

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

Kauane Andressa Flach

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* RESISTENTE A
ANTIBIÓTICOS EM MANANCIAL NO NOROESTE DO RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL**

Frederico Westphalen, RS
2021

Kauane Andressa Flach

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS EM
MANANCIAL NO NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) *campus* Frederico Westphalen, como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental**.

Orientador: Dr. Genesio Mario da Rosa

Frederico Westphalen, RS
2021

Flach, Kauane Andressa

Detecção de Escherichia coli resistente a antibióticos em manancial no noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil / Kauane Andressa Flach.- 2021.

127 p.; 30 cm

Orientador: Genesio Mario da Rosa

Coorientador: Jeferson Alves da Costa Junior

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Campus de Frederico Westphalen, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, RS, 2021

1. Monitoramento ambiental 2. Qualidade da água 3. Detecção de Escherichia coli 4. Resistência Bacteriana 5. Saúde pública I. da Rosa, Genesio Mario II. da Costa Junior, Jeferson Alves III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

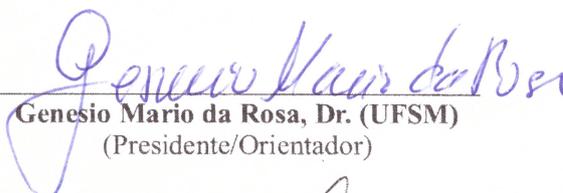
Declaro, KAUANE ANDRESSA FLACH, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

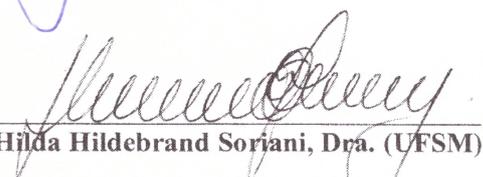
Kauane Andressa Flach

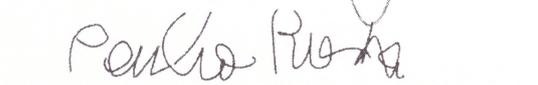
**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS EM
MANANCIAL NO NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) *campus* Frederico Westphalen, como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental**.

Aprovado em 10 de dezembro de 2021:


Genesio Mario da Rosa, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Hilda Hildebrand Soriani, Dra. (UFSM)


Paulo Ricardo Dell' Armelina Rocha Dr. (Unesp)

Frederico Westphalen, RS
2021

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, por saberem a importância dos estudos e sempre me apoiarem ao longo de minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é e sempre será para minha família. Minha mãe Marisa, papai Leonir, irmão Kauan e irmãs Camile e Cayme. Se não devo tudo, devo muito a vocês. A família é a base de tudo, meu obrigada pela educação, apoio e estrutura que me prestaram e sempre prestam, com certeza sem isso, não teria chegado onde cheguei. Apesar de sermos uma família humilde, conseguimos conquistar mais essa vitória e isso demonstra que para ter sucesso, basta sonhar, acreditar e idealizar. A caminhada nem sempre é fácil, mas o processo nos faz mais fortes.

Ao meu namorado Artur Felipe, obrigada pelo apoio, incentivo e por acreditar nos meus sonhos junto comigo. Obrigada por compreender minha ausência e pelo carinho incondicional.

Ao orientador Prof. Dr. Genesio Mario da Rosa, primeiro por acreditar que eu sou capaz, e depois por me auxiliar e orientar de maneira ímpar durante todo esse processo. Se um dia me tornar uma profissional minimamente tão qualificada quanto você, todos os esforços despendidos durante minha jornada acadêmica terão valido a pena. Gratidão por todos os conselhos, pois sempre possuía sabias palavras para me direcionar nos momentos de dúvida. Com certeza, tornaram o processo e decisões mais leves e agradáveis.

À Profa. Dr. Hilda Hildebrand Soriani, que me acolheu desde o primeiro minuto no mestrado, sempre pronta a me auxiliar e aconselhar, demonstrando sempre a excelente profissional que é. És uma inspiração para mim.

Ao Prof. Dr. Jefferson Alves da Costa Junior, sempre muito atencioso e dedicado em seus ensinamentos no laboratório, és um grande exemplo para mim.

Ao professor Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha, membro externo da banca de defesa.

À Profa. Dr. Jaqueline Ineu Golombieski, membra suplente da banca de defesa.

Aos colegas de laboratório Ana, Darlan, Deisy, Isabela, Gabriel e Ubiratan que me auxiliaram durante todo o processo do mestrado, nas idas a campo, coletas e análise de dados, bem como nas atividades paralelas do laboratório, que me fizeram aprender e engrandecer ainda mais como pessoa e profissional.

À dona Maria, por ter me acolhido em sua casa na cidade de Frederico Westphalen, sempre me esperando com um cafezinho e um lanche após um dia cansativo no laboratório. Com certeza a senhora tornou minha estadia muito agradável e alegre.

À Universidade Federal de Santa Maria campus Frederico Westphalen – RS, por oferecer a estrutura, instrumentos e profissionais qualificados para a minha formação. A Universidade Pública e Gratuita transforma a vida de muitas pessoas, e eu sou um exemplo disso.

Às demais pessoas que me auxiliaram em algum aspecto para a realização desse trabalho e formação.

Bendito aquele que possui em sua volta pessoas maravilhosas que tornam a jornada mais prazerosa. Com certeza, vocês foram essenciais para a conquista desse título.

Um galo sozinho não tece uma manhã.
(João Cabral de Melo Neto)

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca
cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.*
(Leonardo da Vinci)

RESUMO

DETECÇÃO DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS EM MANANCIAL NO NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

AUTORA: Kauane Andressa Flach
ORIENTADOR: Genesio Mario da Rosa

A água é o recurso natural mais importante para o equilíbrio da vida na Terra e possui uma inquestionável importância para a saúde humana. Devido a isso, conhecer as características dos cursos de água utilizados para as mais diversas atividades, como irrigação, recreação, captação, tratamento e posterior destinação ao consumo humano, entre outros, é excepcionalmente importante para que se possa garantir água em qualidade e quantidade necessárias para o pleno gozo da vida dos seres humanos e animais. Contudo, uma característica da água que vem sendo muito estudada nos últimos anos é a presença de bactérias resistentes a antibióticos que ameaça a saúde pública mundial. Dessa forma, esta pesquisa ambiental teve por objetivo avaliar a distribuição quali-quantitativa de *Escherichia coli* (*E. coli*) ao longo do Lajeado Pardo, no noroeste do Rio Grande do Sul e analisar o perfil de suscetibilidade das bactérias frente a agentes antimicrobianos. O Lajeado Pardo é abrangido pelo desague de cinco microbacias que fazem parte da Bacia Hidrográfica do Rio Várzea, e seu percurso foi dividido em quatro setores de amostragem, onde após às coletas, isolamento, testes bioquímicos e quantificação, as cepas de *E. coli* foram testadas quanto ao seu perfil de suscetibilidade frente a cinco antibióticos. A avaliação quantitativa de *E. coli* foi realizada através da metodologia do número mais provável (NMP) em 100 mL de água, com meio cromogênico Colilert. Por outro lado, a avaliação qualitativa foi realizada com a metodologia de isolamento em placa, com a utilização de meios seletivos distintos *Lauryl Sulfate Broth* (LSB), EC e Colilert. As cepas isoladas foram submetidas a testes bioquímicos (teste da catalase e coloração de Gram), para auxiliar a identificação de *E. coli*. Além disso, as cepas de *E. coli* isoladas nos quatro setores foram testadas quanto a sua suscetibilidade frente a ampicilina, amoxicilina clavulanato, gentamicina, ciprofloxacina e cloranfenicol. Foi verificado que 58,2% das amostras de água estavam acima do limite máximo permitido para enquadramento do corpo hídrico em classe 2. O setor com as amostras mais expressivas para *E. coli* foi o setor 1, junto a represa de captação de água da Companhia Riograndense de Saneamento (CASAN). Com relação ao isolamento em placa e testes bioquímicos, em todos os quatro setores e meios foi constatada a presença de *E. coli*. Com as cepas isoladas, procedeu-se o antibiograma, sendo que todos os isolados foram resistentes a Ampicilina, mostrando resistência acentuada para amoxicilina clavulanato e ciprofloxacina, sendo a gentamicina e cloranfenicol os antibióticos que apresentaram maior suscetibilidade frente as cepas testadas. Além disso, o estudo mostrou que as cepas isoladas de amostras ambientais quando comparadas entre si, por setor e através do meio seletivo de isolamento, diferiram estatisticamente. Coletivamente, este estudo forneceu dados de base sobre a resistência aos antibióticos do Lajeado Pardo na cidade de Frederico Westphalen, indicando que esse manancial pode ser reservatório de resistência aos antibióticos, uma vez que foram encontradas cepas de *E. coli* multirresistente a antibióticos neste local, apresentando potencialmente um risco para a saúde pública.

Palavras-chave: Água bruta. Microbacias. Resistência Bacteriana. Antimicrobianos. Saúde Pública.

ABSTRACT

DETECTION OF ANTIBIOTIC-RESISTANT *Escherichia coli* IN A FOUNTAIN IN NORTHWEST RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

AUTHOR: Kauane Andressa Flach

ADVISOR: Genesio Mario da Rosa

Water is the most important natural resource for the balance of life on Earth and has an unquestionable importance for human health. Because of this, knowing the characteristics of the water courses used for the most diverse activities, such as irrigation, recreation, capture, treatment and subsequent destination for human consumption, among others, is exceptionally important in order to guarantee water in the necessary quality and quantity for the full enjoyment of human and animal life. However, a feature of water that has been extensively studied in recent years is the presence of antibiotic-resistant bacteria that threatens global public health. Thus, this environmental research aimed to evaluate the quali-quantitative distribution of *Escherichia coli* (*E. coli*) along the Lajeado Pardo, northwest of Rio Grande do Sul, and to analyze the susceptibility profile of bacteria to antimicrobial agents. Lajeado Pardo is covered by the drainage of five watersheds that are part of the Várzea River Basin, and its route was divided into four sampling sectors, where after collection, isolation, biochemical tests and quantification, the *E. coli* strains were tested for their susceptibility profile to five antibiotics. The quantitative evaluation of *E. coli* was performed using the most probable number (MPN) methodology in 100 mL of water, with Colilert chromogenic medium. On the other hand, the qualitative evaluation was performed using the plate isolation methodology, using different selective media Lauryl Sulfate Broth (LSB), EC and Colilert. The isolated strains were submitted to biochemical tests (catalase test and Gram stain) to aid in the identification of *E. coli*. In addition, the *E. coli* strains isolated in the four sectors were tested for their susceptibility to ampicillin, amoxicillin clavulanate, gentamicin, ciprofloxacin and chloramphenicol. It was verified that 58.2% of the water samples were above the maximum limit allowed for the classification of the water body in class 2. The sector with the most expressive samples for *E. coli* was sector 1, next to the water catchment dam of the Riograndense Sanitation Company (CASAN). Regarding plate isolation and biochemical tests, the presence of *E. coli* was found in all four sectors and media. With the isolated strains, the antibiogram was carried out, and all isolates were resistant to Ampicillin, showing marked resistance to amoxicillin, clavulanate and ciprofloxacin, with gentamicin and chloramphenicol being the antibiotics that showed greater susceptibility to the tested strains. Furthermore, the study showed that the strains isolated from environmental samples when compared to each other, by sector and through the selective isolation medium, differed statistically. Collectively, this study provided baseline data on antibiotic resistance in Lajeado Pardo in the city of Frederico Westphalen, indicating that this stock may be a reservoir of antibiotic resistance, as multiresistant antibiotic-resistant strains of *E. coli* were found in this location, potentially presenting a risk to public health.

Keywords: Raw water. Watersheds. Bacterial resistance. Antimicrobials. Public health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da co-ocorrência de publicações em relação aos termos de referência utilizados na revisão da literatura.....	35
Figura 2 – Casos de DDA notificados no estado do Rio Grande do Sul, no município de Frederico Westphalen (FW) e caiçara, 2007 a 2019.....	55
Figura 3 – Verificação da presença de coliformes totais pela utilização de substrato hidrolisável.....	57
Figura 4 – Verificação da presença de <i>E. coli</i> pela utilização de substrato hidrolisável.....	57
Figura 5 – Ilustração da bacia hidrográfica do Rio Várzea-RS, Brasil.....	60
Figura 6 – Microbacias hidrográficas que compõem a área de captação da CORSAN. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	62

CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1

Figura 1 – Setorização prévia do Lajeado Pardo para análise da contaminação de <i>E. coli</i> . Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	68
Figura 2 – Indicação dos pontos de coleta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	69
Figura 3 – Microbacias que contribuem ao Lajeado Pardo, Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	70
Figura 4 – Fluxograma do método de análise de água por membrana filtrante.....	72
Figura 5 - Esquema do preparo dos inóculos com meio de cultura cromogênico Colilert para as amostras dos quatro setores.....	74
Figura 6 – Plumas de contaminação por coliformes totais e <i>E. coli</i> , setorizadas no Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	76
Figura 7 – Coloração de Gram para amostras de <i>E. coli</i> , coletadas no Lajeado do Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	79
Figura 8 – Teste da Catalase para amostras de <i>E. coli</i> , coletadas no Lajeado do Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	79

CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2

Figura 1 – Microbacias hidrográficas que contribuem para o Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	88
Figura 2 – Paquímetro digital para medição de diâmetro de halo no TSA.....	90
Figura 3 – Resumo metodológico dos isolados de <i>E. coli</i> provenientes de amostras de água do Lajeado Pardo-RS, Brasil, submetidos ao TSA.....	91
Figura 4 – Médias e desvios padrão dos três meios seletivos de isolamento para os cinco antibióticos testados.....	99
Figura 5 – Efeito dos antibióticos sobre as cepas isoladas em três meios de isolamento em amostras de água coletadas no setor 3 no Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	102
Figura 6 – Médias de diâmetro de halo dos antibióticos dentro do meio seletivo de isolamento de <i>E. coli</i> e padrão de sensibilidade.....	103
Figura 7 – Médias e desvios padrão de diâmetro de halo (mm) dos setores para coleta de água em cada meio seletivo de isolamento.....	106

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1

Tabela 1 – Tabulação do NMP de coliformes totais e <i>E. coli</i> pelo Sistema Quanti-Tray/2000, Colilert IDEXX®.....	77
---	----

CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2

Tabela 1 – Resultados do TSA provenientes de amostras de água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	93
Tabela 2 – Padrão de múltipla resistência aos antimicrobianos em <i>E. coli</i> selvagens isoladas de amostras de água no Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	95
Tabela 3 – Médias de diâmetros de halo resultante dos três meios seletivos em relação aos antibióticos para isolamento de bactéria em água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	97
Tabela 4 – Médias dos antibióticos utilizados para o TSA em relação aos três meios seletivos de isolamento de bactéria em água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	97
Tabela 5 – Valores de halos inibitórios esperados e valores observados, para cinco antibióticos testados e demonstração de sensibilidade e resistência ao teste TSA.....	98
Tabela 6 – Médias de diâmetro de halo dos setores analisados em relação aos meios utilizados para o isolamento de <i>E. coli</i> em água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	104
Tabela 7 – Média dos diâmetros de halo dos três meios seletivos em relação aos setores de coleta para o isolamento de bactéria em água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Valores de halos inibitórios esperados para <i>Enterobacteriaceae</i> no TSA	91
Quadro 2 – Comportamento das 12 cepas de <i>E. coli</i> oriundas dos 4 setores amostrados e isoladas nos 3 meios seletivos. Lajeado Pardo, Frederico Westphalen-RS, Brasil	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina clavulanato
AMP	Ampicilina
AMR	Resistência a Antimicrobianos
ANA	Agência Nacional de Águas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	<i>American Public Health Association</i>
AWWA	<i>American Water Works Association</i>
BH	Bacia Hidrográfica
BHI	Caldo de infusão de cérebro e coração
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CNRH	Conselho Nacional de Recursos Hídricos
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CORSAN	Companhia Riograndense de Saneamento
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DDA	Doenças Diarreicas Agudas
DDD	Doses Diárias Definidas
DeSAm	Departamento de Saúde Ambiental
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
DVH	Doenças de Veiculação Hídrica
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
ESBL	Beta-Lactamases de Espectro Estendido
ETAs	Estações de Tratamento de Água
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
ExPEC	<i>E. coli</i> Patogênica Extraintestinal
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
FIB	Bactéria Indicadora Fecal
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
FW	Frederico Westphalen
GLASS	Sistema Global de Vigilância de Uso e Resistência Antimicrobiana

GEN	Gentamicina
GM	Gabinete do Ministro
IAP	Índice de Qualidade das Águas Brutas para Fins de Abastecimento Público
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IQA	Índice de Qualidade das Águas
ISO	<i>Internacional Standardization Organization</i>
ISTO	Índice de Substâncias Tóxicas e Organolépticas
LQ	Limite de Quantificação
LSB	<i>Lauril Sulfate Broth</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCTIC	Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
MEC	Ministério da Educação e Cultura
mL	Mililitro
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MS	Ministério da Saúde
NMP	Número Mais Provável
ODS	Objetivos do Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAN BR	Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLANSAB	Plano Nacional de Saneamento Básico
PLISA	Plataforma de Informação de Saúde para as Américas
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
QUALIÁGUA	Programa de Estímulo à Divulgação de Dados de Qualidade de Água
R	Resistência
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
ReLAVRA	Rede Latino Americana de Vigilância da Resistência a Antimicrobianos
RNQA	Rede Nacional de Monitoramento de Qualidade das Águas
RS	Rio Grande do Sul
SDAP	Sistema de Distribuição de Água Potável
SEMA	Secretaria do Meio Ambiente e Infraestrutura
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SISAGUA	Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano
SMEWW	<i>Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater</i>
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
STEC	<i>E. coli</i> Produtoras de Toxinas Shiga
Stx 1	Shiga-toxina tipo 1

Stx 2	Shiga-toxina do tipo 2
TSA	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
UFs	Unidades Federativas
UGRH	Unidade de Gestão de Recursos Hídricos do Uruguai
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV	Ultravioleta
VIGIAGUA	Vigilância da Qualidade da Água
WEF	<i>Water Environment Federation</i>

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
1.1	OBJETIVOS	33
1.1.1	Objetivo Geral.....	33
1.1.2	Objetivos Específicos	33
1.2	HIPÓTESES	34
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	35
2.1	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A IMPORTÂNCIA DO MONITORAMENTO GLOBAL E SISTÊMICO PARA O CONTROLE	35
2.2	O PAPEL DO AMBIENTE AQUÁTICO PARA A DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A IMPORTÂNCIA DO SEU MONITORAMENTO.....	42
2.3	<i>Escherichia coli</i> COMO AGENTE ETIOLÓGICO NA DISSEMINAÇÃO DE DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA.....	47
2.4	CENÁRIO BRASILEIRO DA QUALIDADE DA ÁGUA, SURTOS DE DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA RELACIONADOS A <i>Escherichia coli</i> E LEGISLAÇÕES CORRELATAS	51
2.5	TÉCNICAS PARA DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> EM AMOSTRAS DE ÁGUA.....	55
2.6	BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO VÁRZEA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MUNICÍPIO DE FREDERICO WESTPHALEN-RS, BRASIL.....	59
3	CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1. PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA DO LAJEADO PARDO: AVALIAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E <i>Escherichia coli</i>	64
3.1	INTRODUÇÃO	65
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	68
3.2.1	Coleta das amostras de água.....	68
3.2.2	Quantificação de <i>Escherichia coli</i> e coliformes totais.....	71
3.2.3	Material Biológico: Isolamento Bacteriano em placa.....	71
3.2.4	Isolamento bacteriano em placa: método da membrana filtrante	71
3.2.4.1	<i>Método de isolamento EC</i>	72
3.2.4.2	<i>Método de isolamento Lauryl Sulfate Broth (LSB)</i>	73
3.2.4.3	<i>Método de isolamento Colilert</i>	73
3.2.5	Inóculos e repiques dos isolados	74
3.2.6	Cultura Estoque	75
3.2.7	Coloração de Gram.....	75
3.2.8	Teste da Catalase.....	75
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.3.1	Análise Microbiológica: Determinação da presença ou ausência e quantificação de <i>Escherichia coli</i>	76
3.3.2	Isolamento de <i>Escherichia coli</i> em amostras de água bruta em placa com o uso de três meio seletivos distintos e testes bioquímicos	78
3.4	CONCLUSÕES	80
3.5	REFERÊNCIAS	80
4	CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS DE <i>Escherichia coli</i> AMBIENTAIS DE MICROBACIAS AGRÍCOLAS DO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL	85
4.1	INTRODUÇÃO	86

4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
4.2.1	Isolamento bacteriano de amostras de água.....	87
4.2.2	Teste de Sensibilidade aos Antibióticos.....	89
4.2.3	<i>Escherichia coli</i> resistente a múltiplos antibióticos.....	91
4.2.4	Cultura Esteque.....	92
4.2.5	Análise estatística.....	92
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
4.3.1	Prevalência de <i>Escherichia coli</i> resistente a antibióticos e perfis de resistência a antibióticos em água bruta.....	92
4.3.2	Análises estatísticas do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA).....	96
4.4	CONCLUSÃO.....	108
4.5	REFERÊNCIAS.....	109
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
6	REFERÊNCIAS GERAIS.....	115

1 INTRODUÇÃO

A água é o recurso natural mais importante para o equilíbrio da vida na Terra. Diante disso, conhecer as características dos cursos da água utilizados para seus usos múltiplos como: captação, tratamento e posterior destinação ao consumo humano, irrigação, dessedentação animal, recreação entre outros, é excepcionalmente importante para que se possa garantir água em qualidade e quantidade necessárias para o pleno gozo da vida dos seres humanos. Contudo, uma característica da qualidade da água que vem sendo muito estudada nos últimos anos é a presença de bactérias resistentes a antibióticos que ameaça a saúde pública mundial.

Apesar da água ser um elemento vital, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (traduzido do inglês *World Health Organization*) (WHO) e Fundo das Nações Unidas para a Infância (traduzido do inglês *United Nations Children's Fund*) (UNICEF), 2,2 bilhões de pessoas em todo o mundo não têm serviços de água tratada, 4,2 bilhões de pessoas não têm serviços de saneamento adequado. Além disso, pode-se destacar as 3 bilhões de pessoas que não possuem instalações básicas para a higienização das mãos, 2,0 bilhões de pessoas ainda não possuem instalações de saneamento básico, como banheiros ou latrinas, sendo que desses 673 milhões ainda defecam ao ar livre, por exemplo em sarjetas, atrás de arbustos ou em cursos de água abertos (UNICEF, WHO 2019).

O consumo impróprio da água e a falta de saneamento em conjunto, constituem uma elevada mortalidade infantil, sendo que todos os anos são registrados cerca de 297.000 óbitos de crianças menores de 5 anos no mundo. Estima-se que o saneamento inadequado cause 432.000 mortes de pessoas por diarreia anualmente no mundo, sendo o saneamento fator importante em várias doenças tropicais negligenciadas (UNICEF, WHO 2019).

Apesar do Brasil possuir 12% do total dos mananciais de água doce do planeta (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO, 2010), que designa o país como detentor das maiores reservas de água doce do mundo, cuja vazão total de seus rios alcança 180 mil m³ por segundo (CONTI; SCHROEDER, 2013), dados estatísticos preocupantes fornecidos pelo Painel do Saneamento no Brasil de 2017, direcionam atenção para as mais de 35 milhões de pessoas que não possuem acesso a água potável no país. Nesse aspecto, merece atenção também os dados expressivos que remetem a mais de 100 milhões de brasileiros (46%) sem acesso a coleta de esgoto, o país não trata a metade do esgoto que gera (49%), jogando na natureza todos os dias, 5,3 mil piscinas olímpicas de esgoto sem tratamento (BRASIL, 2021a).

Devido a todo esse problema de infraestrutura e redes de saneamento que a população carece, foram registrados somente em 2019, 258 mil internações em função de doenças de veiculação hídrica, além do registro de 2.734 mortes por causas ambientais ligadas a má qualidade da água (BRASIL, 2021a).

Atualmente existem poucos estudos e informações que remetam a poluição biológica em águas brutas no Brasil (MARTINS et al., 2020; OLIVEIRA, T. R.; GOMES, R. P, 2021; VALENTINI et al., 2021) e, conseqüentemente, escassas são as informações a respeito da relação das bactérias resistentes a antibióticos com doenças de veiculação hídrica. Essa temática ora negligenciada pelos governos que regem o país, ocasionam o desconhecimento da população frente a uma temática de tamanha importância.

A resistência antimicrobiana ocorre naturalmente ao longo do tempo, geralmente por meio de alterações genéticas, mas o aumento de sua incidência pode ser decorrente de uma série de fatores, tais como o alto consumo de antimicrobianos e seu uso inadequado tanto humano quanto animal (ASLAM et al., 2018). A aplicação de agrotóxicos, herbicidas e antibióticos, por meio de seus efeitos seletivos em diferentes solos e organismos aquáticos, potencializam a resistência bacteriana (STALEY et al., 2014).

Tem-se como principal receptáculo da poluição da indústria, agricultura ou vida doméstica, o ambiente aquático, que oferece um ambiente ideal para a aquisição e disseminação de resistência a antibióticos (CHEN et al., 2017; MARTI; VARIATZA; BALCAZAR, 2014). Pode-se destacar também a falta de informação da população, que por não entender a magnitude da poluição do meio ambiente, acaba despejando resíduos de medicamentos no solo ou na água (SILVA et al., 2020).

Corriqueiramente são encontrados na água, resíduos de antibióticos que segundo Wuijts et al. (2017), são facilitadores para o desenvolvimento do perfil de bactérias com resistência aos antimicrobianos (AMR). De acordo com os autores, esse perfil de resistência pode ser encontrado também nas águas residuárias e fezes, que por muitas vezes estarem em contato direto com as bacias hidrográficas, contaminam e propiciam o contato da população através dos usos múltiplos dessas águas.

A pressão seletiva ocorre em partes, porque o contato repetitivo de bactérias com baixas concentrações de antibióticos favorece a predominância das cepas mais resistentes e, com isso, torna-se frequente o domínio de cepas multirresistentes, principalmente em locais onde é comum o uso de antibióticos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007). Embora as pesquisas não sejam conclusivas, o consumo de água imprópria passou a ser associado a riscos mais elevados de doenças de veiculação hídrica.

De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2014 sobre a vigilância global da resistência antimicrobiana, o aumento crescente de bactérias patogênicas resistentes está colocando em risco a capacidade de tratar doenças comuns, como infecções do trato urinário, pneumonia e infecções generalizadas em todo o mundo, que foram prontamente tratáveis por décadas. Nesse sentido, em termos de saúde pública, a resistência bacteriana representa um risco à qualidade de vida humana conquistada ao longo dos anos com o avanço da microbiologia, das engenharias, da farmácia e da medicina (DA COSTA; SILVA JUNIOR, 2017). De fato, até 2050, o número de mortes por AMR pode ser escalonado para uma pessoa a cada três segundos (O'NEILL, 2016).

Com vistas nessa problemática, a pesquisa (SILVA et al., 2020) e o monitoramento da AMR deve ser prioridade na tentativa de solucionar essa questão emergente que coloca em alerta o mundo inteiro.

Sabe-se da ínfima relação das bactérias com o meio ambiente (água, solo, animal e planta) e sua propagação no mesmo, o monitoramento juntamente com o desenvolvimento de pesquisas sobre as bacias hidrográficas são apontados como grandes alternativas na busca para solucionar os impasses oriundos da presença de bactérias com perfil de resistência nos recursos hídricos. Como mencionam Wuijts et al. (2017), para o cumprimento de um dos objetivos estratégicos do Plano de Ação Global para Resistência aos Antimicrobianos, desenvolvido em 2015 pela OMS, que visa a busca de estratégias para o fortalecimento do conhecimento sobre a vigilância dos microrganismos.

O crescente interesse no controle de patógenos transmitidos pela água em recursos hídricos evidenciado por um grande número de publicações recentes, atesta claramente a necessidade de estudos que sintetizem o conhecimento de vários campos cobrindo aspectos comparativos da contaminação por patógenos, e os unifique em um único lugar, a fim de apresentar e abordar o problema como um todo (PANDEY et al., 2014).

Sabendo que a qualidade da água está diretamente ligada à saúde pública, é fundamental fomentar ações inovadoras e multilaterais de avaliação e pesquisa, que auxiliem a proteção e segurança dos cidadãos e do meio em que vivem. Nesse sentido, o presente trabalho se justifica, pois traça um perfil de presença de *Escherichia coli* (*E. coli*) na água bruta, alertando sobre as doenças de veiculação hídrica, caso a população utilizar a água do lajeado para consumo ou contato primário sem tratamento.

O presente estudo pretende alertar sobre a importância das avaliações de qualidade ambiental, em especial o da água, na premissa de prevenir complicações à saúde pública. Serão

apresentados sequencialmente, neste trabalho, uma revisão da literatura que aborda os conceitos mais relevantes para o entendimento da presente pesquisa, que em linhas gerais são: resistência bacteriana, monitoramento da qualidade microbiológica da água, *E. coli*, resistência adquirida e saúde pública, metodologias para isolamento de *E. coli*, bacia hidrográfica do Rio Várzea e características gerais do município de Frederico Westphalen-RS. Também, o capítulo 1 (manuscrito 1) atenta para a detecção microbiológico na água do Lajeado Pardo, tendo como objeto de estudo bactérias da espécie *E. coli*, utilizando três meios seletivos distintos para isolamento. Ainda nesse capítulo apresentar-se-á a quantificação de coliformes totais e *E. coli* pelo método do número mais provável (NMP) e a realização de dois testes bioquímicos para conferir maior certeza na confirmação de espécie de *E. coli*. Por conseguinte, o capítulo 2 (manuscrito 2) de forma sequencial ao capítulo 1, aborda a resistência a antibióticos das cepas de *E. coli* isoladas no estudo, findando a pesquisa com análise estatística entre meios seletivos, setores e antibióticos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a distribuição quali-quantitativa de bactérias resistentes a antimicrobianos ao longo do Lajeado Pardo abrangido pelo deságue de cinco microbacias, sendo objeto de estudo a bactéria da espécie *E. coli*.

1.1.2 Objetivos Específicos

No tocante da avaliação da presença de bactérias resistentes a antimicrobianos da espécie *E. coli*, o presente estudo tem como objetivos específicos:

- I. Avaliar a presença de *E. coli* ao longo do Lajeado Pardo;
- II. Avaliar o potencial de isolamento de três meios seletivos;
- III. Usar metodologias bioquímicas para caracterização de espécie;
- IV. Comparar o quantitativo de *E. coli* com legislações brasileiras vigentes;
- V. Verificar a suscetibilidade aos antibióticos ampicilina, gentamicina, ciprofloxacina, amoxicilina clavulanato e cloranfenicol nas cepas isoladas.

