste do Brasil, Cunha et al. (2016) documentaram que 50.6% dos isolados de *E.coli* eram resistentes ao Sulfametoxazol-Trimetoprim. Por sua vez, estudos realizados por Bird et al., (2019), detectaram a presença de sulfametoxazol-trimetoprim em amostras de água bruta. Embora tenham considerado uma concentração baixa deste medicamento na amostra, os autores associaram sua presença no ambiente com a resistência dos isolados analisados, uma vez que, segundo eles, concentrações subletais são suficientes para desencadear uma pressão seletiva para trocas genéticas.

Outros autores associam a resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim a presença de genes que configuram resistência bacteriana frente a este antimicrobiano (BLAHNA et al., 2006; HO et al., 2009; MOKRACKA et al.,2012). Canal e colaboradores (2016), detectaram a presença de isolados de *Escherichia coli* em amostras de água superficial da Lagoa dos patos na região Sul do Brasil. No estudo, os autores relacionaram a presença de integrons, à resistência desses isolados frente aos antimicrobianos utilizados. Os mesmos autores também associaram a resistência, ao sinergismo entre a disseminação de genes de resistência através dos integrons com outros mecanismos de resistência, resultando na multirresistência dos isolados encontrados. Similarmente ao nosso estudo, Stange et al., (2016) relataram que isolados resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim também demonstraram-se resistentes a outras classes de antimicrobianos, o que pode estar relacionado ao sinergismo dos mecanismos de resistência.

Neste estudo, a resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, encontrada no ponto mais degradado, pode ser resultado da transferência de genes, considerado um importante mecanismo para a disseminação de traços de resistência (MUNITA; ARIAS, 2016), propiciado pela interação dos microrganismos neste ambiente seletivo.

O perfil de sensibilidade e resistência dos microrganismos está diretamente relacionado com a taxa de consumo dos fármacos no ambiente comunitário e hospitalar. Nota-se que a taxa de automedicação vem crescendo, principalmente em países em desenvolvimento. Sendo assim, se faz importante considerar a contribuição do efluente hospitalar e doméstico no que tange a colaboração de entrada de bactérias resistentes no ambiente aquático (KÜMMERER, 2009).

Ao considerar a diferença do perfil de consumo de medicamentos entre localidades, estudos prévios observaram que a susceptibilidade bacteriana variou em função da diferença no acesso e na taxa de consumo de determinados fármacos (CANAL, 2010; GRILLO et al.,

2013). Segundo Gottesman e colaboradores (2009), em Israel, por exemplo, houve restrição nacional ao uso de ciprofloxacino durante um período de tempo. Esses autores realizaram um acompanhamento dos efeitos deste tipo de restrição na resistência microbiana de bactérias Gram-negativas presentes na urina, em ambiente comunitário definido, observando uma redução na resistência de *E.coli* frente às quinolonas enquanto esse uso estava proibido no país (GOTTESMAN et al., 2009).

Pesquisas já realizadas sugerem que a origem das águas, a alta taxa de consumo de medicamentos e o tratamento inadequado dos efluentes hospitalares, podem influenciar o perfil de susceptibilidade de *Escherichia coli* (SZEKERES, 2017; SCHNEIDER et al., 2009). Outrossim, especificamente em *E.coli*, a resistência a ampicilina, gentamicina e ciprofloxacino pode ser observada em amostras de águas residuais devido sua ampla utilização na comunidade e nos hospitais (LÉPESOVÁ et al., 2018). Portanto, a resistência dos isolados encontrados neste estudo, pode estar atrelada a esses fatores.

A OMS indicou os antimicrobianos, gentamicina, meropenem, cefepime, aztreonam, ampicilina, ciprofloxacina, entre outros, como criticamente importantes para a medicina humana, por constituírem a única ou uma das poucas terapias disponíveis para o tratamento de determinadas infecções ou ainda por ser utilizada para o tratamento de bactérias transmitidas de fontes não humanas para humanos e bactérias que podem adquirir genes de resistência. A cefazolina, sulfametoxazol, trimetoprim, entre outros foram classificados como altamente importantes. A lista gerada inclui medicamentos altamente e frequentemente utilizados para o tratamento de infecções bacterianas (WHO, 2017).

Na pesquisa realizada no Rio Carioca, levando-se em consideração a distinção entre os pontos amostrais e a diferença no que tange o seu estado de conservação, nota-se que o aparecimento de resistência frente aos antimicrobianos foi observado apenas no ponto mais impactado (tabela 4), local em que as águas do Carioca já sofreram com as consequências do despejo de efluentes de fontes difusas, principalmente de origem hospitalar. A presença de isolados resistentes à AMP, CIP, LVX e SUT somente neste ponto, pode ser resultado de um tratamento de efluente hospitalar ineficiente, não tratamento do efluente hospitalar ou o resultado do alto consumo de medicamentos nas comunidades que circundam o Rio Carioca, local onde realizam o lançamento de seus efluentes, em alguns casos sem tratamento prévio.

Outro ponto importante no ponto amostral imediatamente anterior a UTR-Flamengo, está atrelado a detecção de multirresistência em *E.coli*. Considerando que a ANVISA (2007) define como multirresistente, todo o isolado que se apresentar resistente a duas ou mais classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al, 2012), e que a *Escherichia coli* tem sido

relatada frequentemente na clínica como multirresistente (PAITAN, 2018), é interessante observar que isolados obtidos neste estudo, apresentaram essa característica em ambiente hídrico, já que se mostraram resistentes frente a três diferentes classes de antimicrobianos (penicilina, fluoroquinolonas e antagonista da via folato).