1.2 HIPÓTESES

As hipóteses para o presente trabalho são assim definidas:

Hipótese 1: Existe presença de *E. coli* nas águas do Lajeado Pardo;

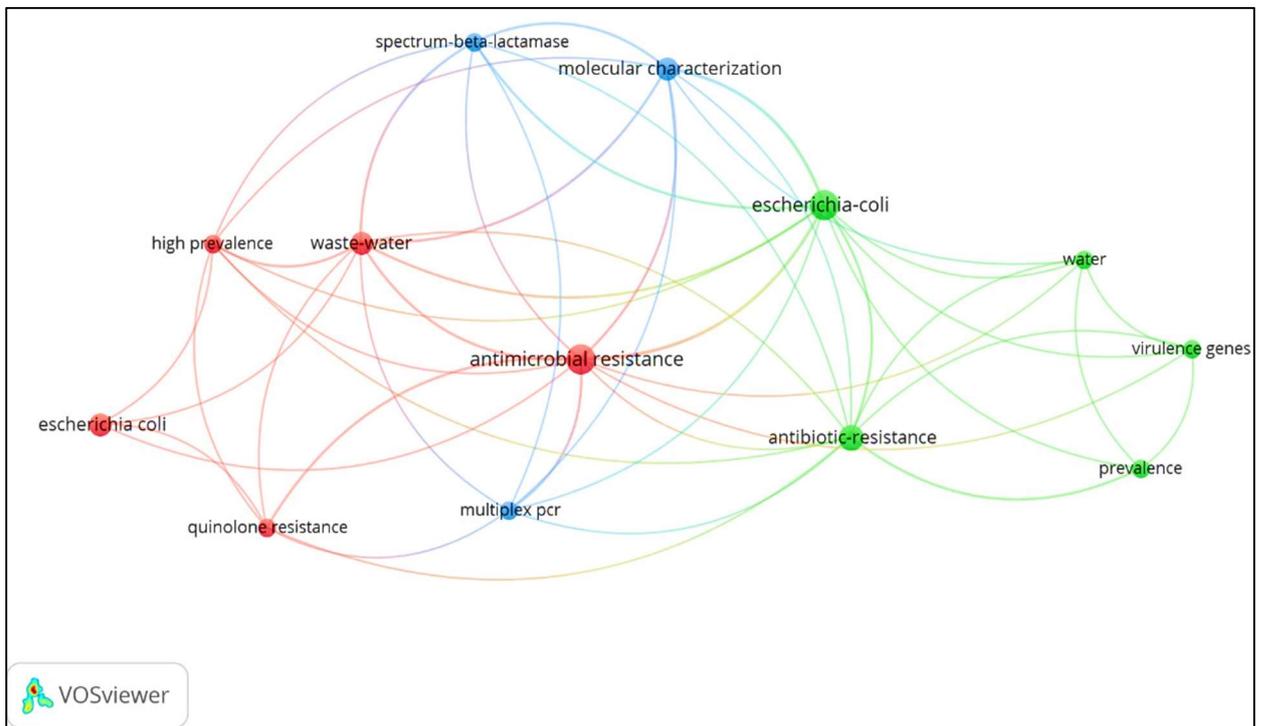
Hipótese 2: As cepas ambientais isoladas das amostras de água do Lajeado Pardo crescerão nos 3 meios seletivos distintos;

Hipótese 3: Existe resistência das cepas ambientais isoladas do Lajeado Pardo, frente a antibióticos conhecidos testados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Essa seção aborda as considerações bibliográficas relacionadas à temática principal desta pesquisa que está ora ligada ao monitoramento, caracterização e identificação de bactérias da espécie *Escherichia coli* (*E. coli*) e seu perfil de resistência aos antibióticos ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, amoxicilina clavulanato e ciprofloxacina. Na busca dos melhores materiais publicados, utilizou-se da ferramenta *VOS Viewer*, sendo o mesmo um software de construção de redes bibliométricas, visualizador de redes gratuitas e de fácil manipulação (VAN ECK; WALTMAN, 2010). Por possuir uma funcionalidade de mineração de textos, foi possível construir e visualizar através de um corpo de literatura científica, redes de co-ocorrência de termos levantados como importantes para o desenvolvimento da presente pesquisa, como mostra a figura 1.

Figura 1 – Mapa da co-ocorrência de publicações em relação aos termos de referência utilizados na revisão da literatura



Fonte: Própria autoria (2021).

2.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A IMPORTÂNCIA DO MONITORAMENTO GLOBAL E SISTÊMICO PARA O CONTROLE

Os antibióticos são consideradas importantes descobertas científicas do século 20 que revolucionaram a medicina veterinária e humana (BILAL et al., 2020). A “era de ouro” dos antibióticos variou dos anos 1930 aos anos 1960, (NATHAN; CARS, 2014), sendo largamente utilizados como destacam Sengupta, Chattopadhyay e Grossart (2013):

Em 1928, a descoberta da penicilina abriu as portas para a era moderna da medicina. Desde então, essas “balas mágicas” transformaram a medicina e salvaram inúmeras vidas. Na década de 1940, foi feita a primeira prescrição de antibióticos. Durante a Segunda Guerra Mundial, a penicilina foi considerado o antibiótico de escolha para controlar infecções bacterianas entre as forças armadas (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013).

Nas décadas que sucederam os promissores antibióticos, vários relatos de resistência à penicilina foram documentados (ASLAM et al., 2018; SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013) e para tanto, foi necessário introduzir novos antibióticos no mercado. Os cientistas logo descobriram os antibióticos β -lactâmicos, ameaçados já em meados de 1968 por microrganismos resistentes, e a vancomicina que entre 1970 e 1980 apresentou os primeiros casos de resistência. Nesse sentido, a descoberta de novos antibióticos foi impactada negativamente pela quantidade de microrganismos resistentes que foram surgindo ao longo dos anos. Em 2013, após aproximadamente 70 anos do primeiro paciente tratado com antibióticos, a infecção bacteriana se mostrou uma séria ameaça à vida (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013), sendo pautada como um problema emergente global (JOHURA et al., 2020; LUCIEN et al., 2021).

As doenças bacterianas que acometem a população mundial são, entre outros motivos, decorrentes do consumo de alimentos *in natura* contaminados, água imprópria para o consumo, insuficiência e carência de saneamento básico, águas de recreação e irrigação. As diversas rotas de transmissão de bactérias, auxiliam constantemente sua transferência e movimento na tríade: animal, ambiente, planta e, conseqüentemente, o aumento das doenças motivadas por fatores ambientais (LARSON et al., 2019).

Nos últimos anos, verificou-se a emergência de bactérias resistentes aos antimicrobianos (AMR, da sigla em inglês para *antimicrobial resistance*). A resistência adquirida pelas bactérias se deve em muitos casos, pelas pressões seletivas sofridas por esses microrganismos quando expostos ao meio ambiente. A pressão seletiva ocorre porque o contato repetitivo de bactérias com baixas concentrações de antibióticos favorece a predominância das cepas mais resistentes e, com isso, torna-se frequente o predomínio de cepas multirresistentes, principalmente em locais onde é comum o uso de antibióticos (ANVISA, 2007). Os antibióticos matam as bactérias

sensíveis, mas permitem que os patógenos resistentes permaneçam, os quais se reproduzem e prosperam por meio da seleção natural.

Embora o uso excessivo de antibióticos seja fortemente desencorajado, ainda há prescrição excessiva em todo o mundo (ASLAM et al., 2018). Apenas no Estados Unidos da América (EUA), mais de 250 milhões de prescrições de antibióticos são realizadas anualmente. Além disso, na China 96 milhões de quilos de antibióticos foram usados em 2007 (CHEN et al., 2021).

Infelizmente, nos países em desenvolvimento, os antibióticos são frequentemente vendidos sem receita, permitindo que as pessoas os comprem e façam uso inadequado no contexto em que se encontram (LUCIEN et al., 2021). Segundo relatório da WHO (2018), o Brasil possui consumo médio de 22,75 doses diárias definidas (DDD) de antibióticos, se comparado aos demais países das Américas, aparece na frente da Bolívia (19,57), Paraguai (19,38), Canadá (17,05). Fica à frente também quando comparada a média geral dos países da Europa (17,9) (WHO, 2018). Nessa perspectiva, Martini et al. (2020) argumentam que o organismo humano assimila de 10 a 50% da dose administrada, o restante acaba sendo excretado pela urina como substância ativa ou metabólito que através da disposição incorreta e diversas rotas de contaminação, podem chegar até os corpos hídricos.

Nesse sentido, o aumento no perfil de resistência aos antibióticos é uma tendência globalizada, gerando maior impacto na América Latina (NEVES et al., 2011), uma vez que a transferência de genes de resistência entre a tríade: humanos, animais e o meio ambiente, foi recentemente relatado em contextos das populações de baixa renda na América Latina (PEHRSSON et al., 2016).

O uso excessivo de antibióticos na saúde e na agricultura colocou os micróbios onipresentes sob constante pressão seletiva (ASLAM et al., 2018; JOHURA et al., 2020). Além de que:

antibióticos são usados de forma imprudente por vários motivos, como contentamento do paciente com a prescrição do médico, informações inadequadas sobre antibióticos, diagnóstico impróprio, charlatanismo especialmente em países em desenvolvimento e pecaminosamente, tentações da indústria farmacêutica para os médicos. Devido à escassez de novos antibióticos, é muito difícil enfrentar essa parte do problema (BIGDELI et al., 2013).

A falta de novos antibióticos, aliada à resistência antimicrobiana frente a antibióticos comumente utilizados, faz com que os médicos sejam forçados a intervir com medicamentos de reserva menos eficazes ou com efeitos colaterais substanciais (JOHURA et al., 2020).

Conforme salientam Bortoloti et al. (2018) e Aslam et al. (2018), as consequências do surgimento de bactérias com AMR são inúmeras, pois as doenças infecciosas causadas por bactérias resistentes implicam em dificuldades na seleção do antibiótico adequado para seu tratamento. Carneiro (2019) salienta que na medicina moderna são inúmeros os casos que necessitam do uso de antibióticos, ou seja, transplante de órgãos, terapia do câncer, tratamento de bebês prematuros ou um excedente de cirurgias de grande porte avançadas. Sem a utilização dos mesmos, não poderia haver um eficaz controle das infecções bacterianas, podendo inclusive, levar a óbito, pacientes com terapia antimicrobiana inadequada. O autor também destaca que o custo financeiro de uma terapia fracassada por conta de microrganismo resistentes, é muito grande, onerando ainda mais os sistemas públicos de saúde.

De acordo com os analistas da *Research and Development Corporation*, uma organização global sem fins lucrativos dos EUA, o pior cenário pode ocorrer no futuro próximo, onde o mundo pode ficar sem agente antimicrobiano potente para tratar infecções bacterianas (ASLAM et al., 2018). Nesse sentido, o economista britânico O'Neill (2016), aponta em seu estudo que até 2050, dez milhões de óbitos anuais serão atribuídos à AMR, isso irá levar mais pessoas a óbito do que às doenças mais fatais (acidentes de carro, tipos de neoplasia, sarampo, diabetes, cólera, entre outros) acometem atualmente. Além de que, o impacto para a economia global será de aproximadamente 100 trilhões de dólares entre 2016 e 2050.

Segundo Keiji Fukuda, diretor-geral assistente da OMS para segurança da saúde, “sem uma ação urgente e coordenada, o mundo caminha para uma era pós-antibióticos, na qual infecções comuns que são tratáveis há décadas podem mais uma vez matar” (WUIJTS et al., 2017, p. 175). As consequências são que as clínicas hospitalares se deparam diariamente com desafios terapêuticos advindos da presença de bactérias resistentes a antibióticos (ASLAM et al., 2018; BORTOLOTTI et al., 2018). Dessa forma, a AMR constitui um enorme desafio a consecução da cobertura mundial de saúde e ameaça progressos obtidos em muitos dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), como os da saúde, segurança alimentar, água potável e saneamento, consumo e produção responsável, pobreza e desigualdade (WHO, 2019).

Desse modo, os altos níveis de AMR encontrados, indicam a necessidade de pesquisas adicionais para identificar as origens da contaminação ambiental, uso indevido ou descarte inadequado de antibióticos (LARSON et al., 2019) que impulsionam cada vez mais o surgimento de cepas resistentes.

A AMR em bactérias patogênicas é um sério problema de saúde pública e é muito relevante estabelecer o papel do meio ambiente na transmissão das bactérias com perfil de

resistência (BORTOLOTTI et al., 2018; HUIJBERS et al., 2015; LARSON et al., 2019) para prevenir o surgimento de novas cepas resistentes e a disseminação das já existentes para os humanos (IWU; OKOH, 2020; LARSON et al., 2019).

O tema se tornou tão relevante que em 2015 foi realizado em Lisboa o 18º Simpósio de Microbiologia da Água Relacionada à Saúde. Na ocasião, segundo Wuijts et al. (2017) foi discutido pelos cientistas e autoridades o papel do meio ambiente para a disseminação da resistência antimicrobiana, com relação, principalmente a resistência a antibióticos, visto que, mecanismos de resistência são estratégias de defesa que os microrganismos desenvolvem para ajudá-los a sobreviver e evitar os efeitos dos antibióticos. Nesse sentido, dados de ocorrência e prevalência para esses microrganismos no ambiente são necessários para o desenvolvimento e implementação da avaliação de risco e estratégias de gerenciamento de risco para resistência antimicrobiana relacionada à saúde.

Segundo Pires et al. (2009), é de extrema importância a formulação de estratégias para intervenção da proliferação das infecções intratáveis causadas pelas bactérias com AMR, podendo também discernir a fração da carga total de doenças atribuíveis às diferentes fontes de transmissão: animal, alimentos ou o ambiente. Colaboram com esse argumento, Larson et al. (2019), onde mencionam que a epidemiologia dos microrganismos resistentes a antibióticos no que toca homem, animal e ambiente, envolve uma complexa relação imprevisível tanto ao que dita as rotas de transmissão de bactérias resistentes, quanto ao impacto da pressão seletiva de antibióticos nesses reservatórios.

Um estudo abrangente realizado por Hendriksen et al. (2019) aponta que Vietnã, Índia e Brasil têm a distribuição de genes de resistência a antibióticos mais divergente entre os 60 países estudados, sugerindo esses três países como possíveis pontos críticos para o surgimento de novos mecanismos de resistência a antibióticos.

Nesse sentido, muitas organizações, governanças e cientistas estão se mobilizando para buscar soluções para o problema da AMR no mundo. Pode-se citar o Programa *Sentri* de Vigilância Antimicrobiana (*Antimicrobial Surveillance Program*), que é o estudo de vigilância carro-chefe da JMI Laboratories que está em andamento desde seu estabelecimento em 1997, monitorando patógenos no mundo inteiro, bem como monitorando as mudanças nos padrões de resistência e desenvolvendo novos medicamentos que quando aprovados, são monitorados pós-comercialização.

Em 2015 foi criado o Plano de Ação Global sobre AMR, sendo o mesmo baseado no conceito de Saúde Única (*One Health*, em inglês), que pressupõe a relação entre saúde humana, animal e ambiental e propõe uma integração entre as diferentes áreas do conhecimento para

solucionar os problemas de saúde (BRASIL, 2018a). Na ocasião, o Brasil apoiou a adoção de metas graduais de implementação dos planos nacionais para o combate da AMR e a priorização das ações de acesso a medicamentos como estratégia fundamental para assegurar uma abordagem integral e efetiva do problema (ESTRELA, 2018).

Outra ação pensada no intuito da vigilância da AMR foi a criação da Plataforma de Informação de Saúde para as Américas (PLISA) que monitora a AMR de 20 países (inclusive o Brasil) da América Latina, através da Rede Latino Americana de Vigilância da Resistência a Antimicrobianos (ReLAVRA). Segundo dados levantados por essa rede, entre 2000-2014 *E. coli* (853.127), *Staphylococcus* ssp. (552.014) e *Klebsiella* spp. (222.122) foram as bactérias isoladas com maior frequência pela ReLAVRA nos países de abrangência, sendo que ao todo foram isoladas 2.632.041 bactérias. Essa plataforma disponibiliza várias análises estatísticas sobre o comportamento da AMR em cada país, apontando por exemplo quais os hospitais e estados cadastrados para a realização do monitoramento da AMR, a classificação do surto: nosocomial ou comunitário. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), atualmente a ReLAVRA é uma das maiores e mais antigas redes regionais de vigilância AMR do mundo (OPAS, 2015).

Conforme relatórios disponibilizados pelo ReLAVRA, no Brasil o único estado participante ao que tange o monitoramento da AMR é o Paraná (OPAS, 2015). Para o Brasil, as bactérias monitoradas e classificadas com perfil de resistência nos relatórios estatísticos do ReLAVRA, apontam apenas algumas espécies (*Salmonella* ssp., *Staphylococcus* ssp., *Shigella* ssp., *Pseudomonas* ssp.), sendo que as cepas de *E. coli* isoladas nos hospitais cadastrados no país, não apresentaram indícios de perfil de resistência (OPAS, 2015).

Todavia, em relação a América Latina, segundo OPAS (2015), *E. coli* foi a bactéria mais frequente nas análises anuais, mostrando assim, a importância do seu estudo e do monitoramento globalizado. Também, os dados apresentados nessa plataforma direcionam olhares peculiares frente as subnotificações de casos confirmados e os respectivos agentes etiológico, porém, a distribuição global dessas doenças infecciosas associadas à água e fatores subjacentes permanecem amplamente inexplorados (YANG et al., 2012).

No Brasil, muito tem-se a avançar nas questões voltadas à AMR, uma vez que essa problemática ainda carece de entendimento e por consequência medidas de enfrentamento no país. Em 2018, o Ministério da Saúde (MS) criou um Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN BR) (BRASIL, 2018a) que enfatiza em seu terceiro objetivo o fortalecimento e ampliação de pesquisas de inovação e prevenção de infecções e AMR. Os setores envolvidos no desenvolvimento desse

Plano: Ministério da Saúde (MS), Fundação Nacional de Saúde (Funasa), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Ministério da Educação e Cultura (MEC), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico (ANA).

Nessa vertente de atender às exigências do PAN-BR 2018, pode-se citar a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC), RDC nº 471, de 23 de fevereiro de 2021 que dispõe sobre os critérios para a prescrição, dispensação, controle, embalagem e rotulagem de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos de uso sob prescrição, isoladas ou em associação, listadas em Instrução Normativa (IN) específica (BRASIL, 2021b). A IN referida é a nº 83, de 23 de fevereiro de 2021 (BRASIL, 2021b) que define a lista de substâncias classificadas como antimicrobianos de uso sob prescrição, isoladas ou em associação, de que trata a RDC nº 471 de 2021. Logo, percebe-se que tanto a RDC quanto a IN dão luz às premissas de proibição generalizada de antibióticos sem prescrição médica, na tentativa de diminuir os índices de antibiótico usados inadequadamente e que posteriormente estarão presentes do meio ambiente.

No entanto, nota-se com frequência uma relação de descaso com a temática ora abordada, pois verificando a Agenda de Prioridades de Pesquisa do MS, que teve sua última versão lançada em 2018, a mesma faz apenas menção as pesquisas que visam estudar a avaliação do impacto social e/ou econômico AMR no Brasil (BRASIL, 2018b). Isso demonstra que o país não incentiva com sagacidade uma temática que demanda, por todos os seus aspectos e dimensões, às diligências cabíveis, tão pouco prioriza suas próprias recomendações elencadas para formular o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da AMR no Âmbito da Saúde Pública.

Diante disso, Wuijts et al. 2017, argumentam a necessidade de uma abordagem pragmática para tornar a prevenção e o controle da AMR acionáveis, acessíveis e comparáveis para todos os países do mundo. A pesquisa deve estar à frente da vigilância da AMR, uma vez que é através dela que o monitoramento sistêmico é possível, bem como diagnose e criação de novas tecnologias capazes e eficazes de solucionar essa problemática.

É importante que os esforços da saúde pública estejam envolvidos em pesquisas para o entendimento da causa dessas doenças e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de meios técnicos para um resultado mais preciso na identificação de agentes etiológicos (PADILHA, 2016). Além de que, culturas de vigilância e a precoce detecção de isolados com fenótipo

multirresistente poderão contribuir para um controle epidemiológico efetivo, evitando a instauração de novos surtos (NEVES et al., 2011).

Somente uma abordagem multisetorial que implemente programas, políticas, legislações e pesquisas, permitirá que os diversos setores e partes integrantes envolvidas na saúde humana, terrestre, aquática de animais e plantas, produção de alimentos e rações e meio ambiente se comuniquem e trabalhem juntos (MIRANDA et al., 2020) para alcançar um controle efetivo da AMR.

2.2 O PAPEL DO AMBIENTE AQUÁTICO PARA A DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E A IMPORTÂNCIA DO SEU MONITORAMENTO

A água é um elemento essencial à vida de todas as pessoas e sua qualidade deve sempre ser preservada para garantir o sustento da vida na terra para as presentes e às futuras gerações. Em 2010, a Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU) por meio da resolução nº 64/292 reconheceu o direito à água potável e limpa como essencial para o pleno gozo da vida de todos os direitos humanos (ONU, 2010), onde todos os países signatários, e nele encontra-se o Brasil, têm a obrigação de respeitar, proteger e cumprir a realização desse direito, criando todas as condições para a sua efetivação (CONTI; SCHROEDER, 2013). Entretanto, inexistente um documento formal que tenha sido ratificado por todos os países do mundo e que reconheça a água como direito humano, porém não há óbice para o reconhecimento tácito desta condição (LUZ; MAZZARINO; TURATTI, 2016) pois é um elemento essencial a vida de todas as pessoas.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento humano, o crescimento populacional e as mudanças climáticas, exerceram pressões diversas sobre a qualidade e a quantidade dos recursos hídricos que podem, por sua vez, impactar as condições que promovem doenças associadas à água (YANG et al., 2012). Atualmente o mundo enfrenta um dos maiores problemas de saúde pública devido à inacessibilidade de água natural e livre de contaminação por microrganismos (BILAL et al., 2020). Infelizmente, 29 países não possuem água doce para toda população e, segundo a ONU, em 2050 esse número aumentará para mais de 50 países, sendo a contaminação dessas águas o principal fator que conduz a esses resultados (PADILHA, 2016).

Atualmente, mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo não têm acesso a água potável, e uma diversidade de surtos de veiculação hídrica causados por patógenos é relatada em nações em todos os níveis de desenvolvimento econômico (WANG et al., 2017). Em muitos

países, a má qualidade da água representa uma grande ameaça à saúde humana e os acessos à água potável e saneamento adequado continuam a ser um grande freio ao desenvolvimento (ROCHELLE-NEWALL et al., 2015).

No cenário global, é possível perceber que muitos países carecem de acesso a água doce para a população, e aos países que possuem esse recurso, as contaminações da água constituem um fator negativo, uma vez que impossibilitam a utilização desses mananciais de forma segura. Nos últimos anos foram detectados vários surtos de doenças infecciosas e parasitárias relacionadas a patógenos presentes na água consumida pela população mundial, com isso cada vez mais esse tema tem chamado a atenção de pesquisadores e governos (PARK et al., 2018). Porém, conforme José Figueras e Borrego (2010), os surtos de origem hídrica detectados são considerados apenas a ponta do iceberg de todas as doenças relacionada à água potável que ainda podem ser detectados ao redor do mundo.

De várias maneiras, a água pode afetar a saúde humana, seja por ingestão direta ou na preparação de alimento, pelo seu uso na higiene pessoal, agricultura, indústria ou lazer (BRASIL, 2013a). O contato direto ou indireto com água (para beber, para uso recreativo, agricultura ou alimentação) contaminada por organismos com AMR pode prejudicar e infectar a população humana com patógenos resistentes a antibióticos (CHEN et al., 2017). A água, inclusive aquela tratada para consumo humano, é um importante veículo para a disseminação da AMR (WALL et al., 2016). Esse elemento vital a vida, não é apenas consumido diretamente por humanos e animais, mas é usado para irrigação de plantações que são consumidas por humanos ou usadas como ração animal (FINLEY et al., 2013).

Tudisi, Galizia e Matsumura-Tundisi (2011), afirmam que a presença de bactérias como *Shigella* ssp., *Salmonella* ssp., *Campylobacter* ssp. e *E. coli* ssp., na água se deve em função de descargas de esgotos domésticos, por contribuição de pessoas e animais infectados, animais em regiões de intensa atividade pecuária (gado, aves, suínos) ou por animais silvestres (BILAL et al., 2020; MAHMOOD; AL-HAIDERI; HASSAN, 2019).

As águas superficiais são os melhores sumidouros para várias fontes pontuais e difusas de poluição, tais como águas residuais de processos agrícolas e industriais, escoamento de tempestades, entre outros (OLASOJI et al., 2019; WANG et al., 2017). Na ausência de instalações de saneamento e esgotos eficazes que isolem as fezes humanas do meio ambiente, os microrganismos fecais humanos podem se espalhar para os campos e águas ambientais (ERCUMEN et al., 2017).

Tem-se como grande problemática as fezes humanas, que por não serem devidamente tratadas acabam entrando em contato com as águas que posteriormente servirão de

abastecimento para a população. Nesse aspecto, o estudo de Peres (2011), menciona que os microrganismos atingem a água através das excretas de humanos ou outros animais infectados e, a água ao ser ingerida ou utilizada no preparo de alimentos, quando não devidamente tratada, pode causar distúrbios gastrointestinais.

Além do contato direto dos resíduos de antibióticos com o meio ambiente, vários outros fatores contribuem para a ocorrência da contaminação microbiana da água, tais como a aproximação das habitações humanas ao entorno de rios e riachos. Assim decorre que muitas vezes essa população não conta com tratamento das águas residuais, potencializando o risco de contaminação fecal na água e, por consequência, elevando o risco de contaminação por outros patógenos. Segundo Rochelle-Newall et al. (2015), tem-se ainda a precarização da água que chega para as comunidades a jusante, que ora contaminadas são por vezes utilizadas para os mais diversos usos, indo da evacuação dos resíduos, banhos e consumo humano.

Além da problemática das contaminações dos mananciais de água por via fecal humana e suas possíveis consequências para a saúde pública, as fezes humanas podem levar vestígios de antibióticos consumidos anteriormente, bem como a presença de microrganismos resistentes a antibióticos, tido como um problema de saúde pública emergente global. Isso pode contribuir de maneira substancial para o surgimento e disseminação das bactérias resistentes no meio ambiente, incluindo a contaminação de lagos e córregos por falta de barreiras e proteção, causando assim a contaminação dos recursos hídricos (BORTOLOTTI et al., 2018).

Nesse sentido, a água demonstra ser uma importante via de transmissão de bactérias patogênicas para humanos (BILAL et al., 2020; FINLEY et al., 2013; SZYMANSKA et al., 2019; WALL et al., 2016). O uso de água recreativa também foi associado à exposição de bactérias AMR (LEONARD et al., 2015), pois segundo Patel et al., (2016) nas áreas adjacentes aos rios, as chances de risco de infecção para a população humana são altas, pois os microrganismos potencialmente patogênicos da camada de sedimentos são ressuspensos durante as atividades recreativas.

Apesar da importante descoberta dos antibióticos e de seus inúmeros benefícios para a medicina humana e animal, atualmente esses fármacos são considerados poluentes ambientais emergentes devido a sua administração massiva em humanos e animais e maior persistência ambiental (BILAL et al., 2020). Os autores ainda destacam que as moléculas de antibióticos parentais ou seus metabólitos são descarregados no ambiente aquático permitindo a contaminação ecológica, bem como no surgimento de resistência aos antibióticos (BILAL et al., 2020; MAHMOOD; AL-HAIDERI; HASSAN, 2019).

As preocupações em relação a fonte, ocorrência e consequências dos antibióticos ou de seus resíduos ativos em ambientes aquáticos aumentaram (BILAL et al., 2020). Diante disso, vários estudos demonstram a presença de antibióticos nos corpos d'água amostrados. Traços de ciprofloxacina ($3 \mu\text{g L}^{-1}$) foram relatados no rio Tejo na Espanha (VALCÁRCEL et al., 2011), já em estudo realizado na China a quantidade de ciprofloxacina encontrado era substancialmente maior ($653 \mu\text{g L}^{-1}$) (PENG et al., 2008). Estudos realizados para inspecionar vestígios de antibióticos na água potável na cidade de Bagdá, capital do Iraque, encontraram ciprofloxacina ($1,312 \mu\text{g L}^{-1}$) e amoxicilina ($1,50 \mu\text{g L}^{-1}$) (MAHMOOD; AL-HAIDERI; HASSAN, 2019).

No Brasil, Monteiro (2018) analisou resíduos de antimicrobianos em águas do estado do Rio de Janeiro, sendo que Amoxicilina, cefalexina, troleandomicina e sulfametoxazol foram encontrados em águas de superfície acima de $25,1 \text{ ng L}^{-1}$. Locatelli et al. (2011) realizaram estudo na bacia do Rio Atibaia, São Paulo e encontraram concentrações máximas de amoxicilina (1280 ng L^{-1}), cefalexima (2420 ng L^{-1}), ciprofloxacina (119 ng L^{-1}), norfloxacino ($149,72 \text{ ng L}^{-1}$), tetraciclina (11 ng L^{-1}) em águas de superfície. Jank et al. (2014) analisaram água de superfície em quatro pontos de amostragem localizados no Arroio Dilúvio em Porto Alegre, no estado do Rio Grande do Sul e constataram uma concentração de 592 ng L^{-1} de azitromicina.

A saúde pública está intrinsicamente ligada a água consumida pela população, desse modo, às impurezas que permeiam os mananciais de água doce são refletidos nos altos índices de internação por doenças de veiculação hídrica que acometem milhares de pessoas no mundo. Segundo dados fornecidos pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), sem generalizações, perto de metade de todas as pessoas nos países em desenvolvimento sofrem de problemas de saúde devidos a más condições de água e saneamento (PNUD, 2006). Assim como Chia et al. (2020) salientam, quando dizem que o ambiente aquoso pode servir como reservatório para infecções humanas, com sequelas significativas (por exemplo, artrite reativa, síndrome do intestino irritável, predisposição ao câncer, etc.) (JOSÉ FIGUERAS; BORREGO, 2010).

Considerando os riscos conhecidos associados ao consumo de água contaminada, é fundamental que os fatores que controlam a persistência e disseminação desses patógenos microbianos sejam identificados (ROCHELLE-NEWALL et al., 2015).

O monitoramento da qualidade da água tem o potencial de servir como um mecanismo de feedback crítico para apoiar o desenvolvimento e operação de fontes de água potável que promovam a saúde pública (TRENT et al., 2018). Por esses motivos, destaca-se que as

restrições de recursos, que limitam os testes de laboratório, em muitos casos, estão relacionadas com as restrições de recursos que limitam a segurança da água (BROWN; BIR; BAIN, 2020).

Nesse aspecto é importante atentar para os casos de consumo da água bruta sem nenhum tipo de tratamento, através de irrigação, consumo animal, contato primário em recreação. Por outro lado, apesar da água, em muitos casos, passar por algum tipo de tratamento antes de ser consumida pela população, existe um risco associado à água potável conter bactérias com perfil patogênico e vírus, como exemplo o norovírus (GALL, A. M et al., 2015). Ademais, algumas bactérias podem resistir à cloração da água e formarem biofilmes, que podem contaminar as tubulações pós tratamento. Ou ainda, as bactérias podem estar presentes na água após o tratamento por problemas nas tubulações que fazem o transporte da água até a casa do consumidor.

Devido as problemáticas mencionadas, a qualidade da água deve ser pensada não apenas no padrão da água tratada que chega na casa do consumidor, mas sim, nos padrões da água bruta advindas dos mananciais subterrâneos ou superficiais visto que, por estarem poluídos e contaminados nem sempre o tratamento básico da água retira todas as impurezas necessárias para a garantia de segurança hídrica à população. Segundo José Figueras e Borrego (2010), é necessário que se viabilizem medidas específicas para proteger a água bruta usada para consumo, bem como para produzir água potável.

O monitoramento da água bruta é importante, pois a irrigação nos ambientes rurais está atrelada a esses mananciais de água, que por estarem contaminados, podem desencadear uma via de transmissão de patógenos para a cadeia agrícola e de alimentos. O uso da água de superfície para recreação e consumo humano tem aumentado com o ritmo e a extensão da urbanização, tornando a análise microbiana desses recursos hídricos uma parte essencial da qualidade da água e da saúde humana (JIN et al., 2018).

O conhecimento a respeito do crescimento de microrganismos no meio ambiente é de extrema importância para o desenvolvimento dos planos de segurança da água, pois os patógenos sobrevivem e se reproduzem em ambientes naturais (VITAL et al., 2010).

O monitoramento e a avaliação da qualidade das águas superficiais e subterrâneas são fatores primordiais para a adequada gestão dos recursos hídricos, permitindo a caracterização e a análise de tendências e prospecções de cenários para as bacias hidrográficas, sendo essenciais para garantir a implantação dos diferentes instrumentos de gestão apresentados na lei (ANA, 2012).

2.3 *Escherichia coli* COMO AGENTE ETIOLÓGICO NA DISSEMINAÇÃO DE DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA

As doenças transmitidas pela água são causadas tipicamente por bactérias entéricas devido as contaminações fecais. Além disso, a maioria das bactérias coliformes também pode existir amplamente no ambiente natural, incluindo solo (ANVISA, 2013), águas superficiais e, até certo ponto, nas águas subterrâneas. Bactérias coliformes normalmente existem no trato intestinal de animais de sangue quente e humanos, e são eliminadas através da matéria fecal (BRASIL, 2017; PATEL et al., 2016)

Nesse sentido, a identificação de todas essas bactérias seria tarefa muito difícil e demorada, pois o monitoramento das bactérias é realizado com microrganismos indicadores de contaminação fecal, visto que as fezes são fontes de bactérias patogênicas. Logo, as diretrizes e regulamentos para águas recreativas e potável seguras exigem a determinação da ausência ou limite máximo de microrganismos indicadores (BRASIL, 2013b, 2017; DESHMUKH et al., 2016; PATEL et al., 2016; PERES, 2017).

Por definição, as bactérias coliformes são anaeróbias facultativas, bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, em formato de bastonete que fermentam lactose com produção de ácido em 24 a 48 h a 36 °C (JOSÉ FIGUERAS; BORREGO, 2010).

E. coli é uma bactéria indicadora fecal (FIB) utilizada como principal representante desse grupo, por ser ora a representante exclusiva de origem fecal (é um habitante normal do trato intestinal inferior de animais de sangue quente e humanos) e sua presença está geralmente associada à presença de outros patógenos (CIMA FONTE et al., 2020; KOUADIO-NGBESSO et al., 2019; PERES, 2017). Ou seja, a presença de *E. coli* na amostra de água, indica que há possibilidade de haver outros microrganismos intestinais de natureza saprófita, comensal e parasita, sejam bactérias, vírus, protozoários ou vermes em geral, veiculadores das doenças transmitidas pela água (MORETO, 2010).

E. coli é uma bactéria gram-negativa do gênero *Escherichia*, identificada pela primeira vez em 1885 pelo pediatra e bacteriologista alemão Theodor Escherich, sendo uma bactéria em forma de bastonete (CIMA FONTE et al., 2020). *E. coli* (Filo: Proteobacteria, Classe: Gammaproteobacteria, Ordem: Enterobacteriales, Família: *Enterobacteriaceae*, Gênero: *Escherichia*) é um habitante normal do trato intestinal inferior de animais de sangue quente e humanos (KOUADIO-NGBESSO et al., 2019; PERES, 2017). Essas bactérias obedecem a todos os critérios utilizados para definir os coliformes totais e inclusive crescem e fermentam a lactose com produção de ácido a 44,5 °C no período de 24 horas e assim são classificadas como

termotolerantes (WHO, UNICEF, 2005), são catalase positivas, sendo bactérias neutrofílicas, proliferando melhor em potencial hidrogeniônico (pH) neutro, mas sobrevivem em solos, água e em alimentos ácidos por serem capazes de gerar compostos básicos a partir da degradação de aminoácidos (ANVISA, 2013).

Desde seu isolamento e caracterização em material fecal realizado no final do século 19, esta bactéria vem servindo de principal referencial para os estudos relacionados com doenças transmitidas pela água (BRASIL, 2013a).

No final da década de 1950 e início da década de 1960, a resistência aos antibióticos a múltiplos agentes antimicrobianos foi detectada, pela primeira vez, entre bactérias entéricas, nomeadamente *Salmonella* ssp., *Shigella* ssp. e *E. coli* ssp. (ASLAM et al., 2018). Somente em 1945 foi reconhecido o potencial enteropatogênico da espécie *E. coli*, uma vez que essa bactéria foi associada com a doença diarreica infantil (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007), pois possuem fímbrias ou adesinas que permitem a sua fixação, impedindo o arrastamento pela urina ou diarreia (ANVISA, 2013).

Geralmente, as cepas de *E. coli* que colonizam o intestino humano são comensais inofensivos. No entanto, dentro da espécie, existem cepas totalmente patogênicas que causam síndromes de doenças diarreicas porque possuem fatores de virulência, como enteroadesinas ou enterotoxinas (LECLERC et al., 2001).

Para que ocorra uma doença é necessário um agente patogênico que parasite um hospedeiro e por meio de ocorrências complexas tais como: a virulência do patógeno, capacidade de adaptação, idade do hospedeiro, condições sócio econômicas, resistência, hábitos de higiene e predisposição genética, para que possa desenvolver, multiplicar e propagar em um determinado ambiente (MORETO, 2010).

Segundo Aslam et al. (2018), a via fecal-oral é a via de transmissão mais importante, especialmente para patógenos resistentes da família *Enterobacteriaceae*, geralmente devido a falha de saneamento. Os patótipos de *E. coli* (enteropatogênicos e enterotoxigênicos) foram identificados entre os patógenos mais responsáveis pela diarreia moderada a grave em países de baixa e média renda (NAVAB-DANESHMAND et al., 2018).

E. coli patogênicas são transmitidas de fezes humanas ou animais infectados para novos hospedeiros suscetíveis, por meio de reservatórios ambientais: solo e água, bem como as mãos. Essa espécie é considerada um patógeno oportunista que pode sobreviver bem em ambientes aquáticos, sendo *E. coli* altamente adepta da transferência horizontal de genes, que é considerada o vetor para a disseminação da resistência a antibióticos (CHEN et al., 2017; MAAL-BARED et al., 2013).

E. coli é genericamente categorizada em linhagens particulares como: *E. coli* comensal (colonizadores intestinais não-patogênicos), *E. coli* patogênica intestinal ou enteropatogênica (categorias diarreioagênicas) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) (COSTA, 2013).

Existem pelo menos cinco linhagens de *E. coli* diarreioagênica, àquelas que causam infecções intestinais ou entéricas nos seres humanos, que são veiculadas pela água ou alimentos, sendo elas: *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M.B, 2014).

Segundo o Manual de Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Clínica redigido pela ANVISA (2013), as amostras de *E. coli* que causam diarreia e doenças de veiculação hídrica pertencem aos grupos das ETEC, EHEC e EIEC. Os surtos por EHEC são os que geram maior preocupação devido à severidade dos quadros clínicos e potenciais sequelas resultantes das infecções (ANVISA, 2013). As linhagens enteropatogênicas podem causar diarreia aguda e a transmissão pela água têm sido documentadas para águas de recreação e água potável contaminada (PERES, 2011).

Alguns sorovares de *E. coli* produzem toxinas conhecidas como shiga-toxinas, sendo que *E. coli* produtoras dessas toxinas são conhecidas como *E. coli* produtoras de toxinas shiga (STEC) que abrange *E. coli* enterohemorrágica. As shiga-toxinas podem ser do tipo 1 ou 2 (Stx 1 e Stx 2, respectivamente). Algumas cepas de EHEC possuem ainda a presença do plasmídeo PO157, que produz adesinas fimbriais e afimbriais, que garantem maior patogenicidade à bactéria, bem como codificam a hemolisina e as enzimas catalase e peroxidase (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Na infecção por *E. coli* enterohemorrágica pode haver a evolução do quadro clínico para a Síndrome Urêmico-Hemolítica, causada por *E. coli* O157: H7 quando se adere às microvilosidades intestinais e leva a uma insuficiência renal e anemia hemolítica, que pode causar à morte do paciente (CDC, 2013) e foi responsável pela produção de vários surtos ligados a água (PERES, 2017; SCHETS et al., 2005).

As cepas patogênicas têm sido associadas a várias doenças que tem como sintomas diarreia, infecções do trato urinário e meningite (ISHII; SADOWSKY, 2008). Um grupo que é de preocupação especial na medicina humana são as *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase de espectro estendido, identificadas pela Organização Mundial de Saúde como sendo uma "prioridade crítica" para a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (WHO, 2017). Algumas Enterobactérias, e nesse grupo se inclui a *E. coli*, podem produzir enzimas chamadas beta (β)-lactamases de espectro estendido (ESBL), que são enzimas que conferem

resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos, incluindo penicilinas e cefalosporinas (SAEEDI et al., 2017).

A resistência generalizada a novas gerações de cefalosporinas é amplamente atribuída à disseminação de β -lactamases de espectro estendido em bactérias gram-negativas, especialmente em *E. coli* (JOHURA et al., 2020), além do gene *mcr-1* que codifica a resistência aos medicamentos da colistina (VOULGARI et al., 2013). O grupo dos antibióticos carbapenêmicos são um dos poucos antibióticos remanescentes que podem tratar ESBL produzidos pelas bactérias, mas algumas *Enterobacteriaceae* podem produzir uma enzima chamada carbapenemase permitindo a resistência ao grupo dos carbapenêmicos, penicilinas e cefalosporinas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

Após a descarga no meio ambiente através de fezes e águas residuais, *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (isto é, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp.) e *Enterococcus* spp. podem ser altamente prevalente no solo, plantas e águas superficiais e podem, portanto, representar um risco para a saúde humana (BEN SAID et al., 2015).

Em alguns casos, mesmo a água sendo tratada, surtos de doenças de veiculação hídrica são associados *E. coli* e outras bactérias presentes na água, assim como apontam Vital et al. (2010), onde demonstraram em seu estudo o potencial de crescimento tanto de *E. coli* O157:H7 como *Pseudomonas aeruginosa* em águas coletadas de plantas de tratamento especialmente após o tratamento por ozonização.

Um dos pressupostos básicos relacionados com o conceito de saúde coletiva é o contínuo monitoramento da qualidade microbiológica de águas, visando impedir os ciclos ou cadeias de transmissão de doenças por via hídrica (BRASIL, 2013a).

Entretanto, embora a relação entre qualidade da água e saúde seja evidente, existe ainda uma grande lacuna no Brasil no que se refere a estudos que subsidiem uma avaliação precisa dos múltiplos fatores intervenientes nessa relação e suas particularidades socioeconômicas, culturais e ambientais (BRASIL, 2013a). Portanto, verifica-se a ausência de planos de ação que acarretam na falta de estudos sistemáticos sobre a qualidade microbiana da água de escoamento superficial de bacias hidrográficas com usos mistos do solo (LIANG et al., 2013).

Diante disso, surge um grande problema, pois a identificação de bactérias patogênicas é complexa e por isso, não existe nenhuma prova bioquímica que possa, seguramente, distingui-las entre si ou de outros tipos de *E. coli* pertencentes à flora normal do intestino (ANVISA, 2013). Com isso é possível perceber, como se torna difícil identificar e isolar sorovares de *E. coli* do ambiente que possuem importância clínica e que podem futuramente desencadear problemas para a saúde pública.

As cepas diarreio gênicas de *E. coli* são identificadas através de métodos moleculares, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos, ou métodos para verificação da produção de toxinas, realizadas somente em laboratórios de referência ou de pesquisa (ANVISA, 2013), não sendo exigidos em portarias de monitoramento e qualidade de água para recreação, irrigação ou consumo humano no Brasil.

2.4 CENÁRIO BRASILEIRO DA QUALIDADE DA ÁGUA, SURTOS DE DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA RELACIONADOS A *Escherichia coli* E LEGISLAÇÕES CORRELATAS

Em 2010 a Assembleia Geral da ONU reconheceu, explicitamente, por meio da Resolução nº 64/292, o acesso à água potável para consumo humano e ao esgotamento sanitário, como condicionantes do pleno desfrute dos outros direitos (ONU, 2010). A ANA regulamenta no Brasil o uso da água e promove ações de recuperação e preservação de Bacias Hidrográficas (BRASIL, 2019a). Por ser a água um bem de domínio público, a ANA e os órgãos gestores estaduais são os responsáveis por regular o seu acesso, promovendo o uso múltiplo e sustentável em benefício das atuais e das futuras gerações. Para isso há uma Política Nacional de Recursos Hídricos (ANA, 2019).

Em 2013, a ANA criou a Rede Nacional de Monitoramento de Qualidade das Águas (RNQA), cujo objetivo é otimizar, ampliar e aperfeiçoar as redes de monitoramento de qualidade de água das unidades federativas (UFs), padronizando o monitoramento e melhorando a qualidade dos dados, gerados no país (ANA, 2019).

Sobre as medidas de enfrentamento de doenças de veiculação hídrica no Brasil, tem-se o SISAGUA (Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano), um instrumento da Vigilância da Qualidade da Água (VIGIAGUA), que tem como finalidade auxiliar o gerenciamento de riscos à saúde a partir dos dados gerados rotineiramente pelos profissionais do setor da saúde (vigilância), responsáveis pelos serviços de abastecimento de água (controle) e da geração de informações em tempo hábil para planejamento, tomada de decisão e execução de ações de saúde relacionadas à água para consumo humano (BRASIL, 2021c).

Neste sentido, o Programa QUALIÁGUA (Programa de Estímulo à Divulgação de Dados de Qualidade de Água) foi lançado visando a assinatura de contratos entre a ANA e as UF's de modo que estas, recebam recursos financeiros como forma de incentivo à produção de dados de qualidade de água, visando assim o aprimoramento da gestão dos recursos hídricos (ANA, 2019).

O Índice de Qualidade das Águas (IQA) é um índice que expressa a qualidade geral da água no rio quando comparada a qualidade requerida para o abastecimento público após tratamento convencional e converte nove parâmetros de qualidade da água em um índice de fácil entendimento. Todavia, no último relatório gerado pela ANA sobre IQA nas águas superficiais do país, vê-se a defasagem de dados, uma vez que são inclusos 9 parâmetros de análise: temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), colimetria, nitrogênio total, fósforo total, sólidos totais e turbidez (ANA, 2019), entretanto os coliformes termotolerantes não estão presentes, sendo possível perceber o declínio da gestão sistêmica no monitoramento de qualidade da água. Além disso, no RS não se obteve IQA no último levantamento, uma vez que não obtinham todos os 9 parâmetros para o cálculo do IQA. Isso mostra uma falha sistêmica nas prerrogativas atuais, pois por falta de dados disponíveis, não é possível diagnosticar a qualidade da água de diversos postos de monitoramento no Brasil (ANA, 2019).

Além do IQA, foi proposto pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) (2013) a análise do Índice de Qualidade das Águas Brutas para Fins de Abastecimento Público (IAP), sendo que esse índice é calculado nos pontos de amostragem dos rios e reservatórios que são utilizados para o abastecimento público. Para o cálculo do IAP são consideradas a ponderação dos resultados do IQA e o Índice de Substâncias Tóxicas e Organolépticas (ISTO) que é composto pelo grupo de substâncias que afetam a qualidade organoléptica (ferro dissolvido, manganês, alumínio dissolvido, cobre dissolvido e zinco) da água, bem como de substâncias tóxicas (potencial de formação de trihalometanos, número de células de cianobactérias, cádmio, chumbo, cromo total, mercúrio e níquel) (CETESB, 2013).

Ao considerar as condicionantes do IAP é possível perceber que a característica biológica utilizada é a presença de algas que formam florações e produzem toxinas. Todavia, partindo do pressuposto do IAP, nenhuma menção sobre bactérias resistentes é feita.

Outra normativa importante, estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) relacionado a gestão sistêmica da água, é a Resolução CONAMA 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento (BRASIL, 2005a). Essa resolução compreende uma série variada de parâmetros físico-químicos e microbiológicos que quando analisados, indicarão o enquadramento desse curso d'água em classes que variam de 1 a 4. As águas doces, salobras e salinas do Território Nacional são classificadas, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, em classes de qualidade.

A classificação dos mananciais pelo CONAMA quanto ao abastecimento público em todo o país, visa o enquadramento dos corpos hídricos em classes de qualidade segundo os usos preponderantes. Essa classificação objetiva assegurar às águas, qualidade compatível com os usos mais exigentes a que forem destinadas, bem como diminuir os custos de combate à poluição hídrica, mediante ações preventivas permanentes conforme disposto nas Resoluções CONAMA nº 357 de 2005 e nº 396 de 2008, tendo como referências a bacia hidrográfica como unidade de gestão e os usos preponderantes mais restritivos, conforme a Resolução do Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH) nº 91 de 2008 (ANA, 2019).

A resolução do CONAMA nº 274 de 2000 (BRASIL, 2000) dita os padrões de balneabilidade das águas doces utilizadas para recreação de contato primário. Essa resolução demonstra a importância do monitoramento da água bruta, para se manter os padrões de enquadramento e para garantir segurança das pessoas que utilizam desses mananciais para recreação. Diante disso, é importante manter os índices adequados para que não aconteça, por parte da população, ingestão e contato de água de má qualidade, que possam de forma negativa interferir a saúde pública através de doenças de veiculação hídrica.

Sabe-se entretanto, que a qualidade da água está seriamente comprometida devido os lançamentos *in natura* de esgotos domésticos, industriais, resíduos sólidos e pela falta de regulação do uso e ocupação do solo (BRASIL, 2013a). A esse ponto é necessário acrescentar que estando os mananciais de água com sua qualidade comprometida, todas as atividades que necessitam desse recurso, tão logo se comprometem e acabam gerando problemas de grande magnitude, principalmente para a saúde pública.

As diretrizes atuais da OMS para água potável, água recreativa e uso seguro de águas residuais ainda não contêm informações sobre antibióticos e outros agentes antimicrobianos, seus metabólitos, bactérias AMR ou genes AMR (WUIJTS et al., 2017), tão pouco as legislações no Brasil fazem menção ao monitoramento da AMR. Esse impasse dificulta ainda mais uma efetiva medida de controle, pois não existe nenhum parâmetro exigido por norma, em referência a presença de organismos AMR nas águas de abastecimento, recreação e irrigação.

É notório ao realizar uma pesquisa de aquisição de dados referentes a bacias hidrográficas, perceber que informações referentes a qualidade das águas em nosso país são incipientes e por vezes inexistentes. Por esse motivo, existe um agravo na avaliação da qualidade da água no Brasil, vezes por falta de uma rede de monitoramento que colete dados técnicos aplicáveis à resolução de problemáticas em todos os pontos do país, outrora por falta de manutenção nas redes de monitoramento já existentes (ANA, 2019).

Portanto, reconhecer e compreender a ligação entre as atividades humanas, o processo natural e o funcionamento microbiano e seus impactos finais na saúde humana são pré-requisitos para reduzir os riscos às populações expostas (ROCHELLE-NEWALL et al., 2015).

As notificações compulsórias de doenças, agravos e eventos de saúde pública, tanto no setor público quanto privado em todo território nacional, estão ao encargo da Portaria 204 de 2016 do MS (BRASIL, 2016). Segundo relatório do MS disponibilizado em 2018, as bactérias (92,2%) são o agente etiológico mais identificado em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) entre os anos de 2000 e 2017, sendo que a água é classificada como alimento na contabilização dos surtos. Segundo o mesmo relatório, *E. coli* (24%) é o segundo agente etiológico mais identificado em surtos de DTA, ficando atrás apenas de *Salmonella* spp (31%) (BRASIL, 2018c).

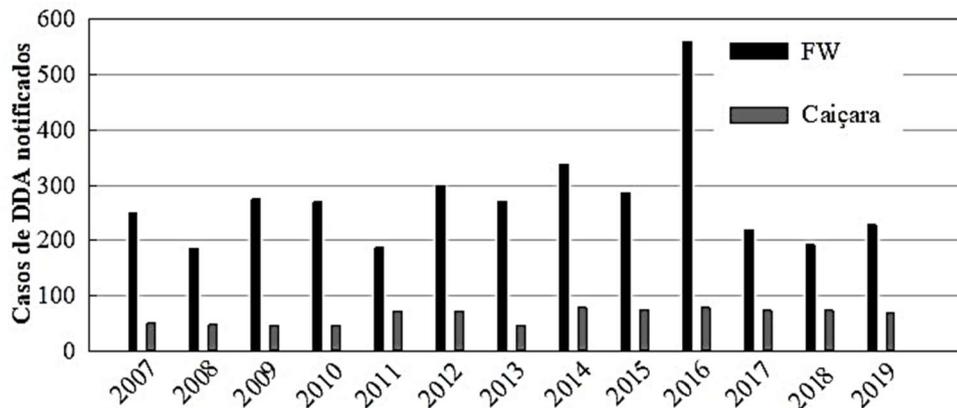
Outro relatório do MS disponibilizado em 2019, apresenta a água (21,1%) como o segundo alimento mais incriminado em surtos de DTA, ficando atrás apenas dos alimentos mistos (25,5%) entre os anos de 2009 e 2018, sendo 2.350 o número total de surtos para esse período. Nesse mesmo relatório, *E. coli* (23,4%) é apontada como o agente etiológico mais identificado em surtos de DTA entre os anos de 2009 e 2018, ficando bem à frente do segundo agente, *Salmonella* spp. (11,3%) (BRASIL, 2019b).

O MS afirma que a ocorrência de DTA relaciona-se com diversos fatores, como: condições de saneamento e qualidade da água para consumo humano impróprios; práticas inadequadas de higiene pessoal e consumo de alimentos contaminados. Em conjunto a essas informações do MS, a OMS alerta para as regiões das Américas, e as doenças diarreicas são responsáveis por 95% das DTA e segundo o MS, um percentual significativo de doenças diarreicas são transmitida pela água e pode ser prevenida através do consumo de água potável, condições adequadas de saneamento e hábitos de higiene (BRASIL, 2020). Todavia, existem doenças que não estão incluídas na Portaria nº 204 de 2016, do MS, como os episódios das diarreias agudas, indicando assim que existe uma subnotificação a incidência de doenças de veiculação hídrica (DVH) emergentes e reemergentes que por acaso possam existir.

Brasil (2020) destaca que dentre os fatores de risco para as doenças diarreicas agudas (DDA) que podem facilitar a infecção das pessoas, pode-se citar a ingestão de água sem tratamento adequado, além de condições de saneamento e higiene precárias. A figura 2 representa os casos de DDA notificados em dois municípios do estado do RS, (Frederico Westphalen e Caiçara) ambos municípios recebem água tratada da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) que utiliza a água proveniente do Lajeado Pardo para tratamento e posterior destinação ao consumo humano. Não há comprovações de que esses casos relatados

sejam decorrentes de contaminação de água, todavia é necessário um olhar cauteloso para tais dados, pois assim como assinala o MS, a água contaminada é um dos fatores de risco para contrair as DDA.

Figura 2 – Casos de DDA notificados no estado do Rio Grande do Sul, no município de Frederico Westphalen (FW) e Caiçara, 2007 a 2019



Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2020).

Nesse aspecto, no Brasil é necessário se atentar aos municípios interioranos que por vezes possuem acesso a água de forma informal, não estando regulamentadas e dentro dos padrões de potabilidades exigidos. O uso da água para as mais diversas atividades, como por exemplo, irrigação e recreação também precisam obedecer aos padrões para tal uso. A população que faz uso de águas de má qualidade para lavar roupa, cozinhar ou até mesmo para beber, correm risco de se infectar ao abastecerem-se dessa água insegura. Segundo o último relatório do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), mais de 15% da população brasileira ainda não possui atendimento à abastecimento de água tratada (SNIS, 2019).

As políticas públicas de saneamento são, de forma multidimensional, técnicas socioeconômicas e culturais, fundamentais para a saúde pública, tendo como objetivo alcançar níveis crescentes de salubridade ambiental e, conseqüentemente, impactar positivamente a saúde humana (RIBEIRO, J. W.; ROOKE, J. M. S, 2010)

2.5 TÉCNICAS PARA DETECÇÃO E ENUMERAÇÃO DE *Escherichia coli* EM AMOSTRAS DE ÁGUA

A detecção das bactérias em água é realizada com auxílio de diferentes técnicas sendo o Método Padrão para o Exame de Água e Águas Residuais (do inglês *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*) (SMEWW) de autoria da *American Public Health Association* (APHA), *American Water Works Association* (AWWA) e *Water Environment Federation* (WEF), três das maiores organizações científicas do mundo voltadas a água, meio ambiente e saúde pública (APHA, 2012).

O SMEWW é a literatura base para análise microbiológica da água potável no Brasil (PADILHA, 2016), no qual está baseado o Manual Prático de Análise de Água da FUNASA em conjunto com o MS (BRASIL, 2013b). Além de que, o manual também está de acordo com as normas nacionais e internacionais mais recentes tais como: *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), normas publicadas pela *Internacional Standardization Organization* (ISO) e metodologias propostas pela OMS.

Ainda segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), e respeitando as publicações da ISO tais como a ISO/IEC 17025:2017 que dispõe sobre os requisitos gerais para a competência de laboratórios de análise, quando se tratar de análises ambientais de água bruta, água tratada e água para consumo humano, existem ISO e normas específicas a serem seguidas. No caso da análise microbiológica, tanto para coliformes totais, quanto para *E. coli* a determinação quantitativa pela técnica da membrana filtrante deve seguir a ISO 9308-1:2014/ AMD 1:2016, sendo um método preciso pois seu limite de quantificação (LQ) é igual a 0 UFC mL⁻¹. Por outro lado, para coliformes totais e termotolerantes (fecais) a determinação quantitativa pela técnica de tubos múltiplos (NMP) deve seguir a SMEWW-9221 B, C, E. 23ª edição, sendo o LQ de 1,1 NMP 100 mL⁻¹ (para água potável) e 1,8 NMP 100 mL⁻¹ (para água não potável).

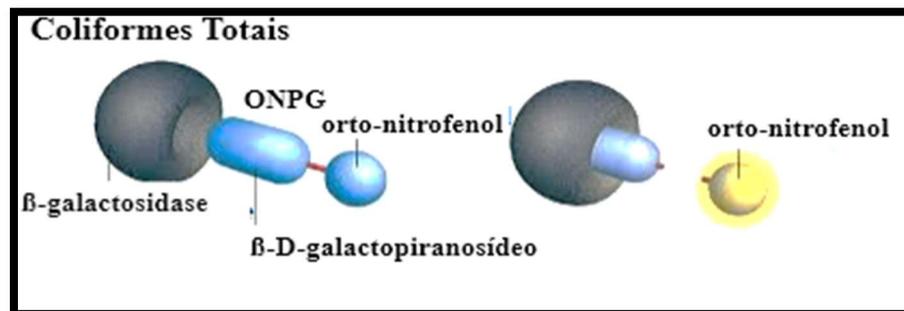
Devido o tempo de resposta para isolamento das bactérias pelas metodologias já citadas, um método que vem sendo muito utilizado para detectar e quantificar coliformes em água, é o chamado método rápido. Esse método é aprovado pela USEPA, desde a década de 90 (MARQUEZI; GALLO; DIAS, 2010).

O teste de Colilert® (Colilert) é considerado um teste rápido, proposto como um teste alternativo ao monitoramento convencional da qualidade da água e possui maior capacidade em recuperar as células danificadas, sendo baseado na atividade de β -galactosidase usando um substrato cromogênico para detecção de *E. coli* (DESHMUKH et al., 2016). Esse teste detecta e quantifica simultaneamente coliformes totais e *E. coli* (MARQUEZI; GALLO; DIAS, 2010) em 24 horas. O referido teste utiliza substratos hidrolisáveis para a detecção de enzimas presentes em coliformes totais e *E. coli*, desse modo, não apresentam agentes seletivos nos

meios, mas sim, substratos enzimáticos definidos usando indicadores ou/e nutrientes específicos que atuam somente no microrganismo que se deseja modificar (BRASIL., 2013b).

Os coliformes totais possuem a enzima β -D-galactosidase que cliva ONPG liberando cromógeno amarelo (ortonitrofenol) como mostra a figura 3, sendo que ONPG é um análogo da lactose e, por isso, permite verificar a presença de coliformes através da degradação desse nutriente. Os microrganismos do grupo de coliformes possuem a enzima β -galactosidase, expressa pelo gene LacZ, capaz de hidrolisar o substrato ONPG em galactose e orto-nitrofenol (WHO, UNICEF, 2005). Este componente faz com que a água admita uma coloração amarelada, servindo de indicador para a presença de coliformes.