A multirresistência encontrada no Flamengo (ponto 5 de coleta), demonstra a importância de considerar os corpos hídricos como reservatórios de genes de resistência, uma vez que são receptores de bactérias de diferentes fontes (efluentes hospitalar, doméstico, entre outros) (GUERRA *et al.* 2019; ZURFLUH *et al.* 2013), sendo um ambiente propício para a manutenção e propagação desses genes.

De acordo com Schlee e colaboradores (2007), a UTR-Flamengo foi construída para melhorar a qualidade da balneabilidade das águas na Praia do Flamengo. Entretanto, em nosso estudo, conforme relatado anteriormente, nem sempre a unidade opera corretamente. Vale lembrar que no dia da realização da coleta de amostras, a mesma água que adentrava na UTR, estava saindo sem tratamento. Deste modo, bactérias multirresistentes detectadas em nossos estudos, foram conduzidas para uma localidade de práticas recreativas, expondo a população que utiliza a Praia do Flamengo aos riscos associados à água de baixa qualidade, além do contato com *E.coli* resistentes que podem estar indicando a presença de outros microrganismos potencialmente patogênicos, incluindo o Sars-CoV-2 que já foi detectado em amostras de águas residuais (PRADO *et al.*, 2021).

Corroborando parcialmente com nosso estudo, ao analisarem o perfil de resistência de *Escherichia coli* isoladas de amostras de diferentes fontes aquáticas ambientais (água da torneira, água de poço, esgoto de estações de tratamento e efluente hospitalar), Amaya *et al.* observaram a multirresistência dos isolados frente a ampicilina, ciprofloxacina e Sulfametoxazol-Trimetoprim e, susceptibilidade frente a amoxicilina-clavulanato, ceftazidima, cefotaxima, gentamicina, entre outros, sendo a maior taxa de resistência encontrada nas amostras de efluente hospitalar quando comparadas as amostras do corpo receptor (AMAYA *et al.*, 2012).

Pesquisas realizadas anteriormente no Rio Carioca detectaram a presença de enterobactérias portadoras de diferentes genes codificadores de carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-370</sub> e *bla*<sub>GES-31</sub>), constatando a capacidade dos clones das enterobactérias de carregarem seus genes de resistência ao longo do rio e também após as águas já terem sido tratadas na UTR-Flamengo, sendo evidenciado pela detecção de bactérias portadoras de genes de resistência mesmo após tratamento de suas águas. Vale destacar, que este estudo trouxe o primeiro relato da família membro do OXA-370 em ambientes aquáticos, tendo sido

anteriormente encontrado somente em ambiente hospitalar (DE ARAUJO et al., 2016). Tais resultados reforçam a presença de efluentes de origem hospitalar neste corpo hídrico, contribuindo para tal detecção.

Em nosso estudo, esperava-se encontrar resistência bacteriana a uma maior classe de antimicrobianos, conforme observado em outros estudos realizados em corpos hídricos receptores de efluentes (CANAL et al., 2016; SOUZA et al., 2014; STANGE et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2010). Entretanto, devido a pandemia da COVID-19 que se instaurou em 2020, não foi possível a realização de outras campanhas de amostragem em diferentes períodos/estações do ano, já que foi coletado no verão, onde chuvas recorrentes podem de certa forma diluir o material a ser analisado.

Apesar das limitações encontradas durante a realização desse estudo os dados obtidos foram suficientes para apresentarmos algumas conclusões importantes. Além disso, esse trabalho abre precedente para novas pesquisas na área, buscando avaliação sazonal, inclusão de outros micro-organismos e também elucidação de forma mais completa às questões colocadas e conclusões que ora são expostas.

## 6. CONCLUSÕES

Houve detecção de bactérias do Grupo dos Coliformes termotolerantes em todos os pontos amostrais.

Foi possível constatar a diferença da qualidade físico-química entre os pontos amostrais, já que os valores encontrados sugerem que as águas da nascente (A e B) e Mãe d'água apresentaram-se com condições melhores do que as águas do Largo do Boticário e anterior a UTR-Flamengo.

A avaliação final da qualidade da água deve considerar tanto parâmetros microbiológicos quanto físico-químicos senão ficará comprometida.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *E.coli* isoladas foi se alterando em função da passagem do Rio por locais mais habitados.

Detectou-se multirresistência (AMP, CIP, LVX, SUT) no ponto posterior às unidades de saúde e áreas urbanas domésticas.

Foi possível constatar que o ambiente aquático é um importante veículo pelo qual a população pode ser diretamente exposta a microrganismos resistentes a diferentes classes de antimicrobianos, uma vez que as águas do Rio Carioca são lançadas (por vezes, sem tratamento) na praia do Flamengo, local onde são realizadas práticas de recreação e balneabilidade.

É de extrema importância não só tratar os efluentes, principalmente hospitalares, previamente à liberação em rios urbanos, como também promover a recuperação dos rios já degradados visando a melhoria da qualidade de suas águas