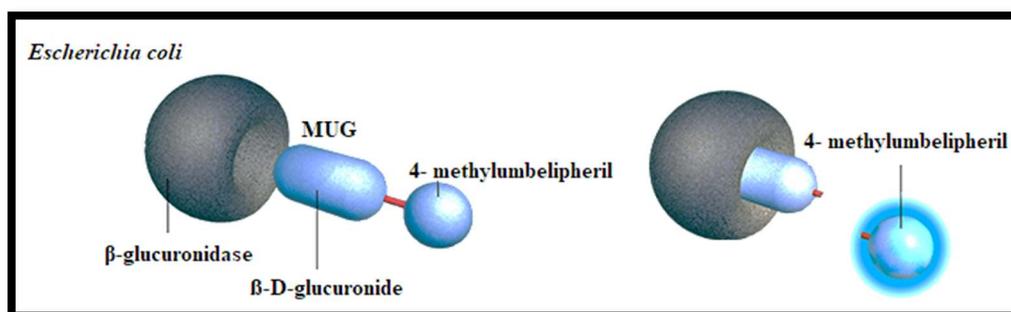
Figura 3 – Verificação da presença de coliformes totais pela utilização de substrato hidrolisável



Fonte: (Adaptado de Padilha, 2016).

E. coli produz a enzima β -glucuronidase, expressa pelo gene uidA, que hidrolisa o substrato MUG liberando 4-metilumbeliferona. Esta substância emite fluorescência, em cor azulada, quando exposta à radiação ultravioleta (WHO, UNICEF, 2005) como esquematiza a figura 4.

Figura 4 – Verificação da presença de *E. coli* pela utilização de substrato hidrolisável



Fonte: (Adaptado de Padilha, 2016).

Logo, para realizar os testes, o substrato é misturado a 100 mL da amostra de água a ser analisada, e a mistura é depositada em uma cartela Quanti-Tray 2000® que possuem 97 poços, selada e incubada a 35 ± 2 °C por 24 horas. A seladora distribui automaticamente a mistura da água com o reagente (substrato) nas cavidades da cartela (PADILHA, 2016).

São considerados coliformes totais, os poços que adquirem cor amarela, quando comparadas a cartela padrão que utiliza água autoclavada, como mostra a figura 3. Por outro lado, são classificados como *E. coli*, os poços que admitirem cor azulada na presença de luz ultravioleta (UV) 365nm, como mostra a figura 4. Após a contagem de poços positivos, os resultados são comparados com a tabela de resultados da IDEXX, e o número de células pequenas e grandes determina o NMP para as bactérias coliformes totais e *E. coli*.

Como mencionado, habitualmente utiliza-se de testes de isolamento em placa, para identificação e caracterização de *E. coli* em amostras de água, podendo ser utilizados meios seletivos específicos para a detecção que se deseja. Por se tratar de uma detecção através de meios presuntivos, provas complementares devem ser realizadas sempre que necessário (ANVISA, 2013).

Relativo a acurácia das identificações, qualquer sistema de testes existentes no comércio, com leitura manual ou automatizada tem limitações no número de provas e de discriminação dos diferentes gêneros e espécies de enterobactérias, de modo que a maioria dos esquemas trabalha com um máximo de 80% de acerto (ANVISA, 2013).

As comunidades microbianas da água são particularmente difíceis de estudar por abordagens tradicionais (JIN et al., 2018). Os métodos convencionais para a detecção de *E. coli* incluem fermentação em tubos múltiplos, filtro de membrana e contagem de placa. Embora esses métodos baseados em cultura sejam precisos, confiáveis e tenham limites de detecção baixos, eles costumam ser trabalhosos e demorados, uma vez que requerem 2-3 dias para produzir os resultados iniciais e até 7 a 10 dias para a confirmação (CIMAFONTE et al., 2020; VELUSAMY et al., 2010). Nesse aspecto, a biologia molecular mostra-se atualmente como padrão ouro no que diz respeito a identificação de microrganismo.

A aplicação de um ensaio qPCR altamente exclusivo e inclusivo (SADIK et al., 2017) tem o potencial de permitir que os gestores da qualidade da água detectem e quantifiquem *E. coli* de forma confiável e rápida e, portanto, tomem medidas apropriadas para reduzir o risco para a saúde pública representado pela contaminação fecal (WALKER et al., 2017).

O PCR é baseado em chip de alto rendimento que é uma ferramenta de monitoramento promissora para a qualidade biológica global da água (SADIK et al., 2017). É um método

molecular, que oferece velocidade, sensibilidade e especificidade (SETTANNI; CORSETTI, 2007).

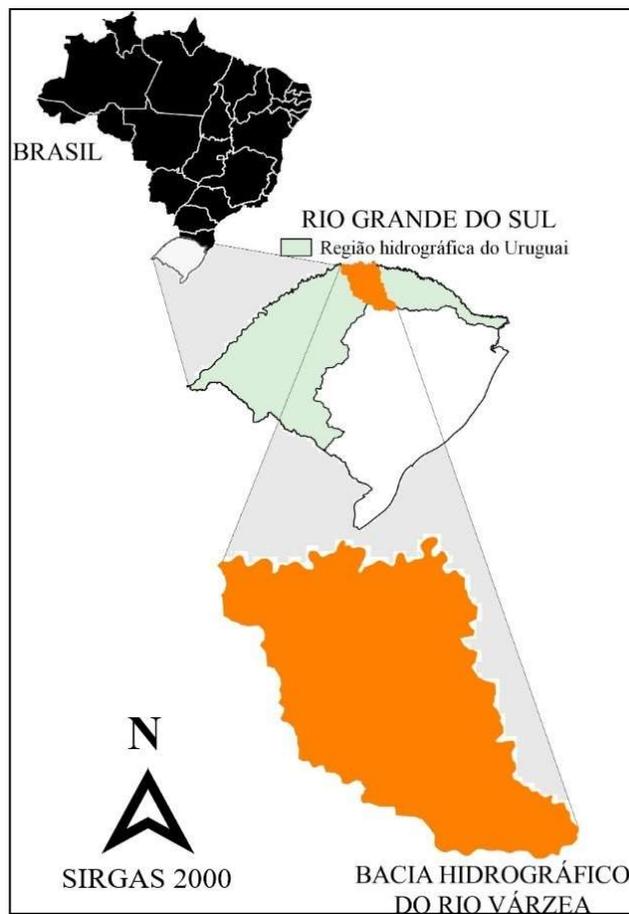
A técnica de PCR é considerada padrão ouro no diagnóstico molecular de microrganismos patogênicos. Isso porque os testes padrão para *E. coli* segundo os manuais de análise de água, baseados no SMTEWW, consistem em etapas de cultivo bacteriano em meios seletivos e meios cromogêneos, seguido de alguns testes de confirmação que além de serem demorados são testes presuntivos (BRASIL, 2013b).

2.6 BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO VÁRZEA E CARACTERÍSTICAS GERAIS DO MUNICÍPIO DE FREDERICO WESTPHALEN-RS, BRASIL

A unidade espacial de gestão de recursos hídricos definida pela Política Nacional de Recursos Hídricos é a bacia hidrográfica (BH) (ANA, 2019). A BH é uma unidade biogeofisiográfica que drena para um rio, lago ou oceano é a unidade natural de pesquisa e gestão (TUNDISI; MATSUMURA-TUNDISI, 2008).

A BH do Rio Várzea, conforme dados do Comitê da Bacia, se situa ao norte do estado do RS, conforme figura 5, entre as coordenadas geográficas 27°00' a 28°20' de latitude Sul e 52°30' a 53°50' de longitude Oeste. Abrange a Província Geomorfológica Planalto Meridional. Possui área de 9.463,46 km², abrangendo municípios como Carazinho, Frederico Westphalen, Palmeira das Missões e Sarandi, com população estimada em 323.924 habitantes.

Figura 5 – Ilustração da bacia hidrográfica do Rio Várzea-RS, Brasil



Fonte: Própria autoria (2021).

Os principais cursos de água da BH do Rio Várzea são os arroios Sarandi, Gozinho e os rios da Várzea, Porã, Barraca, do Mel, Guarita e Ogaratim (Fortaleza). Os principais usos da água na bacia segundo a Secretaria do Meio Ambiente e Infraestrutura (SEMA), se destinam a irrigação, a dessedentação animal, produção de energia elétrica e ao abastecimento humano (RIO GRANDE DO SUL, 2017). Segundo a classificação da ANA, a Bacia do Rio Várzea é contribuinte da Bacia do Rio Uruguai, integrante da Bacia do Rio da Prata, cujas águas deságuam no Oceano Atlântico (FREDERICO WESTPHALEN, 2012).

A Unidade de Gestão de Recursos Hídricos (UGRH) do Uruguai, tem seu perfil de uso da água pautado principalmente na irrigação, seguida do consumo animal, abastecimento humano e indústrias. De fato, quando comparado as demais UGRHS do Brasil, é a terceira que mais retirou água em 2019 com a finalidade de irrigação no país (ANA, 2019).

A BH do Rio Várzea é caracterizada como de Floresta Subtropical Latifoliada, também denominada "Mata Subtropical do Alto Uruguai", caracterizada por um extrato arbóreo

superior, formado por árvores altas e emergentes e na sua maioria decíduais (FREDERICO WESTPHALEN, 2012).

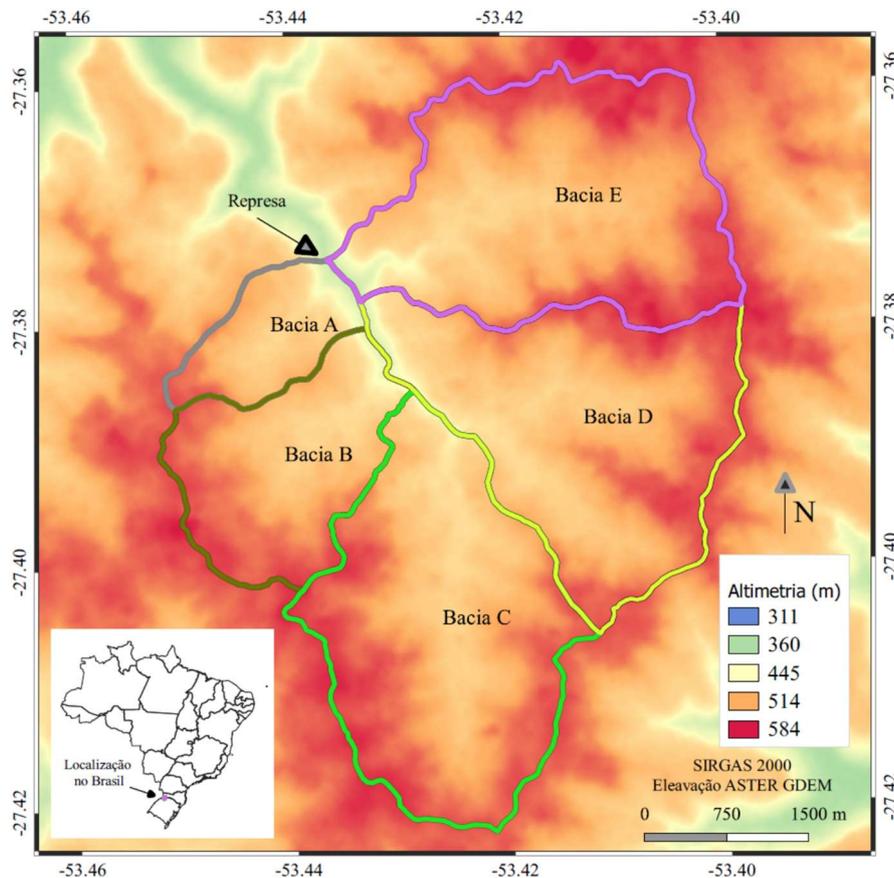
O Lajeado abrange a BH do Rio Várzea. O referido Lajeado se situa no município de FW, que possui sua economia baseada quase que fundamentalmente na agricultura, com produção de soja, milho, feijão, trigo, aveia, hortifrutigranjeiros, uva e citros. Sua produção animal é pautada na criação de aves, equinos, ovinos, bovinos e suínos. Os destaques são para o cultivo de soja, milho e trigo, bem como avicultura e suinocultura (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -EMBRAPA, 2011; RIO GRANDE DO SUL, 2017). A precipitação média varia entre 1800 e 2100 mm e a temperatura média anual do município de FW é de 18 °C (EMBRAPA, 2011).

Segundo a EMBRAPA (2011), atualmente o município de FW é composto por pequenas propriedades que ao longo do tempo se fragmentam com uma agricultura empresarial nos platôs, bem como de pequenos produtores nas áreas de mata com solos muito férteis, íngremes, com rochas e fragmentos. Pela sua posição geográfica, o município representa um polo comercial para a região em seu entorno. Também, por ser uma região íngreme de constante adição de produtos nos solos e animal para melhoria da produção agrícola, a água dos lajeados vem e virão ainda a receber a adição de nutrientes e produtos químicos usados pelos camponeses, promovendo conseqüentemente, a contaminação de solos e água (EMBRAPA, 2011).

A vegetação, outrora de mata, composta pela formação Floresta Estacional Decidual Submontana, está praticamente extinta, e as terras foram divididas em pequenas glebas constituindo lavouras familiares. Assim sendo, a vegetação nativa possui espécies ocasionais apenas em algumas propriedades, nas bordas dos lajeados (EMBRAPA, 2011). Segundo Pereira (2014), a bacia hidrográfica do Rio Várzea é a segunda colocada do estado no tocante do uso de agrotóxicos críticos (princípios ativos que apresentam maior risco à saúde humana), apresentando uma média de aplicação de 206,26 litros km⁻² ano⁻¹.

As águas do Lajeado Pardo possuem contribuição de cinco microbacias, desde a nascente até o ponto de represamento da CORSAN, para captação e tratamento da água, conforme figura 6 (VOLPI et al., 2021, *no prelo*).

Figura 6 – Microbacias hidrográficas que compõem a área de captação da CORSAN. Frederico Westphalen-RS, Brasil



Fonte: Volpi et al. (2021, *no prelo*).

Por não possuir enquadramento o Lajeado Pardo recebe classificação 2 (BRASIL, 2005a). Nessa classe, as águas podem ser destinadas: a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; b) à proteção das comunidades aquáticas; c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA n° 274, de 2000; d) à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e e) à aquicultura e à atividade de pesca (BRASIL, 2000).

A qualidade da água do Lajeado Pardo situado no município de Frederico Westphalen no estado do RS é de extrema relevância para a saúde da população que vive nessa bacia e faz uso dessa água para as mais diversas atividades, inclusive para consumo humano e recreação de contato primário. Segundo informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o reservatório público do Rio Lajeado Pardo (53°26'08" W; 27°22'28" S) gerido pela

CORSAN, abastece com água potável 33.914 habitantes dos municípios de FW e Caiçara, no noroeste do RS (IBGE, 2010).

Os padrões de qualidade da água bruta desse lajeado são influenciados por diversos fatores, haja vista que predomina ao seu entorno a atividade agrícola. O estudo realizado por Ritter et al. (2015) no Lajeado Pardo, realiza um diagnóstico acerca do manejo do mesmo, apontando que ao longo do percurso do lajeado, a área apresenta problemas com solo descoberto, falta de vegetação marginal, curso d'água interrompido, construções instaladas em zonas de drenagem, despejo inadequado de efluentes no curso e disposição incorreta de resíduos.

Nesse aspecto, é de fundamental importância a pesquisa para o levantamento da qualidade da água do Lajeado Pardo, uma vez que a população que consome essa água pode sofrer com as doenças desencadeadas pelos microrganismos presentes. Através da pesquisa, é possível criar definições harmonizadas para descrever e classificar as bactérias resistentes a vários agentes antimicrobianos, para que os dados de vigilância epidemiológica coletados possam ser comparados de forma confiável em nosso país.

A seguir serão discutidos os aspectos relativos ao monitoramento microbiológico da água do Lajeado Pardo, tendo como objeto de estudo bactérias da espécie *E. coli* (manuscrito 1). Posteriormente, apresentar-se-á uma abordagem referente a resistência a antibióticos das cepas de *E. coli* isoladas no estudo (manuscrito 2), findando a pesquisa com algumas proposições em relação ao meio ambiente, em especial a água, como facilitador da ocorrência de *E. coli* resistente a antibiótico, e potencial agente patogênico para disseminação de doenças que ocasionem problemas de saúde pública.

3 CAPÍTULO 1 – MANUSCRITO 1. PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA DO LAJEADO PARDO: AVALIAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli*

Microbiological parameters of water from Lajeado Pardo: evaluation of total coliforms and *Escherichia coli*

RESUMO

Em vistas do aumento da presença de microrganismos nos mananciais de água doce, alguns deles patogênicos ao homem, causados principalmente por fatores antrópicos, o presente estudo teve como objetivo identificar e quantificar coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*) no Lajeado Pardo, haja vista que *E. coli* é uma espécie indicadora de contaminação fecal e as rotas de transmissão de bactérias patogênicas serem fecal-oral. Amostras de águas superficiais foram coletadas em quatro setores localizados no lajeado em questão, caracterizado por pertencer majoritariamente, a microbacias agrícolas, sendo que análises quantitativas foram realizadas para coliformes totais e análises quali- quantitativas foram realizadas na premissa de identificar a espécie alvo: *Escherichia coli*. A análise quantitativa foi realizada através de aplicação de Teste Colilert para detectar simultaneamente os coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. Por outro lado, para a análise qualitativa, foi utilizada a metodologia de isolamento em placa com membrana filtrante. Com três meios seletivos distintos para isolamento e detecção de *E. coli*: EC, *Lauryl Sulfate Broth* e meio cromogênico Colilert. Foram realizados ainda alguns testes bioquímicos alternativos (coloração de Gram e teste da catalase) nas presuntivas cepas de *Escherichia coli* isoladas. Na estimativa de NMP de *Escherichia coli*, 58,3% das amostras estavam acima do limite máximo ($800 \text{ NMP } 100 \text{ mL}^{-1}$) permitido por legislação para enquadramento em classe II do Lajeado. O NMP de coliformes totais e *E. coli* mais elevado estava relacionado ao setor 1, onde encontra-se localizada a represa para captação da água bruta levada até a estação de tratamento de água do município de Frederico Westphalen, para posterior tratamento e distribuição para a população. No isolamento das bactérias a partir dos três meios de cultura utilizados, foram detectados em todos os setores e em todos os meios a presença do microrganismo alvo: *E. coli* selvagem provenientes de amostras ambientais. Além disso, no teste da catalase e coloração de Gram também se confirmou as cepas alvo como sendo *E. coli*. Esses resultados levantam um alerta para as possíveis consequências que poderão surgir, principalmente quanto a saúde pública das pessoas que fazem uso desse manancial para diversos usos. Em vista das análises realizadas faz-se importante mencionar que os ambientes aquáticos permanecem como um desafio importante para as ciências ambientais e saúde pública.

Palavras-Chave: Meios de cultura. Qualidade da água. Avaliação ambiental. Bactérias.

ABSTRACT

In view of the increase in the presence of microorganisms in freshwater springs, some of them pathogenic to humans, caused mainly by anthropic factors, the present study aimed to identify and quantify total coliforms and *Escherichia coli* (*E. coli*) in Lajeado Pardo, given that *E. coli* is an indicator species of fecal contamination and the routes of transmission of pathogenic bacteria are fecal-oral. Surface water samples were collected in four sectors located on the slab in question, characterized by belonging mostly to agricultural watersheds, and quantitative analyzes were performed for total coliforms and qualitative-quantitative analyzes were performed on the premise of identifying the target species: *Escherichia coli*. Quantitative

analysis was performed by applying the Colilert Test to simultaneously detect total coliforms and *E. coli* in water samples. On the other hand, for the qualitative analysis, the methodology of isolation in plate with filter membrane was used. With three different selective media for isolation and detection of *E. coli*: EC, Lauryl Sulfate Broth and Colilert chromogenic medium. Some alternative biochemical tests (Gram stain and catalase test) were also performed on the presumptive strains of *Escherichia coli* isolated. In the estimation of MPN of *Escherichia coli*, 58.3% of the samples were above the maximum limit (800 MPN 100 mL⁻¹) allowed by legislation for classification in class II of Lajeado. The highest MPN of total coliforms and *E. coli* was related to sector 1, where the dam is located to capture the raw water taken to the water treatment plant in the municipality of Frederico Westphalen, for further treatment and distribution to the population. In the isolation of bacteria from the three-culture media used, the presence of the target microorganism was detected in all sectors and in all media: wild *E. coli* from environmental samples. Furthermore, in the catalase test and Gram stain, the target strains were also confirmed to be *E. coli*. These results raise an alert for the possible consequences that may arise, especially regarding the public health of people who make use of this source for various uses. In view of the analyzes carried out, it is important to mention that aquatic environments remain an important challenge for environmental sciences and public health.

Keywords: Culture mediums. Water quality. Environmental assessment. Bacteria.

3.1 INTRODUÇÃO

A água transporta a saúde e o bem-estar por meio da hidratação e na diluição de moléculas utilizadas nas reações bioquímicas vitais ao homem (MORETTO, 2018) e em vistas disso, é o alimento mais consumido pela população. É importante pontuar ainda que a importância da água para os seres humanos não está restrita apenas ao consumo dela para suprir as demandas fisiológicas humanas, estando atrelado às diversas atividades, como agricultura, recreação, produção dos mais diversos alimentos e intimamente ligado ao equilíbrio e manutenção de todos os ecossistemas encontrados no planeta Terra.

Apesar da água ser um elemento vital, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), 2,2 bilhões de pessoas em todo o mundo não têm serviços de água tratada, 4,2 bilhões de pessoas não têm serviços de saneamento adequado e 3 bilhões não possuem instalações básicas para a higienização das mãos (WHO, UNICEF, 2019).

Embora o Brasil possua 12% do total dos mananciais de água doce do planeta (ANA, 2010), que designa o país como detentor das maiores reservas de água doce do mundo, cuja vazão total de seus rios alcança 180 mil m³ s⁻¹ (CONTI; SCHROEDER, 2013), dados estatísticos preocupantes fornecidos pelo Painel do Saneamento no Brasil de 2017 direcionam atenção para as mais de 35 milhões de pessoas que não possuem acesso a água potável no país. Nesse aspecto, merece atenção também os dados expressivos que remetem a mais de 100

milhões de brasileiros (46%) sem acesso a coleta de esgoto, além de que, o país não trata a metade do esgoto que gera (49%) jogando na natureza todos os dias, 5,3 mil piscinas olímpicas de esgoto sem tratamento (BRASIL, 2021a).

Devido a todo esse problema de infraestrutura e saneamento que a população carece, foram registrados somente em 2019, 258 mil internações por conta de doenças de veiculação hídrica, além do registro de 2.734 mortes por causas ambientais ligadas a má qualidade da água (BRASIL, 2021). A esses números é importante destacar os casos subnotificações, que por falta de estrutura no setor da saúde, não conseguem apurar em sua totalidade os casos de doenças comunitárias de veiculação hídrica.

Vários fatores contribuem para a ocorrência da contaminação microbiana nos mananciais de água bruta, que são utilizados pelos seres humanos para diversas atividades, tais como, a aproximação das habitações humanas ao entorno de rios e riachos que não possuem adequado sistema de armazenamento e tratamento de esgoto, potencializando o risco de contaminação fecal na água e por consequência elevando o risco de contaminação por microrganismos patógenos. Segundo Rochelle-Newall et al. (2015), tem-se ainda a precarização da água que chega para as comunidades a jusante, que ora contaminadas são por vezes utilizadas para os mais diversos usos, indo da evacuação dos resíduos até para banhos e consumo humano.

Conforme pontuado por Chen et al. (2017) e Jin et al. (2018), a água de superfície, que consiste em corpos d'água naturais e artificiais (rios, lagos, reservatórios, pântanos, parques, etc.) desempenham um papel vital nos serviços do ecossistema e são uma fonte importante de água potável, irrigação e recreação, etc. Porém, é perceptível que as águas superficiais e subterrâneas vêm passando por diversas contaminações, caracterizando negativamente modificações da qualidade desses mananciais. Segundo Rochelle-Newall et al. (2015) isso será ainda mais acentuado pelas rápidas mudanças no uso da terra que muitas regiões estão experimentando. Hafner, Harter, Parikh (2016) pontuam que os ecossistemas agrícolas, agroquímicos, fazendas de leite e criação extensiva, principalmente de vacas, porcos e aves caracterizam-se por serem fontes potenciais de contaminação de cursos d'água.

O cenário atual aponta cada vez mais para o risco de contrair doenças de veiculação hídrica, motivadas pela contaminação dos mananciais de água doce por microrganismos, muitas vezes patogênicos. Nesse aspecto, o monitoramento ambiental é a chave principal para a gestão das águas no que toca os padrões microbiológicos da água.

Segundo José Figueras, Borrego (2010) é necessário que se viabilizem medidas específicas para proteger a água bruta usada para consumo, bem como para produzir água

potável. É importante destacar que as águas brutas são por diversas vezes fonte de abastecimento para muitas famílias que não possuem acesso a água tratada. Nesse sentido, estudar a qualidade da água bruta é de essencial importância para o levantamento das condicionantes e parâmetros para futuros tratamentos na estação de tratamento de água (ETA).

Nos países em desenvolvimento, frequentemente inexistem estruturas adequadas para o monitoramento de patógenos transmitidos pela água, devido às restrições econômicas (ROCHELLE-NEWALL et al., 2015). Desse modo, são deixadas lacunas adjacentes que precisam ser estudadas, para diminuir as doenças de veiculação hídrica e, conseqüentemente, as mortes acarretadas por elas (Chen et al., 2019). Ainda segundo os autores, alguns estudos coexistem concentrando-se em identificar os microrganismos patogênicos em fontes de água potável, mas poucos se concentram em analisar as fontes de água bruta que na sua maioria, sofrem com problemas de degradação natural e fortemente de caráter antrópica, podendo ser pontuados os ambientes aquáticos, como as bacias hidrográficas agrícolas (MAAL-BARED et al., 2013).

E. coli tem sido o principal indicador de contaminação fecal no monitoramento da qualidade da água por muitas décadas. Nesse sentido, na medida que identificar todas essas bactérias seria tarefa muito difícil e demorada, o monitoramento dessas bactérias é realizado com microrganismos indicadores de contaminação fecal, visto que as fezes são fontes de bactérias patogênicas. Logo, as diretrizes e regulamentos para águas recreativas e potável seguras exigem a determinação da ausência ou de um limite máximo permitido de microrganismos indicadores (PATEL et al., 2016).

Monitorar e entender quais os tipos de microrganismos presentes nos recursos hídricos, é muito importante. No presente caso, o lajeado estudado serve como fonte de captação para abastecimento da população do município de Frederico Westphalen e Caiçara, bem como utilizada para recreação de contato primário, dentre outras atividades sem nenhum tratamento prévio da água. Por causa disso, riscos de doenças de veiculação hídrica são associados, quando os níveis de indicadores estão elevados e divergem dos padrões exigidos pela legislação, caracterizando assim um ecossistema potencialmente carregado com bactérias patogênicas.

Nesse sentido, devido à importância da água bruta do Lajeado Pardo para a cidade de FW e as cidades vizinhas, o presente estudo tem o objetivo avaliar a presença de *E. coli* através de três meios seletivos distintos de isolamento, bem como quantificar coliformes totais e *E. coli* pelo método do número mais provável (NMP).

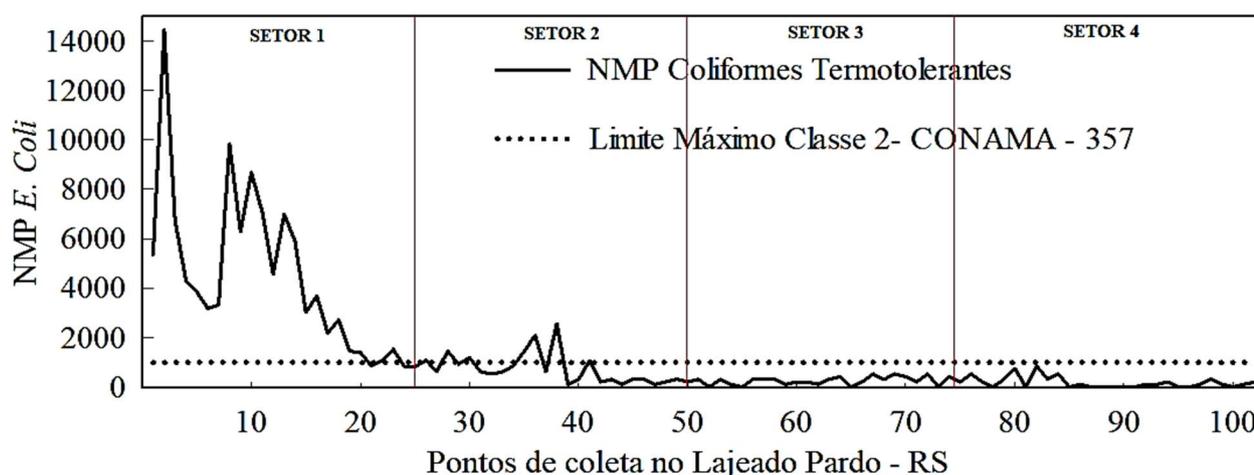
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Coleta das amostras de água

Foram realizadas coletas de água no Lajeado Pardo, localizado no município de Frederico Westphalen, região noroeste do estado do RS, Brasil. O referido município conta com uma unidade territorial de 265,181 km², é considerado o principal centro urbano da região do Alto e Médio Uruguai. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2010), Frederico Westphalen apresentava uma população para 2010 de 28.843 habitantes, tendo projeções para 2021 de 31.675 habitantes.

O Lajeado Pardo possui uma extensão de 5.700 m, tem sua nascente nas coordenadas: latitude 27° 25'43''S e longitude: 53° 43'25'', com uma altitude média de 488 m. Da nascente até o ponto de represamento para captação de água que abastece os municípios de Frederico Westphalen e Caiçara, foram determinados pontos de coleta de água, levando em consideração a divisão de pontos pela extensão do riacho, sendo que atualmente não existe nenhuma metodologia que especifique os pontos de coleta para essas análises (RASCHLE, et al., 2021). Além disso, a setorização do lajeado foi realizada segundo estudo já realizado no Lajeado Pardo realizado por Volpi et al. (2021, *no prelo*), conforme figura 1.