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J; NOGUEIRA, J. M. R. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 240-244, 2017.
- ADEOLU, M; ALNAJAR, S., NAUSHAD, S; GUPTA, R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.
- ALVARENGA, L. A.; MARTINS, M. P. P.; CUARTAS, L. A.; PENTEADO, V. A.; ANDRADE, A. Estudo da qualidade e quantidade da água em microbacia, afluente do rio Paraíba do Sul – São Paulo, após ações de preservação ambiental. **Ambi-Agua**, v. 7, n. 3, p. 228-240, 2012.
- AMAYA, E; PANIAGUA, M; CALDERÓN, S; RASHID, M-U; COLQUE, P; KUHN, I; LLBY, MO; WEINTRAUB, A; NORD. C. E. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from different aquatic environmental sources in León, Nicaragua. **Clin Microbiol Infect**, p. E347-54, 2012
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Intervenções e medidas de prevenção e controle de resistência microbiana. 2007. Disponível em:  
[https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo5/def\\_introducao3.htm#:~:text=M%C3%B3dulo%205%3A%20Interven%C3%A7%C3%B5es%20e%20Medidas%20de%20Preven%C3%A7%C3%A3o%20e%20Controle%20da%20Resist%C3%Aancia%20Microbiana&text=As%20bact%C3%A9rias%20multirresistentes%20s%C3%A3o%20definidas,a%20v%C3%A1rias%20classes%20de%20antimicrobianos.](https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo5/def_introducao3.htm#:~:text=M%C3%B3dulo%205%3A%20Interven%C3%A7%C3%B5es%20e%20Medidas%20de%20Preven%C3%A7%C3%A3o%20e%20Controle%20da%20Resist%C3%Aancia%20Microbiana&text=As%20bact%C3%A9rias%20multirresistentes%20s%C3%A3o%20definidas,a%20v%C3%A1rias%20classes%20de%20antimicrobianos.)  
 Acesso em: 27 de fev, 2021.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Módulo 3 Resistência Microbiana – mecanismo e impacto clínico. Brasília: Ministério da Saúde; 2007. Disponível em:  
[https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/mecanismos.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm). Acesso em: nov, 2020.

ANVISA. Resistência microbiana- Mecanismos e impacto clínico. 2007. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/mecanismos.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm). Acesso em: 10 nov. 2019.

APHA- American Public Health association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23rd. ed. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation, 2017.

BARTRAM, J; BALLANCE, R. Microbiological Analyses. In: Water Quality Monitoring - A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes. UNEP/WHO, 1996.

BARTRAM, J; PEDLEY, S. Water quality monitoring: a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes. 1st ed. London ; New York: E & FN Spon, 1996.

BERTO, J; ROCHENBACH, G. C., BARREIROS, M. A. B., CORRÊA, A. X., PELUSO-SILVA, S; RADETSKI, C. M. Physico-chemical, microbiological and ecotoxicological evaluation of a septic tank/Fenton reaction combination for the treatment of hospital wastewaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 4, p. 1076-1081, 2009.

BIRD, K; BOOPATHY, R; NATHANIEL, R; LAFLEUR, G. Water pollution and observation of acquired antibiotic resistance in Bayou Lafourche, a major drinking water source in Southeast Louisiana, USA. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 33, p. 34220–34232, 2019.

BLAAK, H; LYNCH, G; ITALIAANDER, R; HAMIDJAJA, R. A; SCHETS, F. M; DE RODA HUSMAN, A. M Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dutch Surface Water and Wastewater. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0127752, 2015.

BLAHNA, M. T; ZALEWSKI, C. A; REUER, J; KAHLMETER, G; FOXMAN, B; MARRS, C. F. The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim–sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 666–672, 1 abr. 2006.

BRASIL. Presidência da República. Lei No 11.445, de 5 de Janeiro de 2007. Estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico. **Diário Oficial da União**, 2007.

BrCAST - Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos, método de disco difusão, 2016.

BRENNER, D. J.; FARMER, J. J. Order XIII. "Enterobacteriales". **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, p. 587-607, 2005.

BUZELLI, G. M.; CUNHA-SANTINO, M. B. Análise e diagnóstico da qualidade da água e estado trófico do reservatório de Barra Bonita (SP). *Ambi-Agua*, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 186-205, 2013.

CANAL, N. **Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isoladas de amostras de água da Lagoa dos Patos, RS**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências básicas da saúde, programa de pós-graduação em microbiologia agrícola e do ambiente. p. 98, 2010.

CANAL, N. et al. Characterization of the variable region in the class 1 integron of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from surface water. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 337–344, 2016.

CASTRIGNANÒ, E. et al. (Fluoro)quinolones and quinolone resistance genes in the aquatic environment: A river catchment perspective. **Water Research**, v. 182, p. 116015, set. 2020.

CETESB- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: Água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo; **CETESB; ANA**, 2011.

CEZAR, P. B. Iconografia do Rio de Janeiro na época de sua fundação. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio Editorial, 2016.

CHO, S; Jackson, C. R; FRYE, J. G. The prevalence and antimicrobial resistance phenotypes of *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. in surface water. **Applied Microbiology**, v.71, p. 3-25, 2020

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.

CONAMA. Presidência da República. Lei No 274, de 29 de Novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. **Diário Oficial da União**. 2000, Sec. 1.

CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, n. 53, 2005.

CORREIA, S. POETA, P; HÉBRAUD, M; CAPELO, J. L; IGREJAS, G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 551–559, 2017.

COSTA, L. A. **Avaliação da contaminação por esgotos domésticos de rios contribuintes à Baía de Guanabara utilizando indicadores químicos e microbiológicos**. Dissertação (Mestrado)- Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 138p., 2016.

CROXEN, M. A; LAW, R. J; SCHOLZ, R., KEENEY, K. M; WLODARSKA, M; FINLAY, B. B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

CUNHA, M. A; ASSUNÇÃO, G. L. M; MEDEIROS, I. M; FREITAS, M. R Antibiotic Resistance patterns of urinary tract infections in a northeastern brazilian capital. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 0, 2016.

DA SILVA, G. V. T. R; GONÇALVES, T. G; JÚNIOR, J. C; PANIÁGUA, N. C; TELES, C. B. G. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 117-123, 2013.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, set. 2010.

DE ARAÚJO, C, F M; SILVA, D. M; CARNEIRO, M. T; RIBEIRO, S; FONTANA-MAURELL, M; ALVAREZ, P; ASENSI, M. D; ZAHNER, V; CARVALHO-ASSEFA, A. P. D'A. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4380–4383, 2016.

DELGADO DE CARVALHO, C. Historia da Cidade do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Secretaria Municipal de Cultura, Departamento Geral de Documentos e Informação Cultural, 1990.

DIAS, A. P.; ROSSO, T.C.A.; GIORDANO, G. A. Historiografia do Rio Carioca da cidade do Rio de Janeiro. Cap 3. **In:** Série Temática: Recursos Hídricos e Saneamento Volume 1. Rio de Janeiro, 2012.

DIWAN, V; HANNA, N; PUROHIT, M; CHANDRAN, S; RIGGI, E; PARASHAR, V; TAMHANKAR, A. J; LUNDBORG, C. S. Seasonal Variations in Water-Quality, Antibiotic Residues, Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes of *Escherichia coli* Isolates from Water and Sediments of the Kshipra River in Central India. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 6, p. 1281, 2018.

DOMINGUES, S; SILVA, G. J; NIELSEN, K. M. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. **Mobile Genetics elements**, n. 2, v.5, p. 211-223, 2012.

DOZZO, A. D. P. **Análise microbiológica da qualidade de água para consumo animal**. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Zootecnia, APTA/SAA. Nova Odessa-SP, 62p., 2011.

EMMANUEL, E. PERRODIN, Y; KECK, G; BLANCHARD, J; VERMANDE, P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. **Journal of Hazardous Materials**, v. 117, n. 1, p. 1–11, 2005.

ENDIMIANI, A.; PEREZ, F.; BONOMO, R. A. Cefepime: a reappraisal in an era of increasing antimicrobial resistance. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 6, n. 6, p. 805–824, 2008.

FENG, P; WEAGANT, S; GRANT, M; BURKHARD, W. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition, 8th ed. Bacteriological analytical manual. 8th ed, 2020.

FINN, T. J; SCRIVER, L; LAM, L; DUONG, M; PEIRANO, G; LYNCH, T; DONG, T; PITOUT, J. D. D; DEVINNEY, R. A comprehensive Account of *Escherichia coli* Sequence Type 131 in Wastewater Reveals an Abundance of Fluoroquinolone-Resistant Clade A Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 4, p. e01913-19, 2019.

FRANCA, D. T. A história do uso da água no Brasil. Do descobrimento ao século XX. Brasília: ANA- Agência Nacional de Águas, 2007.

FUNASA- Fundação Nacional de Saúde. Manual prático de análise de água. 4ª ed- Brasília, 2013.

GOTTESMAN, B. S; CARMELI, Y; SHITRIT, P; CHOWERS, M. Impact of Quinolone Restriction on Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolated from Urine by Culture in a Community Setting. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 869–875, 2009.

GRILLO, V. T. R. DA S; GONÇALVES, T. G; JÚNIOR, J. C; PANIÁGUA, N. C; TELES, C. B. G. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v. 34, n. 1, p. 117–123, 2013.

GÜNDOĞDU, A; LONG, Y. B; VOLLMERHAUSEN, T. L; KATOULI, M. Antimicrobial resistance and distribution of sul genes and integron-associated intI genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 1633–1642, 2011.

HEALTH CANADA. Guidelines for Canadian Recreational Water Quality Third edition ed. **Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canadá**, 2012.

HELLER, L. Relação entre saúde e saneamento na perspectiva do desenvolvimento. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, n. 2, p. 73-84, 1998.

HO, P. L; WONG, R. C; CHOW, K. H; QUE, T. L. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 627–634, 2009.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Perfil dos municípios brasileiros: saneamento básico: aspectos gerais da gestão da política de saneamento básico, 2017: pesquisa de informações básicas municipais. Rio de Janeiro: IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018.

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Instrução Normativa 03, de 01 de setembro de 2014. Fixa normas para a utilização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBio, na forma das diretrizes e condições previstas nesta Instrução Normativa, e regulamenta a disponibilização, o acesso e o uso de dados e informações recebidos pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade por meio do SISBio. Diário Oficial da União, nº 168, 2014.

ICMBIO- Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade. Plano de Manejo Parque Nacional da Tijuca, volume.1. Brasília, 2008

INEA- Instituto Estadual do Ambiente- Enquadramento. Disponível em:

<http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Agendas/GESTAODEAGUAS/InstrumentosdeGestodeRecHid/Enquadramento/index.htm&lang=#ad-image-2>. Acesso em: fev, 2021

INEPAC- Instituto Estadual do Patrimônio Cultural. Tombamento do Rio Carioca, 2019.

Disponível em: <http://www.inepac.rj.gov.br/index.php/publicacao/leiamais/199/index>. Acesso em: 12 fev. 2020.

JÚNIOR, S. D. A. S; BARAÚNA, L; DOS SANTOS, G. A. L., PAGUNG, E; CARVALHO, P. L; FREIRE, S. C. V., MORAES, R; SANTOS, R. P. Perfil de resistência de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de água superficial e efluente hospitalar: teste de sensibilidade a antimicrobianos e detecção de metalo- $\beta$ -lactamase. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**. v. 16, n.4, p. 97-104, 2014.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435–441, 2009.

LE CORRE, K. S; ORT, C; KATELEY, D; ALLEN, B; ESCHER, B. I; KELLER, J.

Consumption-based approach for assessing the contribution of hospitals towards the load of pharmaceutical residues in municipal wastewater. **Environment International**, v. 45, p. 99–111, 2012.

LÉPESOVÁ, K; KRAKOVÁ, L; PANGALLO, D; MEDVE-DOVÁ, A; OLEJNIKOVÁ, P; MACKU, T; TICHY, L; GRABIC, R; BIROSOVÁ, L Prevalence of antibiotic-resistant coliform bacteria, *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. in wastewater sewerage biofilm. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 14, p. 145–151, 2018.

LKP Diagnósticos. *Bula COLitest* [Instruções de uso do Kit COLitest®]. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1weWLRUOYEetqt3fKDCiwWNCWyUkhwo6f/view> . Acesso em: jan, 2020.