Figura 1 – Setorização prévia do Lajeado Pardo para análise da contaminação de *E. coli*. Frederico Westphalen-RS, Brasil

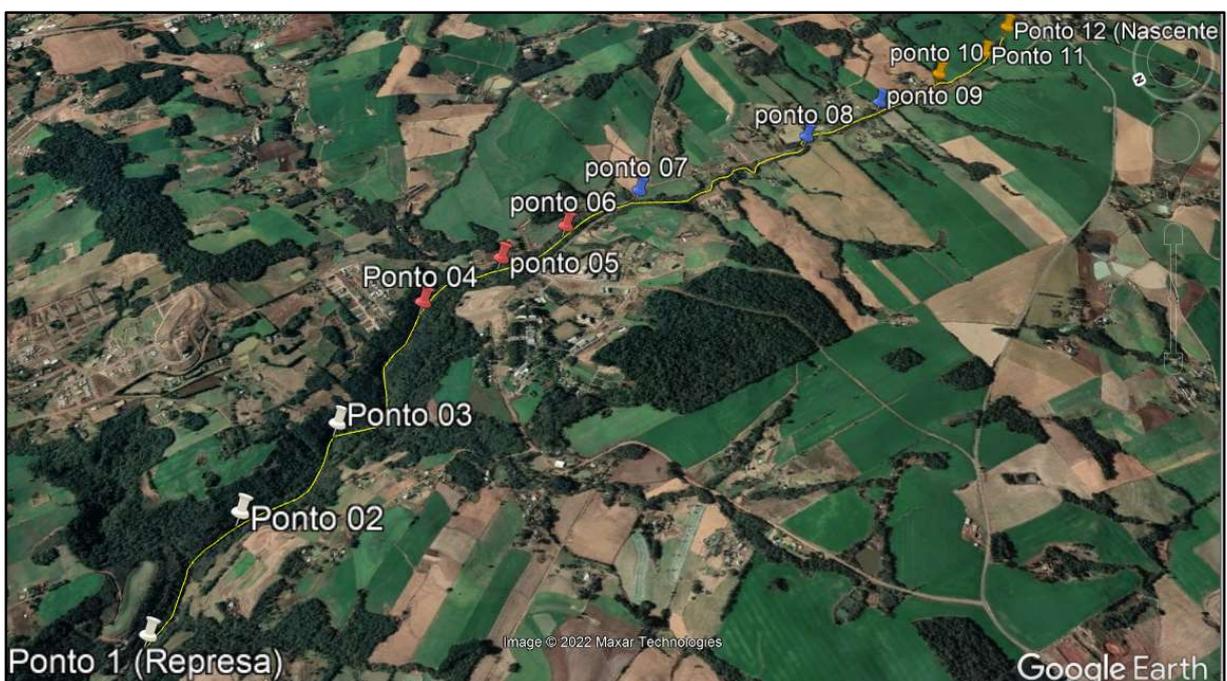


Fonte: Volpi et al. (2021, *no prelo*).

Percebe-se segundo a figura 1, que em todo o percurso foi encontrado *E. coli*, sendo que em alguns pontos sua presença se dá de forma mais expressiva, como é o caso dos primeiros pontos que se situam no ponto de captação de água do município de Frederico Westphalen. Devido Volpi et al. (2021, *no prelo*) terem encontrado *E. coli* ao longo de todo o percurso analisado do Lajeado Pardo, o presente estudo igualmente amostrou através de setorização todo o lajeado.

Da nascente até o ponto de represamento para captação de água que abastece os municípios de Frederico Westphalen e Caiçara foram determinados quatro setores, onde em cada setor foram definidos três pontos estratégicos de coleta de água, considerando a divisão de pontos pela extensão do Lajeado. Dessa maneira, o setor 1 ficou localizado na represa de água, utilizada para captação e posterior tratamento, o setor 2 e 3 são setores medianos do percurso e o setor 4 fica situado na nascente do lajeado. Em cada um dos quatro setores, foram coletadas três amostras de água, totalizando 12 amostras de água bruta coletadas, como mostra a figura 2.

Figura 2 – Indicação dos pontos de coleta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil



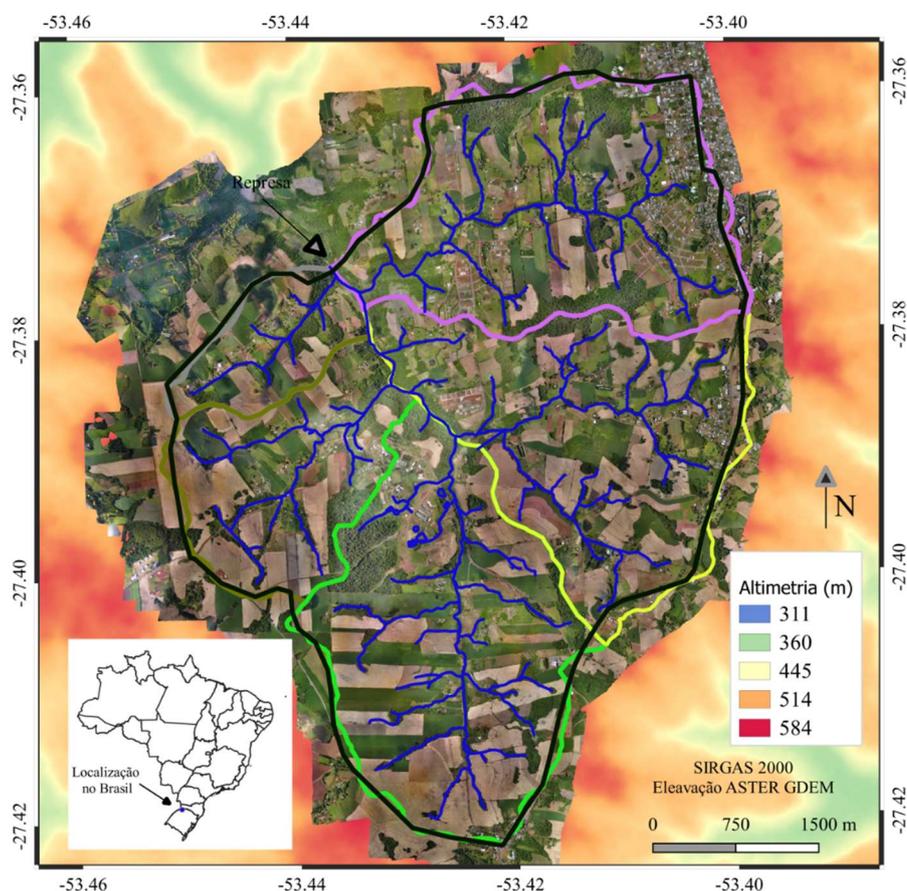
Fonte: Adaptado de Google Earth (2021).

A coleta aconteceu em janeiro de 2021 em uma única campanha de amostragem e ocorreu de jusante a montante do curso do rio (contra fluxo) para evitar alterações nos

parâmetros analisados que pudessem sofrer interferência pelo pisoteio das margens. Iniciou-se as coletas na barragem de represamento da água para captação da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) e seguiu-se sentido a nascente.

O Lajeado Pardo está situado ao longo de cinco microbacias que fazem parte da Bacia Hidrográfica do Rio Várzea, conforme figura 3 elaborada por Volpi et al. (2021, *no prelo*). A amostragem da água nos diferentes pontos foi do tipo manual e próximo à superfície, em razão da pouca profundidade dos mananciais conforme realizado por Menezes et al. (2016) com recipientes apropriados e autoclavados (Nalgen®) para acondicionar amostras de água.

Figura 3 – Microbacias que contribuem ao Lajeado Pardo, Frederico Westphalen-RS, Brasil



Fonte: Volpi et al. (2021, *no prelo*).

As amostras foram colhidas e preservadas (BRASIL, 2013), sendo encaminhadas para o Laboratório de análise de águas do bloco de apoio 7 da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* de Frederico Westphalen-RS. A análise foi realizada nas 4 horas posteriores a coleta, e as amostras refrigeradas a 5 ± 3 °C.

3.2.2 Quantificação de *Escherichia coli* e coliformes totais

As amostras de água coletadas foram submetidas à detecção simultânea da enumeração de coliformes totais e *E. coli*, usando método Colilert, padrão para água e esgoto no Brasil (BRASIL, 2013), método aprovado pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (SMEWW) (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION-APHA, 2012).

Para compilar os dados dos poços pequenos e poços grandes positivos e gerar o NMP do sistema *Quanti-Tray/2000*, utilizou-se do software gratuito *IDEXX Water NMP Generator*®, disponibilizado pelo laboratório da IDEXX. Ao inserir os valores dos poços pequenos e grandes positivos, o software retorna automaticamente o NMP tanto de coliformes totais quanto de *E. coli*, para cada amostra.

3.2.3 Material Biológico: Isolamento Bacteriano em placa

O isolamento bacteriano em placa verifica a presença ou ausência do microrganismo alvo, nesse caso *E. coli*. No referido estudo foi avaliado a resposta de três meios seletivos distintos. Para tanto, as amostras de água que seguiram para as análises bacterianas em placa resultaram da mistura de 300 mL de cada uma das três amostras de cada setor, formando uma grande amostra por setor que seguiu para os testes subsequentes. Dessa forma as 12 amostras iniciais foram reduzidas a 4 amostras, tendo uma amostra representante para cada um dos 4 setores amostrados.

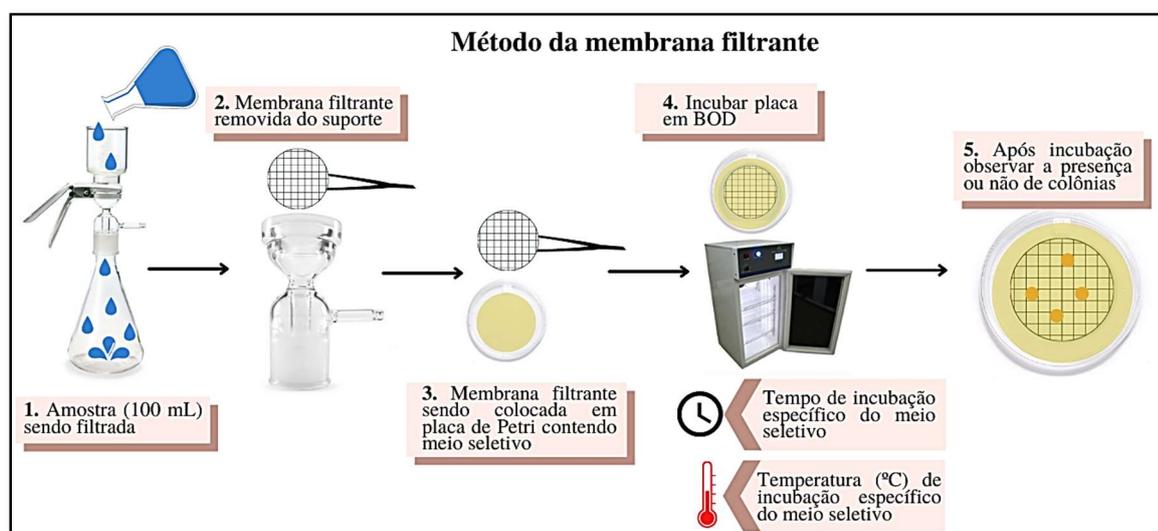
A espécie (*E. coli*) alvo foi isolada a partir das amostras de água oriundas do Lajeado Pardo utilizando 3 meios de cultura distintos, dois deles utilizando o método da membrana filtrante, e o terceiro método, isolamento direto através do meio cromogênico Colilert modificado. Assim sendo, em cada setor foi avaliada a presença ou ausência de *E. coli* utilizando três meios de cultura, na intenção de propor proposições referente aos meios seletivos utilizados e sua funcionalidade para o referido estudo.

3.2.4 Isolamento bacteriano em placa: método da membrana filtrante

O método da membrana filtrante com filtros de éster de celulose de 47 mm de diâmetro e tamanho do poro de 0,45 µm de tamanho de porosidade, consiste em pegar uma amostra de água (100 mL) previamente agitada e filtrar, mediante pressão negativa (vácuo) na intenção de reter os microrganismos na membrana. Posteriormente a membrana é colocada assepticamente

sob meio sólido seletivo apropriado em placa de Petri, que por capilaridade entra em contato com a bactéria e, por conseguinte é incubada e crescida por 24 horas em incubadora B.O.D. SL 200®, com temperatura adequada de cada meio de cultura (ANA, 2005; BRASIL, 2013), como mostra a figura 4. O controle negativo foi realizado utilizando água ultrapura autoclavada e o controle positivo utilizando cepas de referência de *E. coli* ATCC® 25922™.

Figura 4 – Fluxograma do método de análise de água por membrana filtrante



Fonte: Própria Autoria (2021).

Como a bactéria alvo do estudo foi *E. coli*, utilizou-se meio seletivo EC e meio seletivo *LSB* (MALLMANN; DARBY, 1941; BRASIL, 2013), indicados entre outras espécies, para isolar *E. coli*.

3.2.4.1 Método de isolamento EC

O meio EC também conhecido como *EC Broth* ou meio *EC Medium*, é utilizado para a detecção de *E. coli* a temperaturas elevadas (44,5 e 45,4 °C) por 24 horas. Todos os isolados presuntivamente positivos das 4 amostras analisadas foram então submetidos a subseqüentes caracterizações para confirmação da presença da espécie nas amostras analisadas.

O teste para coliforme fecal que utiliza o meio EC é aplicável para investigações em água de consumo humano, poluição de córregos, fontes de água natural, sistemas de tratamento de esgoto, água para banho, água salgada e monitoramento de água em geral (APHA, 2012).

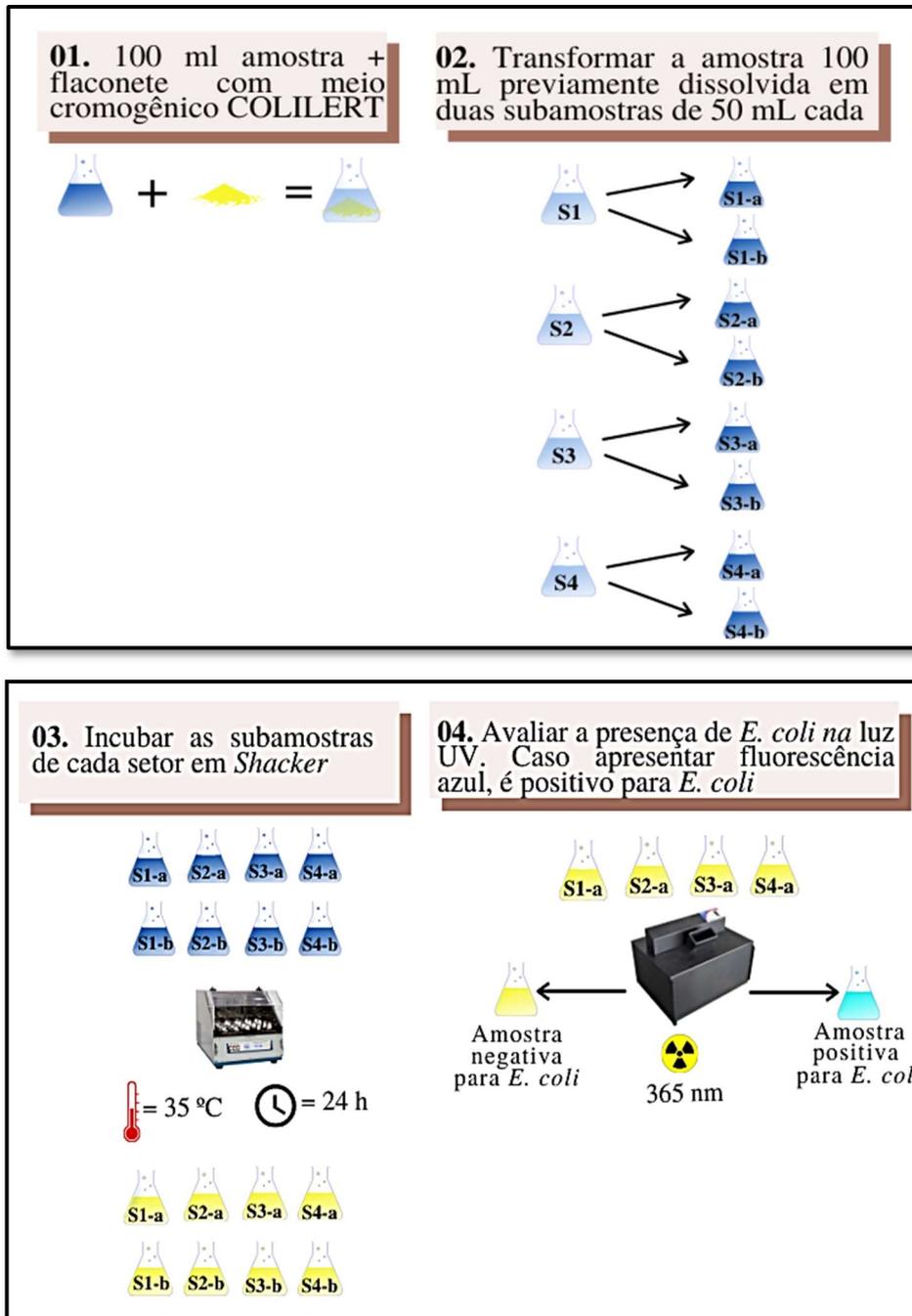
3.2.4.2 Método de isolamento Lauryl Sulfate Broth (LSB)

O meio LSB é utilizado para a detecção de coliformes e *E. coli* a temperatura de 35 °C por 24 horas (MALMANN, DARBY, 1941). Todos os isolados presuntivamente positivos das 4 amostras analisadas foram então submetidos a subsequentes caracterizações para confirmação da presença da espécie nas amostras analisadas.

3.2.4.3 Método de isolamento Colilert

A amostra foi analisada à temperatura ambiente, e consistiu em medir 100 mL da amostra de água e verter em um Erlenmeyer previamente identificado, adicionando o conteúdo de um flaconete de Colilert e homogeneizando o frasco com movimentos circulares até completa dissolução do reagente (GLOWACKI; CRIPPA, 2019). Fracionou-se cada amostra (S1; S2; S3; S4) em duas subamostras de 50 mL cada (S1.a e S1.b; S2.a e S2.b; S3.a e S3.b; S4.a e S4.b) e incubou-se os inóculos em Incubadora Shaker Luca 220 – Lucadema®, regulada em 140 rpm, com temperatura constante de 37 °C por 24 horas. Após transcorrido o tempo necessário para crescimento das bactérias, uma subamostra (S1a; S2a; S3a; S4a) de cada setor foi colocada na luz ultra violeta (UV) para verificar a presença de *E. coli*. Como houve a confirmação de fluorescência azul em todos os setores, prosseguiu-se os isolamentos em placa. Logo, a outra subamostra (S1b; S2b; S3b; S4b) que não teve contato com a luz UV, foi utilizada para plaqueamento e repique, garantindo a integridade do inóculo, conforme mostra a figura 5.

Figura 5 - Esquema do preparo dos inóculos com meio de cultura cromogênico Colilert para as amostras dos quatro setores



Fonte: Própria autoria (2021).

3.2.5 Inóculos e repiques dos isolados

Após as primeiras 24 horas, obteve-se os isolados bacterianos nas placas de Petri contendo a membrana filtrante dos meios EC e LSB. Uma colônia presuntiva e característica,

por amostra, foi selecionada aleatoriamente para prosseguir os testes e para tanto, submetida a um novo crescimento que permitiu isolar a cepa em questão. Foram preparados inóculos em caldo nutriente contendo o microrganismo isolado nas placas em *Caldo Mueller Hinton* com pH $7,3 \pm 0,2$ em Incubadora Shaker Luca 220 – Lucadema®, regulada em 140 rpm, com temperatura constante de 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, realizou-se o repique dos inóculos em meio ágar seletivo, utilizando os mesmos meios da primeira fase do estudo.

Por outro lado, o inóculo do Colilert incubado no dia anterior, foi repicado (quando constatada a presença) em meio não seletivo *Agar Mueller Hinton* a 36,5 °C por 24 horas para verificar o surgimento de colônias.

Após os repiques, conseguiu-se placas com colônias definidas, que foram utilizadas para as fases posteriores do estudo. Diante disso, obteve-se três placas com isolados bacterianos de *E. coli* selvagem de cada um dos quatro setores estudados

3.2.6 Cultura Estoque

As cepas foram armazenadas em cultura estoque para demais estudos. As culturas de estoque foram armazenadas a -20 °C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) com 20% e 80% (vol.vol⁻¹) de glicerol (KOUADIO-NGBESSO et al., 2019).

3.2.7 Coloração de Gram

Para caracterizar e classificar presuntivamente as bactérias, a coloração de Gram faz-se muito importante, pois é uma técnica diferencial que permite distinguir dois tipos de bactérias com base em suas características da parede celular (MOYES; REYNOLDS; BREAKWELL, 2009).

3.2.8 Teste da Catalase

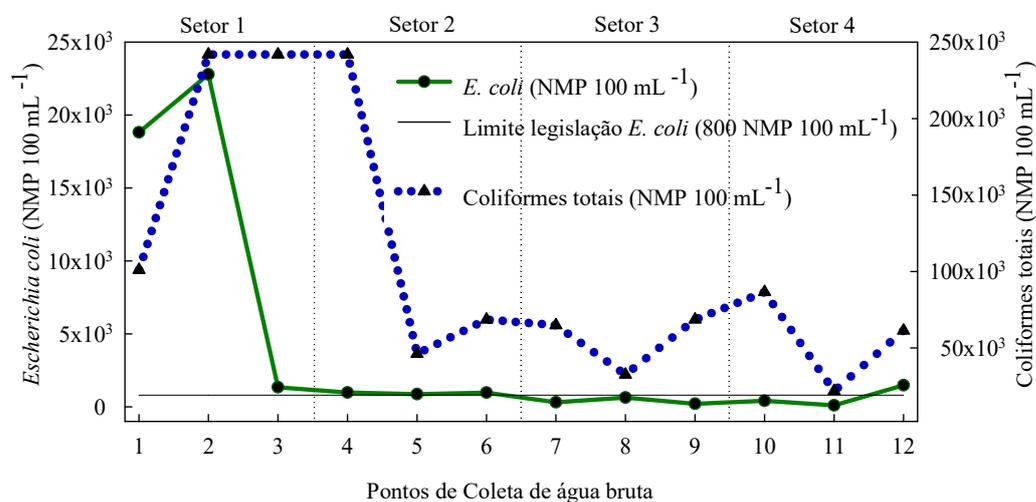
Juntamente com a morfologia observada na coloração de Gram, o Teste da catalase auxilia como uma próxima prova bioquímica na identificação das bactérias (ANVISA, 2013).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise Microbiológica: Determinação da presença ou ausência e quantificação de *Escherichia coli*

O presente trabalho avaliou a presença de bactérias alvo, para tanto, a figura 6 traz os valores de NMP, tanto para coliformes totais, quanto para *E. coli*, distribuídos em plumas de contaminação, verificável através de cada setor em análise. A abordagem quantitativa é importante pois fornece subsídio do panorama de distribuição de contaminação fecal ao longo do Lajeado Pardo e ganha sustentação na medida que elucida de maneira geral o mesmo comportamento observado pelo estudo de Volpi et al. (2021, *no prelo*). Para tanto, é possível observar nos dois estudos que a maior contaminação está presente no setor 1, ou seja, o ponto mais a jusante das coletas, situado na represa de captação de água da CORSAN, diminuindo consideravelmente com algumas oscilações, no sentido jusante-montante (represa-nascente). As oscilações podem ser devido à distribuição local desigual dos nutrientes e fontes pontuais e difusas de poluição (PATEL et al., 2016), e da contribuição diversificada das bacias hidrográficas que permeiam o lajeado.

Figura 6 – Plumagens de contaminação por coliformes totais e *E. coli*, setorizadas no Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil



Fonte: Própria autoria (2021).

Por não possuir enquadramento, o Lajeado Pardo é enquadrado em classe 2, seguindo o disposto no Art. 42 da Resolução CONAMA 357 de 2005 (BRASIL, 2005) e na Resolução CNRH n° 91 (BRASIL, 2008). Devido a essa classificação, permite a recreação de contato primário e captação para tratamento convencional e abastecimento público. Todavia, a legislação CONAMA 274 de 2000 (BRASIL, 2000), preconiza que para contato primário a

água é considerada própria para tal uso, classificada como satisfatória, quando possuir 80% das amostras com o máximo de 800 *E. coli* 100 mL⁻¹. Portanto, é possível sugerir que para o presente estudo, conforme tabela 1, 58,33% das amostras ficaram acima do limite máximo permitido por legislação para classe 2.

Tabela 1 – Tabulação do NMP de coliformes totais e *E. coli* pelo Sistema Quanti-Tray/2000, Colilert IDEXX®

Setor	Ponto	*NMP <i>E. coli</i>	*NMP Coliformes totais
1	1	18.820**	101.120
	2	22.790**	241.960
	3	1.339**	241.960
2	4	980**	241.960
	5	860**	46.110
	6	970**	68.670
3	7	310	64.880
	8	630	32.550
	9	200	68.670
4	10	410	86.640
	11	100	21.870
	12	1.480**	61.310

Fonte: Própria autoria (2021).

* Número mais provável.

** NMP de *E. coli* acima do limite máximo permitido pela legislação CONAMA 357/2005 para classe 2 e CONAMA 274/2000 que dita critérios de balneabilidade para águas brasileiras.

Por estar inserido ao longo de cinco microbacias agrícolas, vários são os fatores que podem estar condicionando esse alto número de bactérias da espécie *E. coli* no Lajeado Pardo, apresentados na tabela 1. Os resíduos humanos em conjunto com a agricultura são fontes importantes de contaminação dos sistemas aquáticos (ALEGBELEYE; SANT'ANA, 2020) e o uso da terra é conhecido por desempenhar um papel importante na inoculação, persistência e disseminação de bactérias indicadoras fecais (ZHANG et al., 2012). Ademais, o despejo indiscriminado de resíduos não tratados neste ambiente aquático pode causar deterioração física, química e biológica da água (KOUADIO-NGBESSO et al., 2019).

Esses fatores, podem estar potencializando os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que a agricultura, responsável por grande parte da economia que gira no município de FW, aliada a falta de saneamento e mal uso do solo e água, podem desencadear o surgimento de microrganismos, muitas vezes patogênicos, nas águas ambientais.

Segundo estudo realizado por Ritter et al. (2015) nas áreas ao entorno do Lajeado Pardo, que realiza um diagnóstico acerca do manejo do mesmo, apontando que ao longo do percurso do lajeado, a área apresenta problemas com solo descoberto, falta de vegetação marginal, curso d'água interrompido, construções instaladas em zonas de drenagem, despejo inadequado de efluentes no curso e disposição incorreta de resíduos.

Pedde e Nascimento (2020) analisaram as águas balneárias rurais da Bacia Hidrográfica dos Sinos, situado no estado do Rio Grande do Sul. Em seu levantamento, constataram igualmente parâmetros superiores ao máximo permitido pela legislação CONAMA nº 274 de 2000, sendo que na primeira e segunda etapa das coletas, todos os três pontos amostrados estavam >800 NMP 100 mL^{-1} . Por outro lado, Bortoli et al. (2018) avaliaram a qualidade microbiológica da principal fonte de abastecimento humano e dessedentação animal água do Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, sendo que algumas amostras se mostraram acima do limite máximo permitido por legislação, evidenciando que a população consome água sem garantia de qualidade. Em nascentes da região Sul do Brasil, os valores variaram <2 a 3000 em Caiçara, Rio Grande do Sul (LAZAROTTO et al., 2020) e em Cunha Porã, Santa Catarina, os valores foram de 22 para >200 NMP 100 mL^{-1} (GALVAN et al., 2020).

O monitoramento da qualidade da água tem o potencial de servir como um mecanismo de feedback crítico para apoiar o desenvolvimento e operação de fontes de água que promovam a saúde pública (TRENT et al., 2018). Diante disso, o presente estudo constatou altos nível de *E. coli* presentes na água, levantando um alerta para as possíveis consequências que poderão surgir, principalmente acerca a saúde pública das pessoas que fazem uso desse manancial para diversos usos.

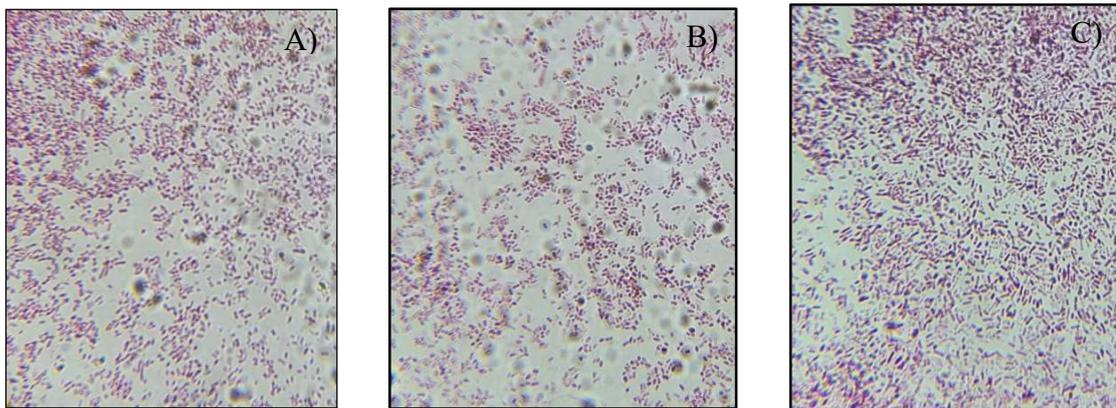
3.3.2 Isolamento de *Escherichia coli* em amostras de água bruta em placa com o uso de três meio seletivos distintos e testes bioquímicos

Após os inóculos iniciais e respectivos repiques serem feitos com todas as amostras analisadas, foi possível constatar a presença de *E. coli* em todos os setores, para todos os meios seletivos utilizados.

Vários trabalhos foram realizados com a premissa de comparar métodos para análise de *E. coli* em amostras de água (MARQUEZI; GALLO; DIAS, 2010; NIEMI et al., 2001; WALKER et al., 2017) uma vez que ainda encontra-se diferença nas análises realizadas com meios seletivos distintos, tanto para enumeração quanto para detecção da espécie.

A partir das colônias isoladas de cada um dos setores, em cada um dos meios, prosseguiu-se com testes bioquímicos para auxiliar na confirmação de *E. coli* nas amostras. Na coloração de Gram, todos os isolados apresentaram características semelhantes a *E. coli* padrão, alguns exemplos podem ser observados na figura 7.

Figura 7 – Coloração de Gram para amostras de *E. coli*, coletadas no Lajeado do Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil



Fonte: Própria autoria (2021).

A) Meio EC: ponto 1; B) Meio LSB: ponto 1; C) Meio Colilert: ponto 1.

*Imagens sem escala

O segundo teste bioquímico realizado foi o teste da catalase, conforme figura 8, todas as 12 cepas foram catalase positivas. Esse resultado é mais um indicativo de confirmação para as cepas isoladas de *E. coli*.

Figura 8 – Teste da Catalase para amostras de *E. coli*, coletadas no Lajeado do Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil



Fonte: Própria autoria (2021).

A) Materiais para teste da catalase. B) Teste da catalase positivo – formação de bolhas.