MADIGAN, M, T; MARTINKO, J, M; BENDER, K, S; BUCKLEY, D, H; STAHL, D. A. Microbiologia de Brock, 14<sup>o</sup> ed. Artmed, 2016.

MAGIORAKOS, A. P; SRINIVASAN A; CAREY R. B; CARMELI, Y; FALAGAS, M. E, GISKE, C. G; HARBARTH, S; HINDLER, J. F; KAHLMETER, G; OLSSON-LILJEQUIST,

B, PATERSON, D. L; RICE, L. B; STELLING, J; STRUELENS, M. J; VATOPOULOS, A, WEBER, J. T; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, n.18, v. 3, p. 268-281, 2012

MALAGI, I; SAMPAIO, S. C; PINTO, F. G. S; ROSA, D. M; DOS REIS, R. R. Physicochemical quality of and *Escherichia coli* resistance profiles in urban surface waters. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 3, p. 661–668, 2020.

MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, p. 33–39, 2014.

MAUCH, C.; ZELLER, T. Rivers in History and Historiography: An Introduction. In: MAUCH, C.; ZELLER, T. Rivers in History: Perspectives on Waterways in Europe and North America. Philadelphia, PA: Penn State University Press, 2008. p. 1-10. Disponível em: <https://digital.library.pitt.edu/islandora/object/pitt%3A31735062135920/viewer#page/1/mode/2up> Acesso em: 10 out 2019

MINARINI, L. A. R.; DARINI, A. L. C. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1309–1314, 2012.

MOKRACKA, J. Multiresistant Enterobacteriaceae with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. **Water research**, v. 46, n. 10, p. 3353-3363, 2012.

MORAIS. W. A., SALEH. B.B., ALVES.W.S., AQUINO.D.S. Qualidade sanitária da água distribuída para abastecimento público em Rio Verde, Goiás, Brasil. *Cad. Saúde Colet.*, Rio de Janeiro, v.24, n.3, p. 361-367, 2016.

MORENO, G; LOPES, C. M. A; BELLUOMINI, H. E; PESSOA, G. A. V; BIASI, P; ANDRADE, J. R. C. Enterobactérias isoladas de anfíbios e répteis. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.. 15, n.3, p. 122-126, 1973.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde-Bacteriologia. Rio de Janeiro EPSJV IOC, vol.3, 2009.

NOVAES, R. M. P; SOBRAL, M. D. M. R., BARRETO, C., NASCIMENTO, A. P. A., MONTEIRO, M. A., SPISSO, B. F; BIANCO, K; ROMÃO, C. M. C. P. A; CLEMENTINO, M. B. M. Perfil de resistência aos antibióticos e prevalência dos genes *qacE* e *sul1* em *Pseudomonas aeruginosa* de efluente hospitalar. **Vigil. sanit. debate**, p. 18–28, 2018.

NUÑEZ, L; TORNELLO, C; PUENTES, N; ESPIGARES RODRÍGUEZ, E; MORENO ROLDÁN, E; ESPIGARES GARCÍA, M; MORETTON, J. Hospital effluent constitutes a source of vancomycin-resistant Enterococci. **Ars pharm**, p. 121–126, 2016.

OGEDA, M. D. S.; ARAÚJO, T. R. DA; SEIXAS FILHO, J. T. DE. Rio Carioca: sua história e sua degradação. **Semioses**, v. 10, n. 3, p. 69–77, 2016.

OGURA, Y; UEDA, T; NUKAZAWA, K; HIROKI, H; XIE, H; ARIMIZU, Y; HAYASHY, T; SUZUKI, Y. The level of antimicrobial resistance of sewage isolates is higher than that of river isolates in different *Escherichia coli* lineages. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17880, 2020.

OLIVEIRA, C. N; CAMPOS, V. P; MEDEIROS, Y. P. D. Avaliação e identificação de parâmetros importantes para a qualidade de corpos d'água no semiárido baiano. Estudo de caso: bacia hidrográfica do rio Salitre. **Quím. Nova**. v. 33, n. 5, p. 1059-1066, 2010.

OLIVEIRA, R. S. DE. **Densidade e diversidade de fenótipos de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* sp, *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp isoladas de água, sedimento e mexilhão coletados em Santos e Itanhaém, São Paulo, Brasil**. Dissertação (Mestrado)—São Vicente: Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista - Instituto de Biociências, 2017.

OLIVEIRA, R. S. DE; KIYATAKE, D. M; HARADA, M. L; RIBEIRO, K. T. S. Sanitary quality of the public groundwater supply for the municipality of Belém in northern Brazil. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 21, n. 4, p. 377–383, 2013.

OPAS- Organização Pan- Americana da Saúde. DE S. Folha informativa - Resistência aos antibióticos, 2017. Disponível em:

[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812). Acesso em: nov, 2019.

OPAS-Brasil. Folha informativa- Resistência aos antibióticos, 2017. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812). Acesso em: dez, 2020.

PAITAN, Y. Current Trends in Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 416p. 181–211, 2018.

PAIVA, R. F. DA P. DE S.; SOUZA, M. F. DA P. DE. Associação entre condições socioeconômicas, sanitárias e de atenção básica e a morbidade hospitalar por doenças de veiculação hídrica no Brasil. **CadSaude Publica**, p. e00017316–e00017316, 2018.

PEIXOTO L.J.S.; SÁ, M.C.A.; GORDIANO, L.A.; COSTA, M.M. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arq. Inst. Biol.** v.79, n.3, p.453-461, 2012.

PERCEBON, C. M; BITTENCOURT, A, L.V; FILHO, E. F. R. Diagnóstico da temperatura das águas dos principais rios de Blumenau-SC. **Boletim Paranaense de Geociências**, v.56, p.7-19, 2005.