Através dos isolamentos em placa e teste bioquímicos, foi possível constatar em uma primeira análise a presença da espécie alvo nas amostras de água bruta dos quatro setores amostrados, oriundas do monitoramento do Lajeado Pardo. Por outro lado, é importante mencionar que testes em placa não garantem com 100% de certeza a identificação das bactérias selvagens. Embora úteis e fáceis de operar, os meios à base de ágar e os testes bioquímicos não são completamente específicos, portanto, muitas vezes é necessária uma confirmação adicional da identidade da espécie (MAUGERI et al., 2019).

Nesse sentido, é importante destacar que para trabalhos futuros, uma alternativa que garante maior confiabilidade nos resultados é a utilização de testes moleculares. A PCR em tempo real (PCR quantitativo, qPCR) por exemplo, é um método bem estabelecido para a detecção, quantificação e tipagem de diferentes agentes microbianos (HAFNER; HARTER; PARIKH, 2016).

3.4 CONCLUSÕES

Foi possível observar a presença de *Escherichia coli* e coliformes totais ao longo do percurso analisado do Lajeado Pardo. Na estimativa de NMP de *Escherichia coli*, 58,3% das amostras estavam acima do limite máximo (800 NMP) permitido pela legislação CONAMA nº 357 de 2005 para enquadramento em classe II do Lajeado. Nesse sentido, conclui-se em primeira análise que as águas não são próprias para recreação.

Os maiores níveis de coliformes totais e *Escherichia coli* foram encontrados no setor 1, que fica localizado junto a represa de captação da água bruta para tratamento. Diante disso, é importante mencionar que o setor recebe a contribuição de todas as cinco microbacias que permeiam o Lajeado Pardo, sendo um forte indicativo e justificativa para os valores mais altos de *Escherichia coli* encontrados nesse setor.

No isolamento das bactérias a partir dos três meios de cultura utilizados e testes bioquímicos, foram detectados em todos os setores e em todos os meios a presença do microrganismo alvo: *Escherichia coli* selvagem. Além disso, tem-se como premissa para futuros trabalhos a utilização de testes complementares.

3.5 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO (ANA). **Caderno de Recursos Hídricos - 1: Panorama da Qualidade das Águas Superficiais no Brasil**. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO (ANA). **Brasil tem cerca de 12% das reservas mundiais de água doce do planeta**. 2010. Disponível em: <<https://www.ana.gov.br/noticias-antigas/brasil-tem-cerca-de-12-das-reservas-mundiais-de-a.2019-03-15.1088913117>>. Acesso em: 9 jun. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Módulo 6: Detecção e Identificação e Bactérias de Importância Médica, Brasília, p. 150, v. 9, 2013. Disponível em: <https://spdbcfmusp.files.wordpress.com/2014/09/iras_modulodeteccaobacterias.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2021.

ALEGBELEYE, O. O.; SANT'ANA, A. S. Manure-borne pathogens as an important source of water contamination: An update on the dynamics of pathogen survival/transport as well as practical risk mitigation strategies. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 227, p. 113524, jun. 2020. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463920300262>. Acesso em: 24 jan, 2021. DOI: 10.1016/j.ijheh.2020.113524.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. **Choice Reviews Online**, v. 49, n. 12, p. 49-6910-6949, Ago. 2012. Disponível em: <<http://choicereviews.org/review/10.5860/CHOICE.49-6910>>. Acesso em: 17 mai. 2021. DOI: 10.5860/CHOICE.49-6910 .

BORTOLI et al. Microbiological evaluation of water in rural dairy farms located in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.12, n.1, p. 39 – 53, 2018. Disponível em: <<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/download/426/2290>>. Acesso em: 18 jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20180005>

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial da União**, 2000.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Resolução nº 91, de 05 de novembro de 2008. **Diário Oficial da União**, Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH), 2008. Disponível em: <http://piranhasacu.ana.gov.br/resolucoes/resolucaoCNRH_91_2008.pdf>. Acesso em: 03 mar, 2021.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual Prático de Análise de Água**, p. 153, 2013. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 28 ago, 2020.

BRASIL. Instituto Trata Brasil. **Dia Mundial da Saúde: veja quais são as principais doenças por falta de saneamento**, 2021. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/blog/2021/04/06/dia-mundial-da-saude-veja-quais-sao-as-principais-doencas-por-falta-de-saneamento/>>. Acesso em: 4 jun. 2021a.

CHEN, Z. et al. Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water sources in Hangzhou City. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1133-1144, Jun. 2017. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01133/full>>. Acesso em: 14 Sep. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01133.

CHEN, J. et al. Survey of pathogenic bacteria of biofilms in a metropolitan drinking water distribution system. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 20, Oct. 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31697369/>>. Acesso em: 17 mai, 2021. DOI: 10.1093/femsle/fnz225.

CONTI, I. L.; SCHROEDER, E. O. **Convivência com o Semiárido Brasileiro: Autonomia e Protagonismo Social**. Brasília: Editora IABS, 2013. Disponível em: < http://plataforma.rede-san.ufrgs.br/biblioteca/mostrar_bib.php?COD_ARQUIVO=17909>. Acesso em: 17 mai. 2021.

GALVAN, K. A.; et al. Análise ambiental macroscópica e a qualidade da água de nascentes na bacia do Rio São Domingos/SC, Brasil. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11(1), p. 165-176, 2020. DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2020.001.0016

GLOWACKI, D. S.; CRIPPA, L. B. Avaliação microbiológica da qualidade da água em bebedouros de uma instituição de ensino superior de Caxias do Sul-RS. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 51, n. 2, p. 149-153, 2019. Disponível em: < <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/11/1024961/rbac-vol-51-2-2019-ref-752.pdf>>. Acesso em: 02 jan. 2021. DOI: 10.21877/2448-3877.201900752.

HAFNER, S. C.; HARTER, T.; PARIKH, S. J. Evaluation of Monensin Transport to Shallow Groundwater after Irrigation with Dairy Lagoon Water. **Journal of Environmental Quality**, v. 45, n. 2, p. 480-487, Mar. 2016. Disponível em: < <http://doi.wiley.com/10.2134/jeq2015.05.0251>>. Acesso em: 27 de mar, 2021. DOI: 10.2134/jeq2015.05.0251

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Cidades e Estados**. Frederico Westphalen, 2010. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/frederico-westphalen.html>>. Acesso em: 14 fev, 2020.

JIN, D. et al. Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13368, Dec. 2018. Disponível em: < <http://www.nature.com/articles/s41598-018-31706-w>>. Acesso em: 08 out, 2020. DOI: 10.1038/s41598-018-31706-w.

JOSÉ FIGUERAS, M.; BORREGO, J. J. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7, n. 12, p. 4179-4202, Dec. 2010. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1660-4601/7/12/4179>>. Acesso em: 17 nov, 2020. DOI: 10.3390/ijerph7124179.

KOUADIO-NGBESSO, N. et al. Comparative Biotypic and Phylogenetic Profiles of *Escherichia coli* Isolated from Resident Stool and Lagoon in Fresco (Côte d'Ivoire). **International Journal of Microbiology**, v. 2019, p. 1-7, Nov. 2019. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2019/9708494/>>. Acesso em: 14 fev, 2020. DOI: 10.1155/2019/9708494.

LAZAROTTO, D. V. et al. Análise da potabilidade da água em poços rasos no município de Caiçara no Rio Grande do Sul. **Ciência e Natura** (no prelo), 2020.

MAAL-BARED, R. et al. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 315–323, Jan. 2013. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969712014258>>. Acesso em: 27 fev, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.106.

MALLMANN, W. L.; DARBY, C. W. Uses of a Lauryl Sulfate Tryptose Broth for the Detection of Coliform Organisms. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 31, n. 2, p. 127–134, fev. 1941. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1531262/>>. Acesso em: 12 mar. 2020. DOI: 10.2105/ajph.31.2.127.

MARQUEZI, M. C.; GALLO, C. R.; DIAS, C. T. dos S. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 291–296, 2010. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/ria-lutz/article/view/6329/6023>>. Acesso em: 07 nov. 2020.

MAUGERI, G. et al. Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents: A Review of Current and Future. **Trends Biotechnology Journal**, v.14, n. 1, 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30024110/>>. Acesso em: 22 fev, 2021. DOI: 10.1002/biot.201700750.

MENEZES, J. P. C. et al. Relação entre padrões de uso e ocupação do solo e qualidade da água em uma bacia hidrográfica urbana. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 519–534, set. 2016. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522016000300519&lng=pt&tlng=pt>. Acesso: 03 mai. 2021. DOI: 10.1590/S1413-41522016145405.

MOYES, R. B.; REYNOLDS, J.; BREAKWELL, D. P. Differential staining of bacteria: Gram stain. **Current Protocols in Microbiology**, 2009. Disponível em: < <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9780471729259.mca03cs15>>. Acesso em: 07 mar, 2021. DOI: 10.1002/9780471729259.mca03cs15.

NIEMI, R. M. et al. Comparison of methods for determining the numbers and species distribution of coliform bacteria in well water samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 850-858, Jun. 2001. Disponível em: < <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2001.01314.x>>. Acesso em: 07 mai. 2021. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01314.x

PATEL, C. B. et al. Q-PCR based culture-independent enumeration and detection of enterobacter: An emerging environmental human pathogen in riverine systems and potable water. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 172-182, Feb. 2016. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389>>. Acesso em: 14 jun, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00172.

PEDDE, Y. G.; NASCIMENTO, C. A. Comparação da quantificação de *Escherichia coli* entre balneários rurais em relação ao índice pluviométrico. **The Journal of Engineering and**

- Exact Sciences**, v. 6, n.3, p. 1-4, 2020. Disponível em: < <https://periodicos.ufv.br/jcec/article/view/10675/5920>>. Acesso em: 18 jan. 2022. DOI: 10.18540/jcecvl6iss3pp0383-0386.
- PEPPER, I.L.; GERBA, C.P.; BRUSSEAU, M.L. **Pollution Science**. San Diego: Academic Press, 1996. Disponível em: < <https://www.worldcat.org/title/pollution-science/oclc/605188996>>. Acesso em: 18 jan. 2022.
- RASCHLE, S. et al. Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-11, 2021. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-021-88514-y.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88514-y>.
- RITTER, L. G. et al. Manejo da microbacia do Lajeado Pardo. **Holos**, v. 6, p. 123, dez. 2015. Disponível em: < <http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/1685>>. Acesso em: 17 mar, 2021. DOI: 10.15628/holos.2015.1685.
- ROCHELLE-NEWALL, E. et al. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-15, Apr. 2015. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00308/full>>. Acesso em: 14 nov, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00308.
- TRENT, M. et al. Access to Household Water Quality Information Leads to Safer Water: A Cluster Randomized Controlled Trial in India. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 9, p. 5319–5329, Mai. 2018. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.8b00035>>. Acesso: 17 fev. 2021. DOI: 10.1021/acs.est.8b00035.
- UNITED NATIONS CHILDREN’S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION. (UNICEF; WHO). **Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017: Special focus on inequalities**. New York, 2019. Disponível em: < <https://www.unicef.org/brazil/comunicados-de-imprensa/1-em-cada-3-pessoas-no-mundo-nao-tem-acesso-agua-potavel-dizem-unicef-oms>>. Acesso em: 14 Dec. 2020.
- VOLPI, G. B. et al. (*no prelo*) **Parâmetros de qualidade de água avaliados na microbacia Lajeado Pardo no município de Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, RS.
- WALKER, D. I. et al. A highly specific Escherichia coli qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. **Water Research**, v. 126, p. 101–110, 1 Dec. 2017. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135417306942>>. Acesso em: 09 out. 2020. DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.032.
- ZHANG, W. et al. A Statistical Assessment of the Impact of Agricultural Land Use Intensity on Regional Surface Water Quality at Multiple Scales. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 11, p. 4170-4186, Nov. 2012. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1660-4601/9/11/4170>>. Acesso em: 17 mai. 2021. DOI: 10.3390/ijerph9114170.

4 CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO 2. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS DE *Escherichia coli* AMBIENTAIS DE MICROBACIAS AGRÍCOLAS DO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Evaluation of the antibiotic resistance profile of *Escherichia coli* environmental agricultural microbasins in the northwest Rio Grande do Sul state, Brazil

RESUMO

A resistência a antimicrobianos adquirida por bactérias é tema central em debate sobre o meio ambiente e as doenças emergentes de veiculação hídrica. Para tanto, o presente trabalho tem como objetivo, determinar a sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos previamente isolados do Lajeado Pardo, que possui contribuição de cinco microbasins, caracterizadas como agrícolas e situadas no noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, sendo *Escherichia coli* alvo do estudo. Os cinco antibióticos testados foram: ampicilina (AMP), amoxicilina clavulanato (AMC), gentamicina (GEN), cloranfenicol (CLO) e ciprofloxacina (CIP), sendo as bactérias avaliadas segundo o seu perfil de resistência, resistência intermediária e sensibilidade a esses agentes. A metodologia utilizada subscreve-se como Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA). A análise dos meios seletivos de isolamento (LSB, Colilert e EC) mostrou que todos os meios diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Diante disso, é possível inferir que o meio seletivo para isolamento das bactérias influenciou no resultado do TSA. O TSA mostrou que das 12 cepas selvagens testadas, nenhuma apresentou o mesmo comportamento frente aos antibióticos, sendo que a AMP foi o antibiótico de maior resistência as bactérias (100%), seguida de AMC (66,60%), CIP (58,20%), CLO (50%) e GEN (33,20%). A GEN se mostrou o antibiótico mais eficiente, podendo ser classificada em primeira análise como uma monoterapia satisfatória. Do total de amostras ($n=12$) nos quatro setores, 83,33% ($n=10$) apresentaram resistência a múltiplos antimicrobianos. A alta taxa de *Escherichia coli* multirresistente sugere um risco potencial para a saúde da população, quando a mesma utiliza água bruta, sem o devido tratamento. Diante disso, políticas de monitoramento de mananciais de água bruta para os mais diversos usos são relevantes, na premissa de analisar constantemente a qualidade de água e diminuir o risco associado às doenças de veiculação hídrica.

Palavras-chave: Bacia hidrográfica. Recursos Hídricos. Resistência Antimicrobiana. Saúde Pública.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance acquired by bacteria is a central issue in the debate on the environment and emerging waterborne diseases. Therefore, the present work aims to determine the *in vitro* bacterial susceptibility to antimicrobial agents previously isolated from Lajeado Pardo, which has the contribution of five microbasins, characterized as agricultural and located in the northwest of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, *Escherichia coli* being the target of the study. The five antibiotics tested were: ampicillin (AMP), amoxicillin clavulanate (AMC), gentamicin (GEN), chloramphenicol (CLO) and ciprofloxacin (CIP). agents. The methodology used subscribes to the Antimicrobial Sensitivity Test (TSA). The analysis of the selective isolation media (LSB, Colilert and EC) showed that all media differed statistically from each other ($p < 0.05$). Therefore, it is possible to infer that the selective medium for the isolation of bacteria influenced the TSA result. The TSA showed that of the 12 wild strains tested, none showed the same behavior against antibiotics, and AMP was the antibiotic with the highest

resistance to bacteria (100%), followed by AMC (66.60%), CIP (58, 20%), CLO (50%) and GEN (33.20%). GEN proved to be the most efficient antibiotic, and can be classified at first glance as a satisfactory monotherapy. Of the total samples (n=12) in the four sectors, 83.33% (n=10) showed resistance to multiple antimicrobials. The high rate of multidrug-resistant *Escherichia coli* suggests a potential risk to the health of the population when it uses raw water without proper treatment. In view of this, policies for monitoring raw water sources for the most diverse uses are relevant, on the premise of constantly analyzing water quality and reducing the risk associated with waterborne diseases.

Keywords: Hydrographic basin. Water resources. Antimicrobial Resistance. Public health.

4.1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da antibiose por Alexander Fleming em 1928, as doenças infecciosas ainda permanecem como uma das principais causas de morte em todo o mundo, aumentando de forma exponencial nos últimos 15 anos (WHO, 2017). As bactérias possuem papel expressivo na disseminação de doenças nosocomiais e comunitárias, com alto índice de internações da população, principalmente nos países subdesenvolvidos.

A resistência a antimicrobianos adquirida por bactérias é tema central em debate sobre o meio ambiente e as doenças emergentes de veiculação hídrica. O aumento do uso de antibióticos leva ao surgimento e disseminação da resistência antimicrobiana (AMR), pautada como um grande desafio para a saúde global (LUCIEN et al., 2021), prejudicamento o tratamento eficaz de várias doenças infecciosas (JOHURA et al., 2020).

Os microrganismos são ao longo do tempo, submetidos à seleção *darwiniana* ao acaso, desenvolvendo alguns mecanismos rigorosos e escapando dos efeitos letais das substâncias antimicrobianas (ASLAM et al., 2018). Todavia, atualmente a resistência tem sido atrelada principalmente aos efeitos das relações antrópicas com o meio ambiente e seu consequente desequilíbrio.

O uso excessivo e o fato de que os antibióticos não podem ser completamente metabolizados, tem por consequência excrementos inalterados que vão parar nos sistemas de dejetos (WATKINSON; MURBY; COSTANZO, 2007), tratamentos de esgoto ou na pior das hipóteses nos mananciais de água. A situação fica ainda mais preocupante ao passo que, os processos tradicionais de tratamento de águas residuárias só podem remover de 20 a 80% dos produtos farmacêuticos e seus metabólitos (KOVALOVA et al., 2012), fazendo com que direta ou indiretamente os antibióticos sejam emitidos no ambiente (CHEN et al., 2021), inclusive pelas águas residuárias.

A contaminação das águas superficiais e, particularmente a contaminação com bactérias derivadas de fezes, tem há muito tempo levantado uma preocupação com a qualidade da água devido ao potencial de transmissão de doenças (TITILAWO et al., 2015).

O desenvolvimento e a disseminação da resistência aos antibióticos estão limitando progressivamente as opções de tratamento e profilaxia para a maioria dos patógenos bacterianos, ameaçando componentes essenciais da medicina moderna (HUTINEL et al., 2019). A carga global da AMR não tem sinais de recuar, ao invés disso, aumenta a pressão sobre as medicinas humana e veterinária. Semelhante ao aquecimento global, AMR é uma calamidade ecológica de magnitude indefinida e não tem saída aparente (ASLAM et al., 2018). Segundo Miranda et al. (2020), a AMR já é conhecida mundialmente, atrelada a preocupações políticas crescentes, com grave repercussão social, econômica, de saúde pública humana e animal.

Nos últimos anos, tem havido um aumento na incidência de infecções críticas em que o agente etiológico são bactérias gram-negativas resistentes a múltiplos antibióticos, em particular *Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas e carbapenem (JOHURA et al., 2020). Nesse sentido, *E. coli* é considerado um dos patógenos mais perigosos, porque algumas cepas podem causar doenças graves, incluindo diarreia severa, infecções do trato urinário, inflamações e peritonite (CIMA-FONTE et al., 2020). Devido ao aumento dos problemas com a resistência aos antibióticos, uma peça fundamental na orientação sobre o tratamento de primeira linha é portanto, a vigilância atualizada das taxas de resistência aos antibióticos (HUTINEL et al., 2019), principalmente em amostras ambientais.

O presente trabalho objetiva determinar a sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos, oriundas do monitoramento bacteriológico do Lajeado Pardo, que possui contribuição de cinco microbacias caracterizadas como agrícolas e situadas no noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, sendo *E. coli* a espécie alvo do estudo.

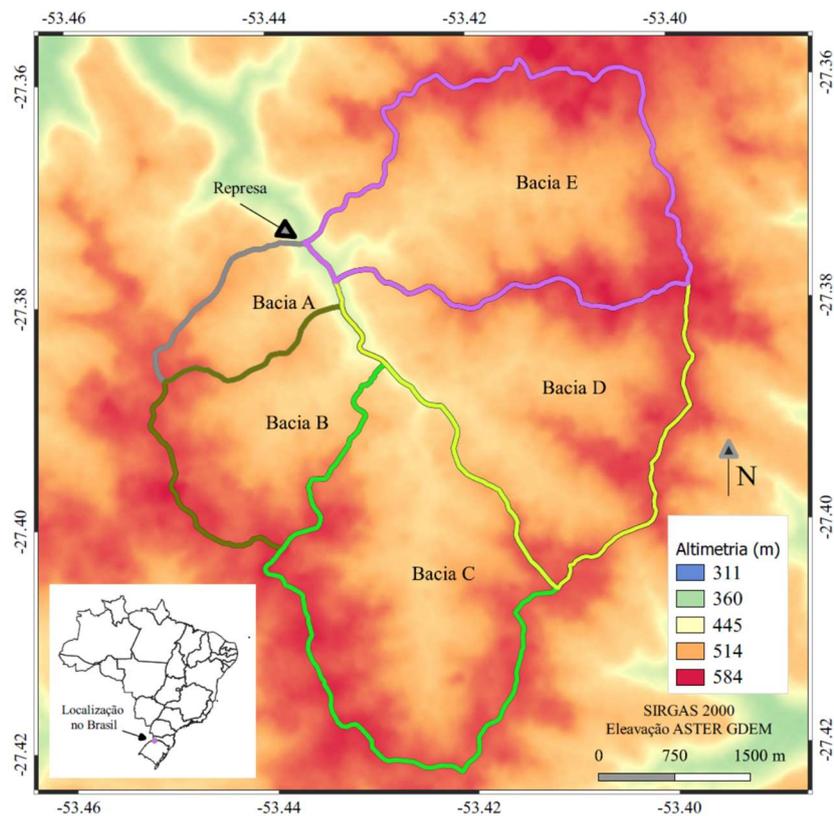
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Isolamento bacteriano de amostras de água

Inicialmente foram realizadas coletas de água no Lajeado Pardo localizado no município de Frederico Westphalen estando localizado na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O lajeado possui a contribuição de cinco microbacias agrícolas, conforme figura 1. Segundo a Embrapa (2011), o foco dessa região hidrográfica é a criação de aves, suínos, bovinos, irrigação entre outros. O lajeado possui uma extensão de 5.700 m, tem sua nascente

nas coordenadas - latitude: $27^{\circ} 25' 43''$ S e longitude: $53^{\circ} 43' 25''$ W, com uma altitude média de 488 m.

Figura 1 – Microbacias hidrográficas que contribuem para o Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil



Fonte: Volpi et al. (2021, *no prelo*).

Por não haver legislação que dite os critérios para coleta de amostras de água bruta para análises ambientais (RASCHLE et al., 2021), foram determinados pontos de coleta de água da nascente até o ponto de represamento para captação de água que abastece os municípios de Frederico Westphalen e Caiçara, sendo o percurso amostrado dividido em quatro setores de amostra (VOLPI et al., 2021, *no prelo*) onde em cada setor, foram definidos três pontos de coleta de água, levando em consideração a divisão de pontos pela extensão do Lajeado. Dessa maneira, o setor 1 ficou localizado na represa de água, utilizada para captação e posterior tratamento, o setor 2 e 3 são setores medianos do percurso e o setor 4 fica situado na nascente do lajeado.

Foi realizada uma única campanha de coleta, onde a mesma foi composta por três amostras coletadas em cada um dos quatro setores/sessões amostrados, totalizando 12 pontos

ao longo do percurso. A coleta aconteceu em janeiro de 2021 e ocorreu de jusante a montante do curso do Lajeado (contra fluxo).

O isolamento bacteriano das amostras de água foi realizado em placa, com a utilização de três meios seletivos distintos: EC, LSB, Colilert. Foi utilizada a metodologia de membrana filtrante para os meios EC e LSB. Os inóculos foram preparados em meio de cultura caldo *Mueller Hinton* e posteriormente repicados nos respectivos meios seletivos. Já com o meio Colilert foi inoculada as amostras no mesmo, na presença de fluorescência prosseguiu-se para repique em placa contendo ágar MH e novamente repicado em caldo Colilert.

Foram realizados os repiques até se obter um isolamento de colônias bem definidas em cada amostra, quando comparado ao padrão de *E. coli* ATCC® 25922TM. Foram realizados alguns testes bioquímicos (catalase e coloração de *Gram*) para identificação das colônias oriundas da água bruta e quando houve a confirmação em todos os testes supracitados, as colônias de *E. coli* passaram pelo teste do TSA.

4.2.2 Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

Essa técnica é destinada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* no tocante dos agentes antimicrobianos. A realização desse teste é fundamental nos estudos de bactérias isoladas do meio ambiente, uma vez que com mais frequência esses microrganismos vêm desenvolvendo mecanismos de resistência aos fármacos antimicrobianos oriunda de características próprias ou de capacidade adquirida, o que exige cada vez mais cautela na escolha dos antibióticos usualmente utilizados (JORGENSEN et al., 2017).

De posse da seleção e do isolamento das cepas bacterianas das amostras positivas oriundas do Lajeado Pardo, através de três meios seletivos distintos, procedeu-se à execução do antibiograma (BAUER et al., 1966). Ao todo foram 3 cepas oriundas de cada setor de estudo, isoladas cada uma a partir de um meio seletivo distinto (LSB, Colilert e EC). Partindo desse pressuposto e considerando os quatro setores amostrados, ao todo haviam 12 cepas presuntivas de *E. coli* que prosseguiram para o TSA. Foram realizados testes em triplicata para cada uma das 12 cepas. A cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi usada como cepa de controle de qualidade.

O padrão de sensibilidade aos antibióticos foi determinado contra 5 antibióticos usados para o grupo das *Enterobacteriaceae* pelo método de difusão em disco *Kirby-Bauer* (BAUER et al., 1966), metodologia também preconizada pela Portaria nº 64 de 11 de dezembro de 2018 que trata sobre as normas de interpretação para o TSA nos laboratórios em todo território brasileiro (BRASIL, 2018). A escolha dos antibióticos obedeceu às sugestões da *Federal Drug*

Administration (FDA) em conjunto com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) (CLSI, 2019) (traduzido do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*) que são padrões adotados nos Estados Unidos e também indicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil. Os antibióticos escolhidos e suas respectivas concentrações foram: ampicilina (AMP) – 10 mcg, gentamicina (GEN) – 10 mcg, ciprofloxacina (CIP) – 5 mcg, amoxicilina clavulanato (AMC) – 20/10 mcg, cloranfenicol (CLO) – 30 mcg.

Após o período de incubação, os halos de inibição formados ao redor do disco de cada antibiótico, foram medidos em milímetros (mm), com o auxílio de um paquímetro digital, conforme figura 2.

Figura 2 – Paquímetro digital para medição de diâmetro de halo no TSA



Fonte: Própria autoria (2021).

Posteriormente, os diâmetros medidos foram comparados com os diâmetros de referência (CLSI, 2019) para a classificação sensível (S), resistente intermediário (I) ou resistente (R), fornecidos pelo fabricante dos discos de antibióticos, conforme quadro 1. Para além disso, considerou-se resistentes as cepas que obtiveram resistência intermediária confirmada para um determinado antibiótico, partindo do princípio que as referidas cepas já possuem traços de resistência intrínseca a elas.

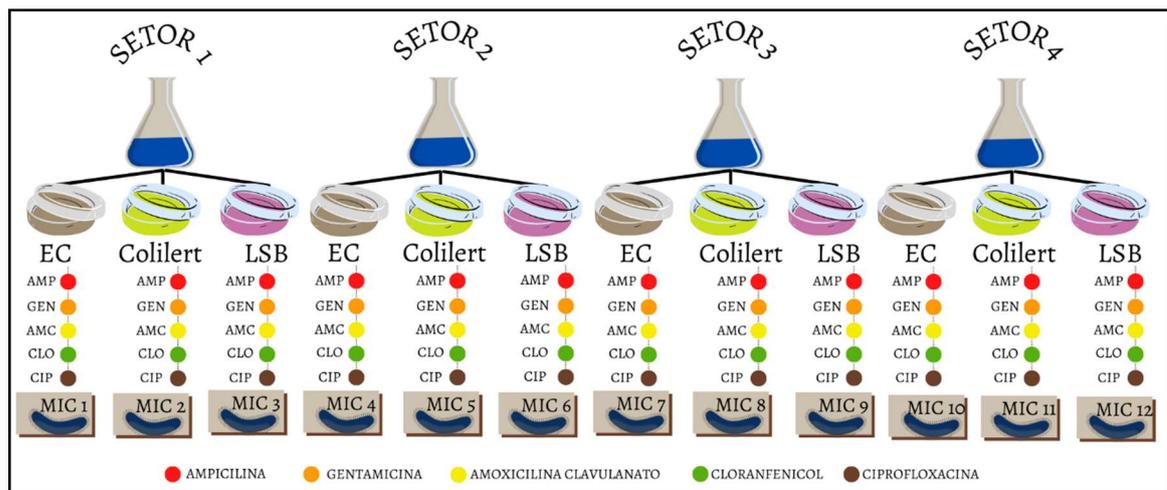
Quadro 1 – Valores de halos inibitórios esperados para *Enterobacteriaceae* no TSA

Classe antimicrobiana*	Disco antibiótico e concentração	S (mm)	I (mm)	R (mm)
β-lactâmicos	AMP10 (10 µg)	≥17	14-16	≤13
	AMC10 (10 µg)	≥18	14-17	≤13
Aminoglicosídeos	GEN10 (10 µg)	≥15	13-14	≤12
Fenicóis	CIP05 (5 µg)	≥26	22-25	≤21
	CLO30 (30 µg)	≥18	13-17	≤12

Fonte: Adaptado de CLSI (2019) e Gebremedhin (2021) *.

A figura 3 mostra o resumo metodológico para isolamento de *E. coli* provenientes de amostras de água do Lajeado Pardo, e submissão das cepas ao TSA.

Figura 3 – Resumo metodológico dos isolados de *E. coli* provenientes de amostras de água do Lajeado Pardo-RS, Brasil, submetidos ao TSA



Fonte: Própria autoria (2021).

*Cores dos antibióticos meramente ilustrativas.

4.2.3 *Escherichia coli* resistente a múltiplos antibióticos

A resistência a múltiplos antibióticos pode ser definida como a resistência a pelo menos dois antibióticos (ODONKOR; ADDO, 2018) em que uma cepa é submetida. Logo, para o presente estudo foi criada uma tabela que apresenta o número de cepas com resistência múltipla em relação ao número total (n=12) de cepas isoladas.

Para o cálculo da resistência múltipla em *E. coli* ambientais isoladas de amostras de água bruta, considerou-se os antibióticos com resistência intermediária como sendo resistentes, uma vez que já apresentam níveis de resistência adquirida ao antibiótico. Nesse sentido, a eficiência do antibiótico apresenta-se comprometida, podendo não exercer efeito satisfatório no combate de uma possível doença.

4.2.4 Cultura Estoque

As culturas de estoque das 12 cepas isoladas, foram armazenadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) com glicerol a 20% a -20 °C para futuros usos (KOUADIO-NGBESSO et al., 2019).

4.2.5 Análise estatística

Os dados foram compilados através de duas análises estatísticas, sendo que ambas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de *Scott-Knott* ($p < 0,05$), usando o sistema computacional de análise estatística SISVAR (FERREIRA, 2011).

A primeira análise estatística comparou os três meios seletivos de isolamento de *E. coli* em amostras de água (LSB, Colilert e EC) em relação aos cinco antibióticos utilizados no TSA, sendo eles AMP, AMC, CIP, CLO e GEN. Quando houve interação significativa, foram realizados os desdobramentos.

A segunda análise estatística comparou os quatro setores amostrados em relação aos três meios seletivos de isolamento de *E. coli* em amostras de água (LSB, Colilert e EC) a partir dos diâmetros de halo oriundos do TSA. Quando houve interação significativa, foram realizados os desdobramentos.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Prevalência de *Escherichia coli* resistente a antibióticos e perfis de resistência a antibióticos em água bruta

O quadro 2 apresenta um resumo da resposta das cepas provenientes dos quatro setores amostrados, inoculados em cada um dos três meios seletivos para isolamento de *E. coli*, frente

ao TSA. Da análise infere-se que a resposta aos meios seletivos dentro de cada setor diferiu em todos os 12 casos, sendo que nenhum meio de cultura apresentou comportamento semelhante. Além de que, pode-se observar a diferença de comportamento das cepas nos quatro setores quando se compara os meios de cultivo bacteriano para enterobactérias. Com isso, é possível sugerir em primeira análise, tratar-se de diferentes subgrupos de *E. coli*, necessitando, todavia, de confirmação de espécie através de análise molecular.

Quadro 2 – Comportamento das 12 cepas de *E. coli* oriundas dos 4 setores amostrados e isoladas nos 3 meios seletivos. Lajeado Pardo, Frederico Westphalen-RS, Brasil

Meio	Setor 1					Setor 2				
	AMP	GEN	AMC	CLO	CIP	AMP	GEN	AMC	CLO	CIP
EC	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S
LSB	R	I	R	S	R	R	S	R	S	R
Colil	R	R	R	R	R	R	S	I	R	I

Meio	Setor 3					Setor 4				
	AMP	GEN	AMC	CLO	CIP	AMP	GEN	AMC	CLO	CIP
EC	R	S	S	S	S	R	S	S	S	I
LSB	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R
Colil	R	I	R	R	R	R	S	I	R	S

Fonte: Própria autoria (2021).

*S= Sensibilidade, I= Resistência Intermediária, R= Resistência.

Na tabela 1 são apresentados os resultados do TSA, o antibiótico menos eficaz foi a AMP, sendo que todas (100%) as amostras bacterianas submetidas ao TSA foram resistentes a esse antibiótico, seguida de AMC (66,6%), CIP (58,2%), CLO (50%) e GEN (33,20%).

Tabela 1 – Resultados do TSA provenientes de amostras de água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil

Antibiótico (concentração)	Nº de isolados suscetíveis (%)	Nº de isolados intermediários (%)	Nº de isolados resistentes (%)
AMP (10µg)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (100,0)
AMC (10µg)	4 (33,4)	2 (16,6)	6 (50,0)
GEN (10µg)	8 (66,8)	2 (16,6)	2 (16,6)
CIP (05µg)	5 (41,7)	2 (16,6)	5 (41,6)
CLO (30µg)	6 (50,0)	0 (0,0)	6 (50,0)

Fonte: Própria autoria (2021).

Corroborando com estudo de Jorgensen et al. (2017), que analisaram a ação de resistência de antibióticos frente a cepas de *E. coli* isoladas de águas para recreação na Noruega e perceberam que as cepas foram 100%, 35% e 20% resistentes a AMP, CIP e GEN, respectivamente. Ainda segundo dados fornecidos pelo estudo de Swedan e Alrub (2019), que testaram cepas de *E. coli* oriundas de fontes de água potável na Jordânia, constataram que a AMP, AMC e CIP, apresentaram 93,6%, 6,4% e 16,5% de resistência, respectivamente.

Sabendo que muitos dos antibióticos testados no presente estudo, também são comumente usadas na medicina humana, como por exemplo o CLO e a CIP que são usados contra gastroenterites (GEBREMEDHIN et al., 2021), a considerável resistência aos antimicrobianos observada na tabela 1, tanto para CIP quanto para CLO é significativa, sendo indicativo de que terapias usuais podem não ser eficientes nos casos em que as bactérias possuam perfil de resistência adquirida.

É notório perceber que apesar dos estudos terem sido realizados em regiões distintas do mundo, semelhanças frente ao padrão de resistência aos antibióticos podem ser percebidas. Isso enaltece ainda mais a importância da vigilância e monitoramento global, pois cada vez mais, percebe-se o aumento da prevalência de cepas resistentes. Por esse motivo, é importante chamar a atenção para o antibiótico AMP que se mostrou altamente resistente no presente, e demais estudos realizados anteriormente (ALRUB, 2019; CHEN et al., 2017; GEBREMEDHIN et al., 2021; JORGENSEN et al., 2017; MAAL-BARED et al., 2013; SWEDAN;).

Além da resistência intrínseca a um antibiótico, as cepas podem possuir padrão de multirresistência, o que torna a vigilância bacteriana ainda mais importante. Do total de amostras (n=12) nos quatro setores, 83,33% (n=10) apresentaram resistência a múltiplos antibióticos, ou seja, resistência a pelo menos dois antibióticos (ODONKOR; ADDO, 2018). Na tabela 2 é possível observar os padrões de múltipla resistência aos antibióticos.

Tabela 2 – Padrão de múltipla resistência aos antimicrobianos em *E. coli* selvagens isoladas de amostras de água no Lajeado Pardo, Frederico Westphalen-RS, Brasil

Nº	Padrão de multirresistência antimicrobiana	Meio seletivo	Isolados de <i>E. coli</i> (n = 10) nº de isolados resistentes (%)
Dois	AMP, AMC	LSB	1 (10%)
	AMP, CLO	EC	1 (10%)
	AMP, CIP	EC	1 (10%)
Três	AMP, AMC, CIP	LSB	1 (10%)
	AMP, AMC, CLO	COLILERT	1 (10%)
Quatro	AMP, AMC, CIP, GEN	LSB	1 (10%)
	AMP, AMC, CIP, CLO	COLILERT	1 (10%)
Cinco	AMP, GEN, AMC, CLO, CIP	LSB (1) COLILERT (2)	3 (30%)
Total			10 (100%)

Fonte: Própria autoria (2021).

Do total das cepas multirresistentes, 30% (n=3) foram resistentes aos cinco antibióticos testados, demonstrando alto poder de resistência adquirida, sendo duas isoladas em meio Colilert e uma em meio LSB. Faz-se pertinente a análise desses dados, uma vez que as cepas estudadas se encontram em um manancial utilizado principalmente para abastecimento público e recreação, podendo vir a contaminar as pessoas por via fecal-oral por consumo de água contaminada, e contato primário em águas de recreação. Através desses contatos as pessoas estarão sujeitas a desenvolver doenças, que podem ter os tratamentos de corriqueira escolha (antibióticos), comprometidos.

Outros estudos também investigaram a resistência a múltiplos antibióticos por cepas de *E. coli* oriundas de amostras de água bruta. O estudo de Odonkor e Addo (2018) que analisou a múltipla resistência a antibióticos de isolados de *E. coli* de fontes de água bruta, onde 48 isolados de *E. coli* (49,48% do total de isolados), exibiram resistência contra dois ou mais antibióticos, portanto classificados como multirresistentes.

O estudo de Jorgensen et al. (2017) constatou múltipla resistência a antibióticos em 52% das amostras de água recreativa coletadas (n = 82). Mesmo que o estudo tenha sido realizado na Noruega, onde o consumo de antibióticos em humanos e animais é altamente restrito, chama a atenção que a multirresistência a antimicrobianos por *E. coli* são facilmente detectadas em ambientes aquáticos.

As altas taxas de resistência antimicrobiana observadas no presente estudo para alguns medicamentos podem ter ocorrido devido ao processo natural, ou seja, decididas hereditariamente incluindo mutações cromossômicas (GEBREMEDHIN et al., 2021), ou ainda

devido ao acesso facilitado e abusivo dos agentes antimicrobianos para tratamento humano e animal, levando a uma pressão de seleção das cepas resistentes. Nesse ponto, é importante mencionar que segundo a Instrução Normativa nº 83 de 2021 que define a lista de substâncias classificadas como antimicrobianos de uso sob prescrição médica (BRASIL, 2021), os cinco antibióticos utilizados no presente estudo para o TSA (GEN, AMO, AMC, CIP, CLO) fazem parte dessa lista e devem, portanto, apenas ser utilizados sob prescrição de um profissional da saúde no Brasil. Todavia, sabe-se que muitos são os casos de uso indevido e sem orientação de médicos, que pode acarretar o uso e descarte incorreto desses antibióticos

4.3.2 Análises estatísticas do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA)

A análise estatística ANOVA comparou as médias dos cinco antibióticos utilizados para o TSA em relação às cepas de bactérias isoladas das amostras de água bruta, para cada um dos três meios seletivos de isolamento utilizados. Como houve interação significativa ($p < 0,05$) entre as variáveis analisadas, com $f = 0,00$, prosseguiu-se com o desdobramento dos tratamentos.

O primeiro desdobramento é apresentado na tabela 3 que comparou os três meios seletivos em relação aos antibióticos para isolamento de bactéria em água bruta no Lajeado Pardo. Diante dos dados, é possível inferir que os três meios seletivos diferiram estatisticamente entre si, sendo que o meio EC apresentou os maiores valores de halo de inibição, caracterizando maior sensibilidade aos antibióticos testados. Por outro lado, o meio cromogênio Colilert apresentou os menores valores significativos de halo de inibição, caracterizando assim maior resistência aos antibióticos testados. À face do exposto, conclui-se que o meio seletivo utilizado para isolamento da cepa, apresenta diferentes valores para os diâmetros de halos médios dos antibióticos. Com isso, busca-se enfatizar a importância de mais estudos sobre a utilização de meios seletivos utilizados para isolamento de cepas de *E. coli* oriundas de água, na premissa de buscar dados mais homogêneos em estudos futuros.

Tabela 3 – Médias de diâmetros de halo resultante dos três meios seletivos em relação aos antibióticos para isolamento de bactéria em água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil

Tratamentos	Médias (mm)	Resultado do Teste*
COLILERT	8,59	c
LSB	11,76	b
EC	18,24	a

Fonte: Própria autoria (2021).

*Médias seguidas da mesma letra minúscula para média dos halos de inibição apresentados pelos três meios seletivos de isolamento testados não diferem estatisticamente com $p < 0,05$, Scott-Knott.

O desdobramento seguinte que analisou o comportamento das médias dos antibióticos é apresentado na tabela 4. Todos os antibióticos utilizados no TSA quando comparados entre si, também apresentaram diferenças significativas na formação dos halos de inibição, com exceção do CLO e a GEN que não apresentaram diferença significativa entre si.

Tabela 4 – Médias dos antibióticos utilizados para o TSA em relação aos três meios seletivos de isolamento de bactéria em água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil

Tratamentos	Médias (mm)	Resultado do Teste*
AMP	0,98	d
AMC	9,92	c
CLO	14,07	b
GEN	17,04	b
CIP	22,32	a

Fonte: Própria autoria (2021).

*Médias seguidas da mesma letra minúscula para média dos halos de inibição apresentados pelos cinco antibióticos testados em cada meio não diferem estatisticamente com $p < 0,05$, Scott-Knott.

Todavia é importante ressaltar o valor médio da AMP e AMC que apresentaram os menores valores de média de halo, 0,98 mm e 9,92 mm respectivamente (tabela 4). Tanto a AMP quanto a AMC diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) quando comparados com os demais antibióticos, inclusive diferiram entre si. Nesse aspecto, os valores consideravelmente abaixo da média para sensibilidade chamam atenção, sendo possível inferir que principalmente o antibiótico AMP não apresenta resultado satisfatório em primeira análise, para o tratamento das cepas ora testadas.

O valor da média de diâmetro de halo para CIP e CLO também ficaram abaixo da média de halo de inibição para sensibilidade, 22,32 mm e 14,07 mm respectivamente. Ambos os

antibióticos se classificaram com resistência intermediária. A resistência intermediária se caracteriza por uma diminuição na eficiência do antimicrobiano sobre a microbiota alvo, podendo assim necessitar de maiores concentrações desses fármacos no combate de infecções.

A CIP diferiu estatisticamente de todos os antibióticos analisados, inclusive o CLO. Por outro lado, o CLO diferiu estatisticamente de todos os antibióticos, exceto a GEN. Em referência ao valor da média de halo de inibição da GEN (17,04 mm) é possível inferir que a mesma ficou acima da média de halo previsto por norma para sensibilidade. Logo, em uma primeira análise, a GEN é um antibiótico eficiente para o tratamento de cepas de *E. coli* provenientes das amostras de água bruta.

Essa diferenciação entre a resposta dos antibióticos é prevista pois os diâmetros de halos de inibição padrão que cada antibiótico apresenta frente a *E. coli* também são diferentes, como apresentado na tabela 5.

Tabela 5 – Valores de halos inibitórios esperados e valores observados, para cinco antibióticos testados e demonstração de sensibilidade e resistência ao teste TSA

Antibiótico	Valores de sensibilidade para <i>Enterobacteriaceae</i> *	Halos (mm) Observados**	Sensibilidade (S) ou resistência (R)
AMP	≥17	0,98d	R
AMC	≥18	9,92c	R
CLO	≥18	14,07b	R
GEN	≥15	17,04b	S
CIP	≥26	22,32a	R

Fonte: Própria autoria (2021).

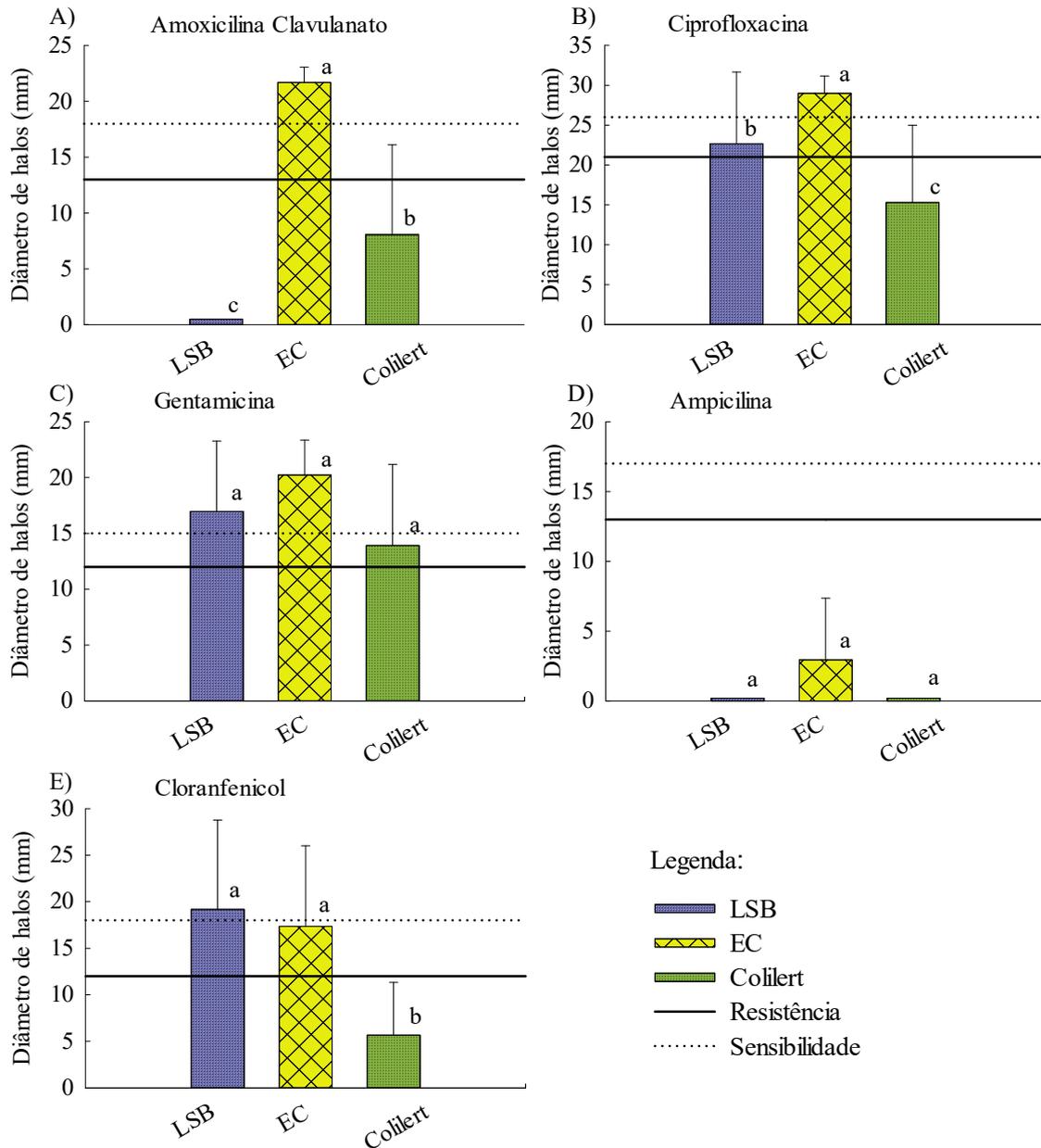
*Adaptado de CLSI, 2019.

**Médias seguidas da mesma letra minúscula para média dos halos de inibição apresentados pelos cinco antibióticos testados em cada meio não diferem estatisticamente com $p < 0,05$, *Scott-Knott*.

Ao analisar-se a tabela 5, pode-se inferir que as cepas, em média, foram sensíveis a GEN. Por outro lado, para os demais antibióticos houve resistência intrínseca. Apesar da GEN e o CLO não apresentarem diferença estatística, os mesmos apresentaram comportamento variado frente à sensibilidade, pois como já supracitado, as cepas tratadas com GEN foram sensíveis e com CLO foram resistentes.

Ao se prosseguir com a análise do desdobramento, foi possível analisar o comportamento dos meios seletivos de isolamento para cada antibiótico utilizado na análise da sensibilidade dos antibióticos em relação a *E. coli*. Na figura 4, são apresentados os valores das médias e os desvios padrão para os meios seletivos de isolamento em relação aos respectivos antibióticos.

Figura 4 – Médias e desvios padrão dos três meios seletivos de isolamento para os cinco antibióticos testados.



Fonte: Própria autoria (2021).

*Médias seguidas da mesma letra minúscula para média dos halos de inibição apresentados para cada um dos três meios de cultura seletivos testados não diferem de Scott-Knott em $p < 0,05$.

Para o antibiótico AMC, como apresentado na figura 4A, infere-se que os três meios seletivos diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si. O meio LSB apresentou respostas de resistência frente ao antibiótico em questão, assim como o Colilert que apresentou valores de halos um pouco maiores, mas configurando-se em sua totalidade resistente ao antibiótico. Por outro lado, o EC apresentou valores de sensibilidade.

Diante disso é importante destacar que quando os antibióticos apresentam diferença significativa nas médias de diâmetro de halos, não significa que ambos são sensíveis ou resistentes. Logo, a análise estatística não explica o TSA, porém, representa o panorama médio do comportamento de determinado meio seletivo.

Ao observar-se a figura 4B, é possível inferir que todos os meios seletivos diferiram estatisticamente entre si. A média do diâmetro de halo formado para o meio Colilert apresentou resposta de resistência frente à CIP. Além disso, é possível constatar que o valor de desvio padrão observado para o Colilert mostra que nenhum dado ultrapassou a linha do halo mínimo para sensibilidade, caracterizando assim a resistência.

O meio LSB apresentou resistência intermediária, sinalizando que as cepas já possuem perfil de resistência intrínseca, o que deve ser analisado com muita atenção, pois o antibiótico não se mostra em totalidade, satisfatório. Por outro lado, o meio EC apresentou sensibilidade quando analisadas as médias de halo, sendo possível inferir que a CIP é um antibiótico satisfatório para o tratamento de cepas de *E. coli* isoladas. Os desvios padrão considerados altos, que são apresentados na figura 4, se devem ao fato de terem sido amostradas cepas dos quatro setores de estudos, justificando assim a variabilidade dos dados e valores de desvio padrão.

Quando analisado o perfil de resistência de cepas de *E. coli* nosocomial, para fazer um paralelo às análises ambientais do presente trabalho, foi constatado entre 8% a 65% de *E. coli* associadas a infecções do trato urinário, apresentaram resistência à CIP, um antibiótico comumente usados para tratar essa condição (WHO, 2018), sendo que o presente estudo encontrou 58,2% de resistência à CIP nas amostras coletadas nas águas do Lajeado Pardo. Todavia, é importante destacar que o espectro de resistência aos antibióticos varia amplamente de região para região (LUCIEN et al., 2021). Ao usar dados do Sistema Global de Vigilância de Uso e Resistência Antimicrobiana (GLASS) da (WHO, 2020), observa-se que a resistência a CIP para infecções do trato urinário varia de 22,5% a 58,6% para *E. coli* quando considerado o panorama global.

No gráfico 1C, embora não se observe diferença estatística entre os meios seletivos, no antibiótico GEN, houve diferença na sensibilidade e resistência. Ou seja, as bactérias isoladas no meio Colilert mostraram-se resistentes ao antibiótico. Por outro lado, as bactérias inoculadas em EC e LSB, em média, foram sensíveis a GEN. Percebe-se que não houve diferença abrupta entre as médias dos halos dos três meios seletivos, todavia houve influência no halo por parte dos meios. É importante inferir também que ao se analisar o desvio padrão é possível perceber que dentro de um mesmo meio seletivo encontram-se cepas resistentes e sensíveis e essa flutuação é normal, haja vista que foram amostrados quatro setores distintos. O meio EC foi o

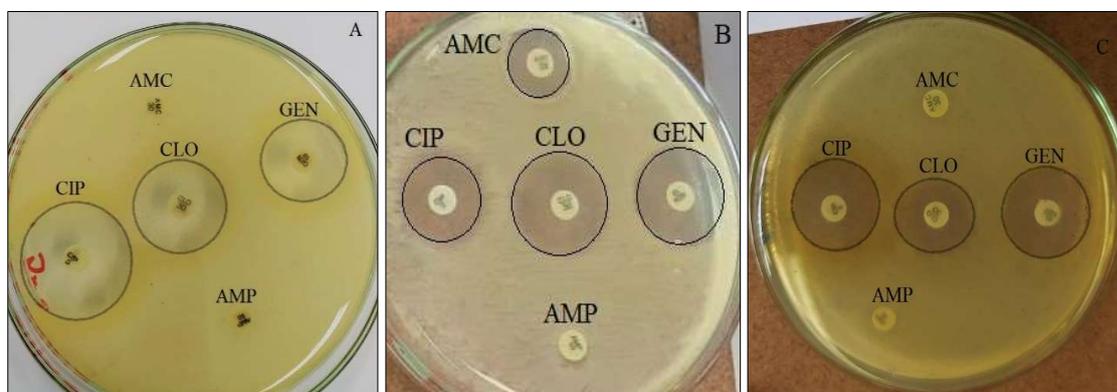
único meio seletivo que obteve todos os pontos (amostras), quando considerado o desvio padrão, classificados como sensíveis ao antibiótico GEN.

No gráfico 1D são apresentados as médias e os desvios padrão para os três meios seletivos em relação ao antibiótico AMP. Não houve diferença estatística entre os três meios seletivos de isolamento, sendo que o LSB e Colilert não apresentaram halo para o antibiótico AMP. Além disso, o EC apresentou média de halo de 2,95 mm, todavia esse valor está abaixo do limite mínimo para sensibilidade, caracterizando-se também como resistente. De maneira geral, verifica-se que a AMP apresentou as menores médias de halo de inibição, demonstrando assim os maiores níveis de resistência quando comparado aos demais antibióticos. Por esse motivo, é classificado pelo presente estudo como o antibiótico menos eficiente para o tratamento de cepas de *E. coli* oriundas das amostras de água bruta.

Muitos estudos sobre a qualidade da água, constataram também um alto índice de resistência de bactérias da espécie *E. coli* ligada ao antibiótico AMP (JORGENSEN et al., 2017; SWEDAN; ALRUB, 2019), assim como infere o presente trabalho. Nesse sentido, sobre a resistência a AMP, pode-se destacar o estudo de Chen et al. (2017), realizado na cidade de Hangzhou, na China que investigou a distribuição de resistência de *E. coli* frente a 18 agentes antimicrobianos testados, concluindo que a maioria dos isolados foi resistente a AMP. Assim como a investigação de Maal-Bared et al. (2013) realizado em British Columbia, Canadá que tinha como propósito examinar a distribuição de *E. coli* resistentes a antibióticos isolados de água em uma bacia hidrográfica de agricultura intensiva. Entre os antibióticos testados, o estudo concluiu existir uma alta frequência de resistência a AMP. Ainda segundo os autores, a maior frequência de resistência foi observada nas cepas isoladas dos locais mais impactados pela agricultura, enquanto a menor frequência de resistência foi encontrada nas cabeceiras.

Na figura 5 é possível verificar que AMP não apresentou efeito sobre as cepas estudadas independentemente do meio seletivo utilizado para isolamento, apresentando os menores valores de halo como representado na tabela 5 acima.

Figura 5 – Efeito dos antibióticos sobre as cepas isoladas em três meios de isolamento em amostras de água coletadas no setor 3 no Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil



Fonte: Autoria própria (2021).
(A: Placa Colilert, B: Placa EC, C: Placa LSB).

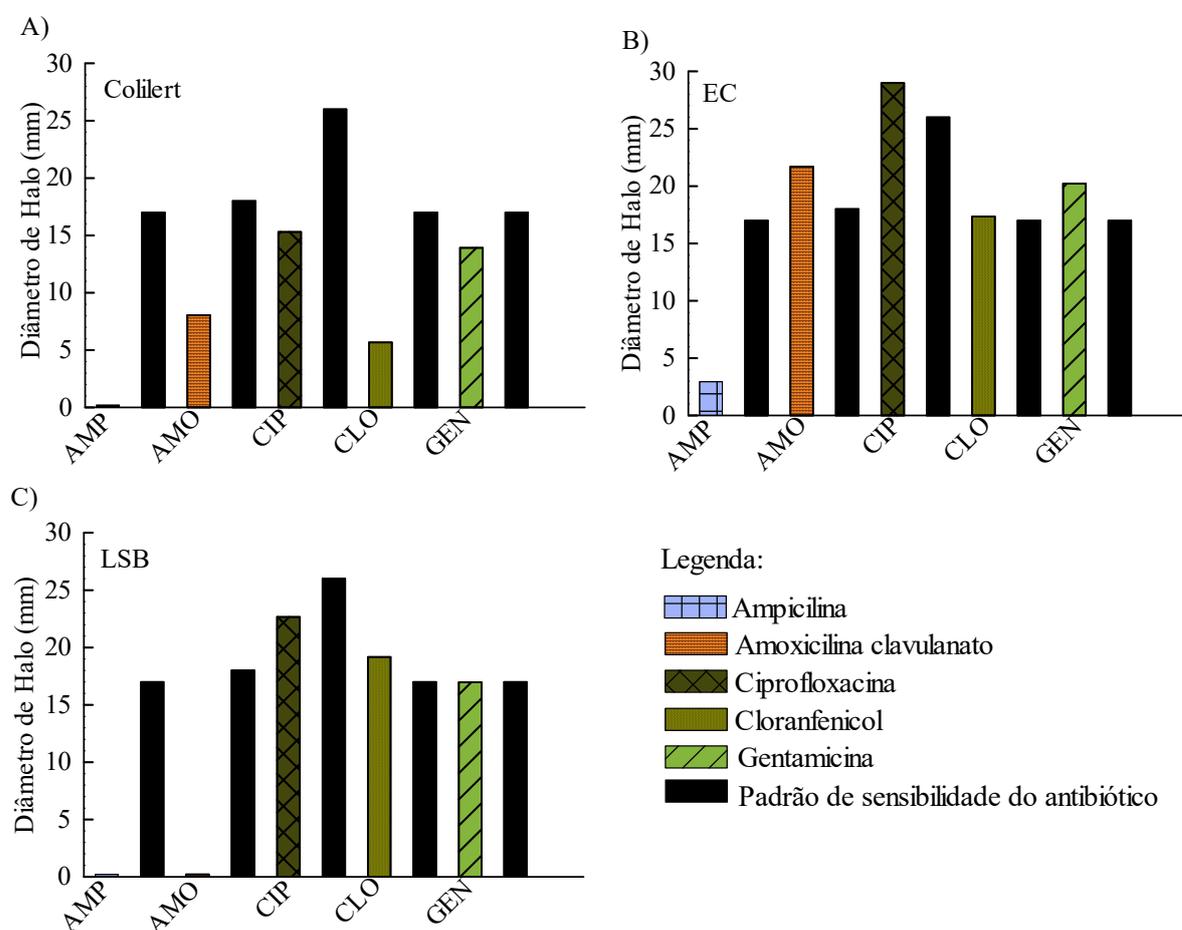
Observa-se no gráfico 1E que os meios LSB e EC não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do Colilert. No entanto, no meio LSB, para o antibiótico CLO, os microrganismos apresentaram sensibilidade em média. Por outro lado, para o meio EC a resistência observada foi intermediária.

Os meios LSB e EC apresentaram pontos de sensibilidade e pontos de resistência, sendo o desvio padrão do LSB o maior de todos, mostrando que houve diferentes respostas frente ao CLO. Essa diferença é justificada pois testou-se cepas dos quatro setores amostrados, que podem apresentar comportamentos diferentes, se estiverem expostas a condições ambientais distintas ao longo do lajeado.

A média dos halos formados para o meio Colilert apresentou padrão de resistência ao CLO, e os valores de desvio padrão observados ultrapassaram o limite de resistência. Sugere-se que os microrganismos inoculados em meio Colilert apresentaram resistência frente ao antibiótico CLO.

Na figura 6A, observa-se a análise das médias de halos dos antibióticos dentro do meio seletivo de isolamento Colilert. Constata-se que em média, todos os antibióticos foram resistentes quando comparados aos halos padrões de sensibilidade. Também se observa que o antibiótico AMP apresentou os menores valores de diâmetro de halos médios, o que indica resistência das cepas analisadas nos 4 setores amostrados.

Figura 6 – Médias de diâmetro de halo dos antibióticos dentro do meio seletivo de isolamento de *E. coli* e padrão de sensibilidade



Fonte: Própria autoria (2021).