PRADO, T., FUMIAN, T. M., MANNARINO, C. F., RESENDE, P. C., MOTTA, F. C., EPPINGHAUS, A. L. F; VALE, V, H, C; BRAZ, R, M, S; ANDRADE, J. S. R; MARANHÃO, A. G; MIAGOSTOVICH, M. P. Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. **Water Research**, v. 191, p. 116810, 2021.

Presidência da República. Lei No 11.445, de 5 de Janeiro de 2007. Estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico. Diário Oficial da União. 2007.

PUZARI, M; CHETIA, P. R. N. D. Efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 24, 2017.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 6, p. 151–171,2010.

REBOISSON, T. B. S. 28ª Ópera Prima: Rio Carioca. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 2016. Disponível em:

<http://arcoweb.s3.amazonaws.com/docs/operaprima/2018/vencedores/PA-0614->

Projeto\_riocarioca.pdf Acesso em: out. 2019.

RIVERA, C. G.; NARAYANAN, P. P.; PATEL, R.; ESTES, L. L. Impact of Cefepime Susceptible-Dose-Dependent MIC for Enterobacteriaceae on Reporting and Prescribing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3854–3855, 2016.

RIZZO, L.; FIORENTINO, A.; ANSELMO, A. Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: Effect on antibiotics and antibiotic-resistant *E. coli* strains. **Chemosphere**, v. 92, n. 2, p. 171–176, 2013.

RUNNALLS, T.; MARGIOTTA-CASALUCI, L.; KUGATHAS, S.; SUMPTER, J. P. Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Steroids and Anti-Steroids as High Priorities for Research. Human and Ecological Risk Assessment: **An International Journal**, v. 16, n. 6, p. 1318–1338, 2010.

SANTORO, D. O.; CARDOSO, A. M.; COUTINHO, F. H.; PINTO, L. H.; VIEIRA, R. P.; ALBANO, R. M.; CLEMENTINO, M. M. Diversity and antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas* from a hospital wastewater treatment plant. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 6, p. 1527–1540, 2015.

SANTOS, J. S.; SANTOS, M. S. J.; SANTOS, M. P. L. Parâmetros indicativos do processo de salinização em rios urbanos do semi-árido brasileiro. **Quím. Nova**, v. 32, n.6, p.1534-1538, 2009.

SCHLEE, M. B.; CAVALCANTI, N. O.; TAMMINGA, K. As transformações da paisagem na bacia do Rio Carioca. **Paisagem e Ambiente**, n. 24, p. 267, 2007.

SCHNEIDER, R. N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 11–17, 2011.

SILVA, F. F. P.; SANTOS, M. A. A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 762–765, 2008.

SILVA, M. C. R.; FERNANDES, A. S. DA C. Uma abordagem das unidades de tratamento de rios (utrs) na gestão sanitária do município do Rio de Janeiro. **Projectus**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2017.

SOSMA- SOS Mata Atlântica. Observando os rios, 2020. Disponível em: <http://observandoosrios.sosma.org.br/grupo/1015/rio-do-rio-2?de=01%2F12%2F2019&ate=31%2F01%2F2020>. Acesso em: dez, 2020.

SOUZA, M. DE; PINTO, F. G. D. S; FRUET, T. K; PIANA, P. A; MOURA, A. C. D. Water quality indicators for environmental and resistance profile of *Escherichia coli* strains isolated in Rio Cascavel, Paraná, Brazil. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 2, p. 352–362, 2014.

SOUZA, M. M. DE; GASTALDINI, M. C. C. Water quality assessment in watersheds with different anthropogenic impacts. *Eng. Sanit. Ambient.* v.19, n.3, P. 263-274, 2014.

SOUZA, RENATA CRISTINA DE. **Tratamento de efluentes de lavanderia hospitalar para fins de reuso**. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Civil, Programa de Pós graduação em Engenharia Urbana, Maringá, PR, 119p., 2012.

STANGE, C; SIDHU, J. P. S; TIEHM, A; TOZE, S. Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 219, n. 8, p. 823–831, 2016.

SUZUKI, Y. HASHIMOTO, R., XIE, H; NISHIMURA, E; NISHIYAMA, M; NUKAZAWA, K; ISHII, S. Growth and antibiotic resistance acquisition of *Escherichia coli* in a river that receives treated sewage effluent. **The Science of the Total Environment**, v. 690, p. 696–704, 10, 2019.

SZEKERES, E; BARICS, A; CHIRIAC, C. M; FARKAS, A; OPRIS, O; SORAN, M-L; ANDREI, A-S; RUDI, K; BALC-AZAR, J. L; DRAGOS, N; COMAN, C. Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. **EnvironPollut**, p. 304–315, 2017.

TEGLIA, C. M; PEREZ, F.A; MICHLIG, N; REPETTI, M. R; GOICOECHEA, H. C; CULZONI, M, J. Occurrence, Distribution, and Ecological Risk of Fluoroquinolones in Rivers and Wastewaters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38,n.10, p. 2305–2313, 2019.

TEIXEIRA, J. C.; GOMES, M. H. R.; SOUZA, J. A. DE. Análise da associação entre saneamento e saúde nos estados Brasileiros: estudo comparativo entre 2001 e 2006.

**Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 197–204, jun. 2011.

TIARINI, C.M. **Estudo da qualidade microbiológica da água mineral, distribuída no Campus Inhumas**. Licenciatura em Química - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Campus Inhumas, GO. 48 p. 2020.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. , 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. , 2016.

VASCONCELOS, F. R. REBOUÇAS, R. H; EVANGELISTA-BARRETO, N. S; SOUSA, O. D; VIEIRA, R. H. S. F. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas do açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 405-410, 2010.

WASEEM, H; WILLIAMS, M. R; STEDTFELD, R. D; HASHSHAM, S. A. Antimicrobial Resistance in the Environment. **Water Environment Research**, v. 89, n. 10, p. 921–941, 2017.

WATFORD, S; WARRINGTON, S. J. Bacterial DNA Mutations. In: *StatPearls*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing, 2020.

WHO- World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance; world health organization, 2017

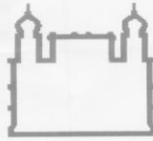
WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on sanitation and health, 2018

YATES, C.M.; PEARCE, M.C.; WOOHOUSE, M.E.J.; AMYES, S.G.B. High frequency transfer and horizontal spread of apramycin resistance in calf faecal *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.2, p.534-537, 2004

YOUSFI, K; LEFEBVRE, T; GAMEAU, P; BRAHMI, S; GHAROUT-SAIT, A; HAREL, J; BEKAL, S. Characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacilli isolated from hospitals effluents: first report of a *blaOXA-48*-like in *Klebsiella oxytoca*, Algeria. **Braz J Microbiol**, p. 175–183, 2019.

ZHANG, X.; LÜ, X.; ZONG, Z. Enterobacteriaceae producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. **Diagn Microbiol Infect Dis**, p. 204–6, 2012.

## ANEXO A- PARECER DE DISPENSA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz  
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca  
Comitê de Ética em Pesquisa



Rio de Janeiro, 27 de abril de 2020.

### Parecer de Dispensa de Análise Ética Nº 05/2020

**Título do Projeto:** “Qualidade microbiológica do Rio Carioca-RJ: isolamento e identificação de bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua susceptibilidade a antimicrobianos”

**Pesquisadora Responsável:** Taíssa de Souza Menezes da Silva

**Orientadores:** Joseli Maria da Rocha Nogueira e Eliana Napoleão Cozendey da Silva

**Instituição Proponente:** Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – ENSP/FIOCRUZ

**Tipo do projeto:** Projeto de Dissertação em Saúde Pública e Meio Ambiente da Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP

**Data de qualificação:** 19 / 03 / 2020

**Data de recebimento no CEP-ENSP:** 14/04/ 2020

**Data de apreciação:** 24 / 04 / 2020

O projeto descrito acima, conforme versão encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, em 14/04/2020, por e-mail, utilizará dados de acesso público e irrestrito, sendo, portanto, dispensado de apreciação ética pelo Sistema CEP-CONEP.

Importante ressaltar que, caso haja necessidade de acesso a indivíduos ou a base de dados ou documentos de acesso restrito no decorrer do desenvolvimento da pesquisa, será imprescindível a submissão do projeto ao CEP por meio da Plataforma Brasil, para apreciação ética, antes de efetuar as modificações.

*Jennifer B. Salgueiro*  
Atenciosamente,  
Jennifer Braathen Salgueiro  
Coordenadora do CEP/ENSP

## ANEXO B - VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA



### GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
 AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
 INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LAUDO DE ANÁLISE Nº: MB-1838/05

DATA DA EMISSÃO: 15/08/05

MATERIAL: "Kit" COLITEST para detecção de coliformes totais e *E. coli* em água

INTERESSADO: LKP Diagnósticos

DATA DA ENTRADA DA AMOSTRA: 24/03/05

DATA DA ANÁLISE: 18/03/05 a 04/07/05

NATUREZA DA ANÁLISE: Validação de método de análise microbiológica

RESPONSÁVEIS: Neusely da Silva, Valéria C. A. Junqueira

## 1. METODOLOGIA

### 1.1. Escopo

Foi feita uma validação do "kit" COLITEST® da LKP Diagnósticos para detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em água, em comparação com o Teste de Presença/Ausência (PIA) da APHA/AWWA/WEF, descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20ª ed. (CLESCERI, GREENBERG & EATON, 1998).

### 1.2. Amostras

Foram analisadas 55 amostras de água, utilizando-se os dois métodos em paralelo, nenhuma inoculada artificialmente. As amostras foram coletadas no período de 18/03/05 a 04/07/05, em vários municípios da região ou próximos à região de Campinas (SP), incluindo água de residência originária da rede de abastecimento público, água mineral, água de poço, água de fonte e água de rio (mananciais de estações de tratamento de água). A descrição das amostras encontra-se no Anexo 1.

### 1.3. Método de análise de referência

Seguiu o procedimento apresentado no Anexo 2, descrito em:

CLESCERI, L.S., GREENBERG, A.E., EATON, A.D., (Eds.). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20ª ed. Washington: American Public Health Association (A.P.H.A.), American Water Works Association (A.W.W.A.), Water Environment Federation (W.E.F.), 1998. Chapter 9, Section 9215.

### 1.4. Método de análise COLITEST

Seguiu o procedimento apresentado no Anexo 3, descrito na bula do fabricante.

#### Unidade Laboratorial de Referência de Microbiologia

Av. Brasil, 2880 – Jardim Chapadão

CEP 13070-178 – Campinas (SP)

Tel: (19) 3743.1820 - Fax (19) 3743.1822

<http://www.ital.sp.gov.br> e-mail: [micro@ital.sp.gov.br](mailto:micro@ital.sp.gov.br)

1/9



### 1.5. Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se as orientações de:

ISO/FDIS 16140:2002 (E). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*. Final Draft, ISO/TC 34/SC 9, 29/09/2002.

AOAC, 1999. AOAC International Qualitative and quantitative microbiology guidelines for methods validation. *JAOAC* 82(2):402-415.

## 2. RESULTADOS ANALÍTICOS

Os resultados da análise das 55 amostras de água, utilizando-se os dois métodos em paralelo, encontram-se descritos no Anexo 4.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

A análise estatística para validação de métodos qualitativos segundo a ISO 16140 contempla os seguintes parâmetros: acurácia (precisão) relativa, desvio positivo, desvio negativo, sensibilidade relativa e especificidade relativa. No Quadro 1 encontram-se os resultados pareados, no formato utilizado para a determinação dos parâmetros de validação da ISO/FDIS 16140:2002.

Quadro 1. Resultados pareados usados na determinação dos parâmetros de validação da ISO 16140.

Coliformes Totais		
Resultados	R+ = 30	R- = 25
A+ = 30	+/+ = PA = 30	-/+ = PD = (R-/A+) = 0
A- = 25	+/- = ND = (A-/R+) = 0	-/- = NA = 25
N = 55	N+ = (PA + ND) = 30	N- = (PD + NA) = 25
E. coli		
Resultados	R+ = 20	R- = 35
A+ = 20	+/+ = PA = 20	-/+ = PD = (R-/A+) = 0
A- = 35	+/- = ND = (A-/R+) = 0	-/- = NA = 35
N = 55	N+ = (PA + ND) = 20	N- = (PD + NA) = 35

A+ = Resultados positivos pelo método alternativo (COLITEST)

A- = Resultados negativos pelo método alternativo (COLITEST)

R+ = Resultados positivos pelo método referência

R- = Resultados negativos pelo método referência

PA = Concordância positiva = resultados positivos pelo dois métodos

NA = Concordância negativa = resultados negativos pelos dois métodos

ND = Desvio negativo = resultados positivos pelo método referência e negativo pelo método alternativo (COLITEST)

PD = Desvio positivo = resultados negativo pelo método referência e positivo pelo método alternativo (COLITEST)

N = Número total de amostras

N+ = resultados positivos pelo método referência

N- = resultados negativos pelo método referência

### 3.1. Curva de calibração

Não se aplica aos métodos qualitativos (ISO/FDIS 16140:2002, AOAC, 1999).

### 3.2. Linearidade

Não se aplica aos métodos qualitativos (ISO/FDIS 16140:2002, AOAC, 1999).

### 3.3. Precisão

Na validação de métodos microbiológicos a precisão é substituída pela acurácia ou precisão relativa (ISO/FDIS 16140:2002), determinada no item 3.5.

### 3.4. Exatidão

Na validação de métodos microbiológicos a exatidão é substituída pela acurácia relativa (ISO/FDIS 16140:2002), determinada no item 3.5.

### 3.5. Acurácia (precisão) relativa

A acurácia ou precisão relativa é definida pela ISO/FDIS 16140 (2002) como o grau de concordância entre a resposta obtida pelo método de referência e a resposta obtida pelo método alternativo, em amostras idênticas. Na validação de métodos microbiológicos é usada em lugar da precisão (grau de concordância entre o resultado do método e o valor de referência aceito) e da exatidão (grau de concordância entre o valor médio obtido pelo método alternativo, a partir de uma série de resultados analíticos, e o valor de referência aceito) porque o valor de referência utilizado é o resultado do método de referência, que não necessariamente fornece o valor de referência aceito.

$$\text{Acurácia relativa coliformes totais} = (PA + NA) \times 100/N = (30 + 25) \times 100/55 = 100\%$$

$$\text{Acurácia relativa E. coli} = (PA + NA) \times 100/N = (20 + 35) \times 100/55 = 100\%$$

### 3.6. Desvio positivo

Um desvio positivo ocorre quando o resultado do método alternativo é positivo e o do método de referência é negativo. Esse desvio se torna um falso positivo se for comprovado que o resultado verdadeiro é negativo, porém, se for comprovado que é verdadeiramente positivo, não é considerado um falso positivo.

$$\text{Desvio positivo coliformes totais} = PD/(R-/A+) = 0/(25/30) = 0$$

$$\text{Desvio positivo E. coli} = PD/(R-/A+) = 0/(35/20) = 0$$

### 3.7. Desvio negativo

Um desvio negativo ocorre quando o resultado do método alternativo é negativo e o do método de referência é positivo. Esse desvio se torna um falso negativo se for comprovado que o resultado verdadeiro é positivo, porém, se for comprovado que é verdadeiramente negativo, não é considerado um falso negativo.

$$\text{Desvio negativo coliformes totais} = ND/(A-/R+) = 0/(25/30) = 0$$

$$\text{Desvio negativo E. coli} = ND/(A-/R+) = 0/(35/20) = 0$$

### 3.8. Sensibilidade relativa

Sensibilidade relativa é a capacidade do método alternativo em detectar o analito quando esse é detectado pelo método de referência.

$$\text{Sensibilidade relativa coliformes totais} = \text{PA} \times 100/\text{N}_+ = 30 \times 100/30 = 100\%$$

$$\text{Sensibilidade relativa E. coli} = \text{PA} \times 100/\text{N}_+ = 20 \times 100/20 = 100\%$$

### 3.9. Especificidade

Especificidade relativa é a capacidade do método alternativo em não detectar o analito quando esse não é detectado pelo método de referência.

$$\text{Especificidade relativa coliformes totais} = \text{NA} \times 100/\text{N}_- = 25 \times 100/25 = 100\%$$

$$\text{Especificidade relativa E. coli} = \text{NA} \times 100/\text{N}_- = 35 \times 100/35 = 100\%$$

### 3.10. Limite de detecção e quantificação

Não exatamente aplicáveis. Teoricamente, os limites de detecção e quantificação serão uma partícula do analito no volume da unidade analítica, no caso, 1/100ml (AOAC, 1999).

## 4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram desempenho equivalente entre o COLITEST e o método de referência, para a detecção de coliformes totais e coliformes termotolerantes (*E. coli*) em água.

Visto

**Neusely da Silva**  
Diretora Técnica

.....

**Valéria C.A. Junqueira**  
Pesquisadora V