Na figura 6B, observa-se a análise das médias de diâmetro de halos dos antibióticos dentro do meio seletivo EC. O único antibiótico que apresentou valores médios de halo de inibição abaixo do valor mínimo para sensibilidade, foi a AMP. Desse modo, a AMP não se mostra eficiente em geral para o tratamento das cepas estudadas. Em contrapartida, os demais quatro antibióticos quando analisados pelas suas médias, tiveram halos de inibição superiores ao mínimo exigido para sensibilidade, assim sendo, infere-se que foram eficientes para o tratamento das cepas estudadas.

Para o meio LSB, os antibióticos AMP e AMC em sua totalidade não apresentaram diâmetro de halos de inibição, configurando assim, total resistência aos dois antibióticos, como poder ser observado na figura 6C. Quando considerada a média da CIP, também se obteve resposta de resistência frente ao antibiótico. Por outro lado, os antibióticos CLO e GEN apresentaram, na média, valores de sensibilidade frente às cepas inoculadas em LSB.

A segunda análise estatística aplicada para o presente estudo comparou as cepas de bactérias isoladas das amostras de água de cada um dos 4 setores amostrados, em cada um dos três meios seletivos utilizados para isolamento. A partir da análise de variância, pode-se observar a interação significativa ($p < 0,05$) entre as variáveis analisadas, com $f = 0,0004$. Diante disso, houve o desdobramento dos tratamentos.

Na tabela 6, observa-se com o Teste de *Scott-Knott* com 95% de confiança, que o tratamento 1 (setor 1) quando comparado aos demais tratamentos (setor 2, 3 e 4), apresentaram diferença significativa entre si. Os setores 2, 3 e 4 não apresentaram diferenças significativas entre si. O setor 2 apresentou a maior média de diâmetro de halos entre os setores, ou seja, os antibióticos utilizados resultaram em um maior efeito contra as cepas de *E. coli*.

Tabela 6 – Médias de diâmetro de halo dos setores analisados em relação aos meios utilizados para o isolamento de *E. coli* em água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil

Tratamentos	Médias (mm)	Resultado do Teste*
SETOR 1	7.983556	b
SETOR 4	13.31733	a
SETOR 3	14.81689	a
SETOR 2	15.33911	a

Fonte: Própria autoria (2021).

*Médias seguidas da mesma letra minúscula para média dos halos de inibição apresentados pelos cinco antibióticos testados em cada setor não diferem estatisticamente com $p < 0,05$, *Scott-Knott*.

No setor 1 constatou-se a menor média de halos, sendo que as cepas presentes nesse setor apresentaram maior resistência aos antibióticos testados. Isso pode ser explicado, pois o setor 1 fica a jusante dos demais setores do Lajeado Pardo, sendo localizado nesse ponto, a captação de água para posterior tratamento pela Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN), que utiliza desse manancial para o abastecimento público dos municípios de Frederico Westphalen e Caiçara-RS. Nesse setor, o ambiente é considerado lântico, pois nesse ponto tem-se a represa da CORSAN para captação de água, logo esse ambiente possui água parada e sem correntezas.

Os resultados encontrados pelo presente estudo acerca as condições microbiológicas no setor 1, despertam um olhar peculiar para os índices preocupantes da presença de bactérias resistentes a antimicrobianos no ponto de captação de água para posterior tratamento pela CORSAN. É importante mencionar que as bactérias resistentes a antibióticos podem possuir

perfil patogênico e desencadear doenças na população, que venha a utilizar água sem o devido tratamento.

Alguns subgrupos de *E. coli* (enterotoxigênica; enteroinvasiva e enterohemorrágica) (BRASIL, 2020) são agentes etiológicos das doenças diarreicas agudas (DDA) de manifestação clínica. Segundo o Ministério da Saúde (MS), dentre os fatores de risco para as DDA que podem colocar as pessoas em risco e facilitar a contaminação, pode-se citar a ingestão de água sem tratamento adequado, condições de saneamento e higiene precárias. Segundo dados disponibilizados pelo MS, entre os anos de 2007 e 2019 o município de Frederico Westphalen e Caiçara apresentaram em média 274 e 64 casos anuais de DDA, respectivamente. No mesmo período o estado do RS e o Brasil tiveram 137.539 e 4.369.609 casos notificados, respectivamente (BRASIL, 2020). Nesse sentido, os resultados de resistência encontrados pelas bactérias isoladas no presente estudo, bem como os casos de DDA que podem ter como agente etiológico *E. coli*, uma atenção mais cautelosa deve ser dada para o monitoramento de cepas patogênicas encontradas no meio ambiente, que podem estar desencadeando às DDA.

Na tabela 7 são apresentados os valores médios de diâmetro de halo em relação aos quatro setores de coleta para isolamento de bactérias *E. coli* em água no Lajeado Pardo. A variável analisada foi o valor do diâmetro de halo de inibição. Com isso constatou-se que os meios Colilert e LSB não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do meio EC quando comparados dentro dos setores de coleta. Conclui-se que dependendo do meio seletivo de isolamento bacteriano utilizado, as bactérias apresentaram respostas diferentes quando submetidas aos diferentes antibióticos nos diferentes setores.

Tabela 7 – Média dos diâmetros de halo dos três meios seletivos em relação aos setores de coleta para o isolamento de bactéria em água bruta do Lajeado Pardo. Frederico Westphalen-RS, Brasil

Tratamentos	Médias (mm)	Resultado do Teste*
COLILERT	8.587333	b
LSB	11.763833	b
EC	18.241500	a

Fonte: Própria autoria (2021).

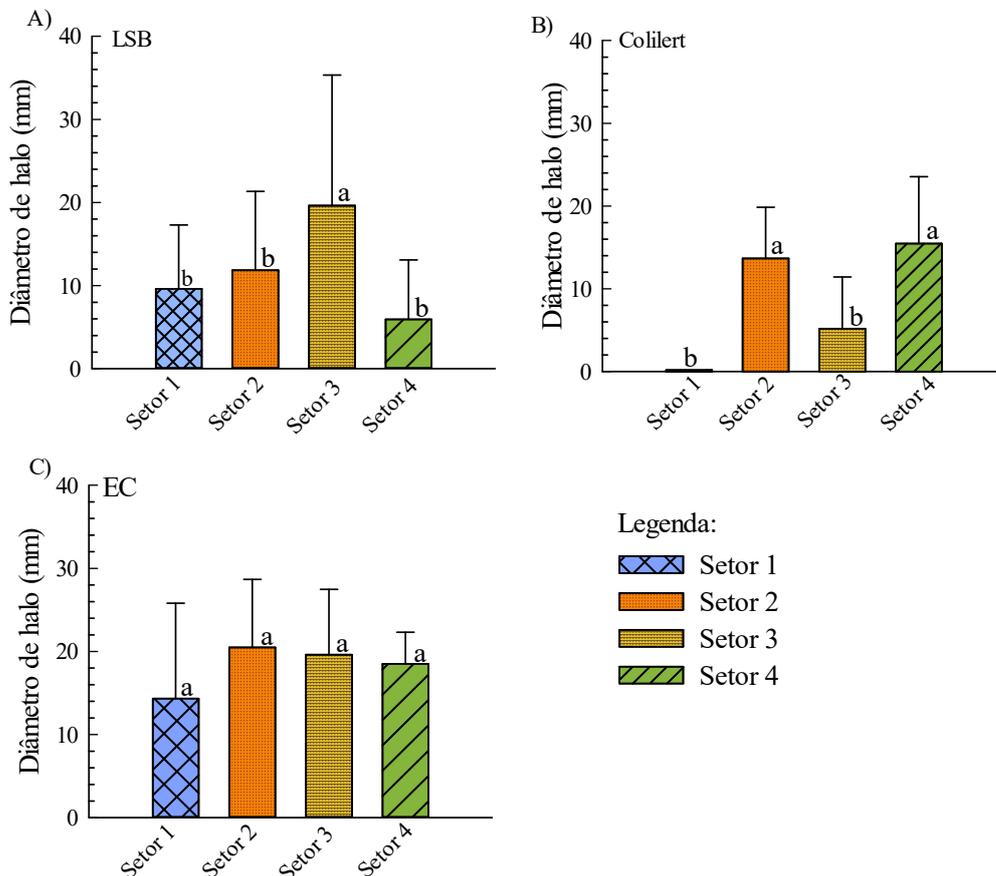
*Médias seguidas da mesma letra minúsculas para média dos halos de inibição apresentados pelos três meios de cultura seletivos testados não diferem estatisticamente com $p < 0,05$, *Scott-Knott*.

Posteriormente, foi realizado o desdobramento estatístico, foram analisados os meios seletivos para isolamento de *E. coli* e os 4 setores de coleta em relação aos diâmetros de halos observados no TSA. Ressalta-se que os desvios padrão altos apresentados pela maioria dos

setores quando analisados em cada meio seletivo de isolamento, são justificáveis uma vez que foram analisadas as médias dos diâmetros de halo de inibição para o TSA. Como cada antibiótico responde com halos diferentes, o desvio padrão quando comparado à média será grande. Todavia esses valores longe da média não caracterizam um problema para o estudo.

O meio LSB apresentou o setor 3 diferindo estatisticamente dos demais setores e apresentando também as maiores médias de diâmetro de halo de inibição. Por outro lado, os setores, 1, 2 e 4 não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram do setor 3, como mostra a figura 7A.

Figura 7– Médias e desvios padrão de diâmetro de halo (mm) dos setores para coleta de água em cada meio seletivo de isolamento



Fonte: Própria autoria (2021).

*Médias seguidas da mesma letra minúsculas para média dos halos de inibição apresentados para cada um dos três meios de cultura seletivos testados não diferem de Scott-Knott em $p < 0,05$.

Para o meio Colilert é possível inferir que os setores 1 e 3 não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram dos demais, como apresentado pela figura 7B. Por outro lado, os setores

2 e 4 não diferiram entre si, mas diferiram dos demais. As maiores médias de halo foram encontradas no setor 4 que se caracteriza por ser a nascente do Lajeado Pardo.

Constata-se por outro lado, que o setor 1 (ponto de captação de água pela CORSAN) apresentou médias de diâmetro de halos praticamente nulos. Diante disso é possível concluir que as cepas isoladas nesse setor pelo meio Colilert, possui altos níveis de resistência, pois os antibióticos não foram capazes de criar halos de inibição suficientes para serem classificados como sensíveis.

Com relação ao meio seletivo de isolamento EC, é possível inferir que os quatro setores não diferiram estatisticamente entre si, sendo que o setor 1 apresentou as menores médias de halos de inibição, como mostra a figura 7C. Essa constatação foi a mesma do meio seletivo Colilet, e diante disso é importante ponderar que o setor 1 é o ponto mais a jusante do presente estudo.

É possível inferir de uma maneira geral que os meios seletivos de isolamento não tiveram respostas semelhantes, quando comparados os quatro setores amostrados. Verifica-se que para o meio Colilert e EC os menores valores de diâmetro de halos foram respectivos ao setor 1. Por outro lado, para o meio seletivo LSB as menores médias se referem ao setor 4. Para o meio Colilert, o setor 4 foi o que apresentou os maiores diâmetros de halo, no entanto, para o meio EC os maiores valores de diâmetro de halo são para o setor 2.

Diante dessas observações, alguns apontamentos sobre os meios seletivos de isolamento se fazem pertinentes. É possível concluir que os meios não possuem uma resposta homogênea, sendo necessárias maiores investigação para conclusão efetiva do melhor meio de cultura a ser utilizado para isolar as bactérias da espécie *E. coli em* águas brutas. Essa condição é muito importante para que se padronize os testes de isolamento e posterior TSA, além disso, aliar testes genéticos aos testes convencionais, traria maior sensibilidade e especificidade para identificação de *E. coli* ambientais.

Todavia é importante mencionar também que as grandes variações encontradas nos diferentes meios seletivos a partir dos dados obtidos, podem de fato acontecer pela composição do substrato de cada meio. Corroborando com os apontamentos de Marquezi, Gallo e Dias, (2010) que explicam que as bactérias normalmente não se multiplicam na água, apenas sobrevivem e são veiculadas e, se apresentam heterogeneamente dispersas. Assim sendo, as amostras de água coletadas nos quatro setores de estudos, podem ora conter e ora não conter as bactérias alvo.

O desempenho do método analítico depende do rendimento das bactérias alvo (MARQUEZI; GALLO; DIAS, 2010). No entanto, se a composição de espécies do grupo alvo

varia nos diferentes métodos, a interpretação da qualidade da água pode ser afetada pelo método de análise (NIEMI et al., 2001). Assim como observado no presente estudo, onde a depender do método de cultura utilizada para o isolamento da bactéria nos setores de estudo, obteve-se uma resposta distinta frente ao teste de TSA.

Em relação à análise realizada na literatura, constata-se que o presente estudo foi um dos primeiros a examinar a contaminação ambiental com bactérias da espécie *E. coli* resistentes a antibióticos no Lajeado Pardo, situado ao longo de cinco microbacias essencialmente agrícolas, situadas no noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

É importante dar destaque também ao protocolo de enriquecimento e identificação de cepas de *E. coli* desenvolvido especificamente para este projeto, e os meios de enriquecimento primário escolhidos foram (LSB, EC e Colilert). Assim como relatado por (COOLEY et al., 2014) em seu estudo sobre prevalência de *E. coli* em locais públicos em uma região agrícola da Califórnia, esta é a primeira pesquisa para isolamento e identificação de *E. coli* no Lajeado Pardo, abrangido por cinco microbacias agrícolas, situadas na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil e não sabe-se ainda quanto da vida selvagem, solo, vegetação contribuem para a persistência potencial desses microrganismos na sub bacia estudada.

Desse modo, não se tem clareza se a predominância de isolados de *E. coli* reflete no viés dos métodos de isolamento utilizados ou a ecologia da região de estudo. Levanta-se assim uma questão muito importante: que as futuras pesquisas avaliem a influência de métodos de isolamento dos microrganismos selvagens, para garantir uma comparação fidedigna com demais estudos que utilizem outros meios específicos.

A presente pesquisa, bem como outros estudos, permite que os formuladores de políticas públicas tomem as ações necessárias para melhorar a segurança da água bruta, por ser ainda muito utilizada para os usos múltiplos pelas pessoas sem o devido tratamento. Para isso, é indispensável o monitoramento da água e da ocorrência de patógenos graves e resistentes aos medicamentos (SWEDAN; ALRUB, 2019), pois o ato de monitorar garante preventivamente perspectivas de melhora na gestão dos recursos hídricos, tão importantes para a manutenção da vida na Terra.

4.4 CONCLUSÃO

Este estudo apresenta as descobertas de resistência a algumas cepas de bactérias isoladas no Lajeado Pardo, importante corpo d'água que possui cinco microbacias que drenam suas águas para o lajeado situado no noroeste do estado do RS, Brasil. Em geral a resistência foi

observada para o antibiótico ampicilina (100%), seguida de amoxicilina clavulanato (66,6%), ciprofloxacina (58,2%), cloranfenicol (50%) e gentamicina (33, 20%). Na grande maioria das cepas a gentamicina se mostrou o antibiótico mais eficiente para o seu tratamento, podendo ser classificada em primeira análise como uma monoterapia eficiente. O TSA contribui para uma análise global dos padrões de suscetibilidade das bactérias da espécie *E. coli*, sendo que mais estudos são necessários para confirmação das intervenções de contingência em casos clínicos confirmados.

Logo, em uma análise multilateral merece destaque também a importância da vigilância regular da suscetibilidade aos antimicrobianos, sendo um processo essencial para o aperfeiçoamento do monitoramento ambiental e do perfil de resistência das bactérias ambientais, com destaque para aquelas encontradas nos corpos d'água.

4.5 REFERÊNCIAS

ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645-1658, Oct. 2018. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/antibiotic-resistance-a-rundown-of-a-global-crisis-peer-reviewed-article-IDR>>. Acesso em: 23 abr. 2021. DOI: 10.2147/IDR.S173867.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, Apr 1966. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article/45/4_ts/493/4821085>. Acesso em: 19 jan, 2021. DOI: 10.1093/ajcp/45.4_ts.493.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Portaria nº 64 de 11 de dezembro de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.59, dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Doenças diarreicas agudas (DDA)**. nov. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doencas-diarreicas-agudas-dda>>. Acesso em: 29 abr, 2021.

BRASIL. Instrução Normativa nº 83, de 23 de Fevereiro de 2021. **Diário Oficial da União**, 2021. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-471-de-23-de-fevereiro-de-2021-304923190>>. Acesso em: 04 abr. 2021b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) **Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories**. Pennsylvania, 29ed. 2019.

CIMAFONTE, M. et al. Screen Printed Based Impedimetric Immunosensor for Rapid Detection of Escherichia coli in Drinking Water. **Sensors**, v. 20, n. 1, p. 274, Jan. 2020.

Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8220/20/1/274>>. Acesso em: 14 jan, 2021. DOI: 10.3390/s20010274.

CHEN, Z. et al. Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water sources in Hangzhou City. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1133-1144, Jun. 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01133/full>>. Acesso em: 14 Sep. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01133.

CHEN, Z. et al. High concentration and high dose of disinfectants and antibiotics used during the COVID-19 pandemic threaten human health. **Environmental Sciences Europe**, v. 33, n. 1, p. 11, 29 Jan. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33532166/>>. Acesso em: 30 mar. 2021. DOI: 10.1186/s12302-021-00456-4.

COOLEY, M. B. et al. Prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* at public access watershed sites in a California Central Coast agricultural region. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, p. 30, mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24624367/>>. Acesso em: 20 fev, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00030.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Estudos de Solos do Município de Frederico Westphalen, RS. **Circular Técnica 116**. Pelotas, RS, p. 32, set. 2011. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/905019/estudos-de-solos-do-municipio-de-frederico-westphalen-rs>>. Acesso em: 18 nov, 2020.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 36, n.6, p. 1039-1042, nov./dez., 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cagro/a/yjKLJXN9KysfmX6rvL93TSh/?format=pdf&lang=en>>. Acesso em: 18 jan. 2022.

GEBREMEDHIN, E. Z. et al. Prevalence, risk factors, and antibiogram of nontyphoidal *Salmonella* from beef in Ambo and Holeta towns, Oromia region, Ethiopia. **International Journal of Microbiology**, v. 2021, 2021. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2021/6626373/>>. Acesso em: 17 fev, 2021. DOI: 10.1155/2021/6626373.

HUTINEL, M. et al. Population-level surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* through sewage analysis. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 37, p. 11, Sep 2019. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.37.1800497>>. Acesso em: 14 mai, 2020. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.37.1800497.

JOHURA, F. T. et al. Colistin-resistant *Escherichia coli* carrying *mcr-1* in food, water, hand rinse, and healthy human gut in Bangladesh. **Gut Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 1-8, Jan. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6986151/>>. Acesso em: 17 mar. 2021. DOI: 10.1186/s13099-020-0345-2.

JORGENSEN, S. B. et al. A comparison of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 15, Oct. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0186576>>. Acesso em: 17 fev, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0186576.

KOUADIO-NGBESSO, N. et al. Comparative Biotypic and Phylogenetic Profiles of *Escherichia coli* Isolated from Resident Stool and Lagoon in Fresco (Côte d'Ivoire). **International Journal of Microbiology**, v. 2019, p. 1–7, Nov. 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2019/9708494/>>. Acesso em: 14 fev, 2020. DOI: 10.1155/2019/9708494.

KOVALOVA, L. et al. Hospital wastewater treatment by membrane bioreactor: Performance and efficiency for organic micropollutant elimination. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 1536-1545, Feb. 2012. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 17 fev, 2021. DOI: 10.1021/es203495d.

LUCIEN, M. A. B. et al. Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: Perspective from resource-limited settings. **International Journal of Infectious Diseases**. v.104, p. 250-254, Mar. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971221000163>>. Acesso em: 3 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.12.087.

MAAL-BARED, R. et al. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 315-323, Jan. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969712014258>>. Acesso em: 27 fev. 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.106.

MAHMOOD, A. R; AL-HAIDERI, H. H.; HASSAN, F. M. Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. **Advances in Public Health**, v. 2019, p. 1-11, 2019. Disponível em: <<https://downloads.hindawi.com/journals/aph/2019/7851354.pdf>>. Acesso em: 25 já, 2022. DOI:<https://doi.org/10.1155/2019/7851354>.

MARQUEZI, M. C.; GALLO, C. R.; DIAS, C. T. dos S. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 291–296, 2010. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/riahlutz/article/view/6329/6023>>. Acesso em: 07 nov. 2020.

MIRANDA, C. et al. Implications of antibiotics use during the COVID-19 pandemic: Present and future. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3413-3416, Dec. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/75/12/3413/5896238>>. Acesso em: 03 fev, 2021. DOI: 10.1093/jac/dkaa350.

NIEMI, R. M. et al. Comparison of methods for determining the numbers and species distribution of coliform bacteria in well water samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 850-858, Jun. 2001. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01314.x.

ODONKOR, S. T.; ADDO, K. K. Prevalence of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Drinking Water Sources. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, p. 1-7, Ago. 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2018/7204013/>>. Acesso em: 01 fev, 2021. DOI: 10.1155/2018/7204013.

RASCHLE, S. et al. Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-11, 2021. Disponível

em:< <https://www.nature.com/articles/s41598-021-88514-y.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2022.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88514-y>.

SWEDAN, S.; ALRUB, H. A. Antimicrobial resistance, virulence factors, and pathotypes of *Escherichia coli* isolated from drinking water sources in Jordan. **Pathogens**, v. 8, n. 2, p. 86, Juny. 2019. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2076-0817/8/2/86>>. Acesso em: 29 mai, 2021. DOI: 10.3390/pathogens8020086.

TITILAWO, Y. et al. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of faecal contamination of water. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 14, p. 10969-80, July. 2015. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3887-3>>. Acesso em: 20 mar. 2021. DOI: 10.1007/s11356-014-3887-3.

VOLPI, G. B. et al. (*no prelo*) **Parâmetros de qualidade de água avaliados na micro bacia Lajeado Pardo no município de Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, RS.

WATKINSON, A. J.; MURBY, E. J.; COSTANZO, S. D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4164-4176, Oct. 2007. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135407002539>>. Acesso em: 17 mai, 2020. DOI: 10.1016/j.watres.2007.04.005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**, v. 43, n. 148, p. 348–365, 2017. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/>>. Acesso em: 19 mai, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2016 – 2018**. Early implementation. Geneva, 2018. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277359/9789241514880-eng.pdf>>. Acesso em: 17 jan, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report**. p. 180, 2020. Disponível em: <<http://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2020/en/>>. Acesso em: 14 fev, 2021.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fazendo uma análise geral dos resultados encontrados nos capítulos anteriores, foi possível através do monitoramento, observar a presença de *Escherichia coli* e coliformes totais ao longo do percurso analisado do Lajeado Pardo. Ao se tratar da quantificação da espécie alvo, 58,3% das amostras de água analisadas, ficaram acima do limite máximo permitido por legislação para águas balneáveis, segundo CONAMA nº 274 de 2000. Considerando que o Lajeado Pardo é atualmente enquadrado em classe 2 pela CONAMA nº 357 de 2005, permitindo assim, a recreação de contato primário, percebe-se em uma primeira análise que o curso d'água necessita de intervenções de contingência, haja vista os valores de *Escherichia coli* encontrados.

Os valores mais acentuados de NMP tanto para coliformes totais, quanto para *Escherichia coli* foram encontrados no setor 1, onde fica localizada a represa de captação da água bruta levada até a estação de tratamento de água e distribuída após tratamento, para a população dos municípios de Frederico Westphalen e Caiçara. Alguns apontamentos podem ser feitos, a luz de entender o setor 1 como sendo o mais contaminado pela espécie alvo. Primeiro, por ser o setor mais a jusante das coletas, recebe a contribuição e conseqüentemente a poluição de todos os outros setores, além de que, no ponto 1 concentra-se a contribuição das cinco microbacias abrangidas pelo percurso do lajeado estudado. Isso é um indicativo da importância da gestão das microbacias, pois existem evidências da qualidade não satisfatória do lajeado, que podem trazer conseqüências negativas a saúde pública das pessoas que fazem uso desse manancial para diversos usos.

Em relação aos testes de isolamento com os três meios distintos, foi possível obter isolados da espécie alvo em todos os meios testados, complementados com testes bioquímicos (catalase e coloração de Gram) que também indicaram a presença da espécie alvo nos isolados. Todavia, é importante mencionar que testes em placa não são totalmente específicos e podem, ocasionalmente, apresentar erros. Diante disso, tem-se como premissa para futuros trabalhos a utilização de testes complementares, tais como os moleculares, que possuem uma especificidade maior no resultado final.

Para além disso, o estudo resume as descobertas de resistência a algumas da espécie alvo isoladas ao longo do Lajeado Pardo. Em geral, a resistência foi observada para o antibiótico ampicilina (100%), seguida de amoxicilina clavulanato (66,6%), ciprofloxacina (58,2%), cloranfenicol (50%) e gentamicina (33,2%). Para a grande maioria das cepas, a gentamicina se mostrou o antibiótico mais eficiente no TSA, podendo ser classificada em primeira análise como uma monoterapia eficiente. O TSA contribui para uma análise global dos padrões de

suscetibilidade das bactérias da espécie *Escherichia coli*, sendo que mais estudos são necessários para confirmação das intervenções de contingência em casos clínicos confirmados.

A resistência aos antimicrobianos pode ser indicativo de bactérias patogênicas e um indicativo de advertência para eventos futuros concebíveis de doenças de veiculação hídrica. Frente a essas questões levantadas, surge um agravante do sério risco à saúde das comunidades que dependem dessa água para diversos usos. A alta taxa de *Escherichia coli* multirresistente sugere um risco potencial para a saúde da população que utiliza a água do Lajeado Pardo para as mais diversas atividades, inclusive para recreação.

Políticas de monitoramento de mananciais de água bruta para os mais diversos usos são relevantes, na premissa de analisar constantemente a qualidade de água e diminuir o risco associado às doenças de veiculação hídrica. Além disso, desestimular o uso indiscriminado de antimicrobianos corriqueiramente utilizados de forma incipiente, tanto para o tratamento humano, quanto animal.

Diante do exposto, o presente trabalho ganha sustentação na medida que vai de encontro a legislação vigente que prevê a necessidade da criação de instrumentos de avaliação da evolução da qualidade da água, além de que estabelece a importância de especificar as condições e padrões de qualidade da água. Enaltece também, a importância de estudos complementares aos exigidos por legislação, uma vez que a resistência bacteriana não é padrão para condicionar o uso da água. O presente trabalho traz indicativos da importância desse monitoramento mais específico e subsidia a prerrogativa da inclusão do monitoramento da resistência antimicrobiana em amostras ambientais.

O controle da poluição está diretamente ligado a proteção da saúde, garantia do meio ambiente ecologicamente equilibrado e a melhoria da qualidade de vida. Assim, a vista das análises realizadas, faz-se importante mencionar que os ambientes aquáticos permanecem como um dos grandes e importantes desafios para as ciências ambientais e saúde pública.

6 REFERÊNCIAS GERAIS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO (ANA). **Brasil tem cerca de 12% das reservas mundiais de água doce do planeta**. 2010. Disponível em: <<https://www.ana.gov.br/noticias-antigas/brasil-tem-cerca-de-12-das-reservas-mundiais-de-a.2019-03-15.1088913117>>. Acesso em: 9 jun. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO (ANA). **Panorama da Qualidade das Águas Superficiais do Brasil**. Pesquisas em Geociências, Brasília-DF, 2012. Disponível em: <https://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/Panorama_Qualidade_Aguas_Superficiais_BR_2012.pdf>. Acesso em: 15 set, 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS E SANEAMENTO BÁSICO (ANA). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil 2019: informe anual**, Brasília, p. 110. 2019. Disponível em: <http://www.snirh.gov.br/portal/snirh/centrais-de-conteudos/conjuntura-dos-recursos-hidricos/conjuntura_informe_anual_2019-versao_web-0212-1.pdf>. Acesso em: 17 ago, 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resistência microbiana- mecanismos e impactos clínicos**. 2007. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_enzimatico.htm>. Acesso em: 14 mai. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde**. Módulo 6: Detecção e Identificação e Bactérias de Importância Médica, Brasília, p. 150, v. 9, 2013. Disponível em: <https://spdbcfmusp.files.wordpress.com/2014/09/iras_modulodeteccaobacterias.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2021.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. **Choice Reviews Online**, v. 49, n. 12, p. 49-6910-6949, Ago. 2012. Disponível em: <<http://choicereviews.org/review/10.5860/CHOICE.49-6910>>. Acesso em: 17 mai. 2021. DOI: 10.5860/CHOICE.49-6910 .

ASLAM, B. et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645-1658, Oct. 2018. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/antibiotic-resistance-a-rundown-of-a-global-crisis-peer-reviewed-article-IDR>>. Acesso em: 23 abr. 2021. DOI: 10.2147/IDR.S173867.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (2014), **ISO 9308**. Water quality. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria Membrane filtration method for waters with low bacterial, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (2017), **ISO 17025**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de análise, 2017.

BEN SAID, L. et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 86–92, Jun. 2015. Disponível em: <

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515001129>>. Acesso em: 29 out. 2020. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023.

BERTÃO, A. M. S.; SARIDAKIS, H. O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 81-92, jul./dez. 2007. Disponível em:< <https://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/3472/2825>>. Acesso em: 11 mar. 2021. DOI: 10.5433/1679-0367.2007v28n2p81.

BIGDELI, M. et al. Access to medicines from a health system perspective. **Health Policy and Planning**, v. 28, n. 7, p. 692–704, 1 Ouc. 2013. Disponível em: < <https://academic.oup.com/heapol/article-lookup/doi/10.1093/heapol/czs108>>. Acesso em: 14 abr. 2021. DOI: 10.1093/heapol/czs108.

BILAL, M. et al. Antibiotics traces in the aquatic environment: persistence and adverse environmental impact. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 13, p. 68-74, Feb. 2020. Disponível em:< <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6787325>>. Acesso em: 20 Fev, 2021. DOI: 10.1016/j.coesh.2019.11.005.

BORTOLI et al. Microbiological evaluation of water in rural dairy farms located in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.12, n.1, p. 39 – 53, 2018. Disponível em: <<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/download/426/2290>>. Acesso em: 18 jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20180005>

BORTOLOTTI, K. DA C. S. et al. Qualidade microbiológica de águas naturais quanto ao perfil de resistência de bactérias heterotróficas a antimicrobianos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 4, p. 717-725, jul./ago. 2018. Disponível em: < <https://www.scielo.br/pdf/esa/v23n4/1809-4457-esa-s1413-41522018169903.pdf>>. Acesso em: 19 mai, 2021. DOI: 10.1590/s1413-41522018169903.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000. **Diário Oficial da União**, 2000.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Resolução CONAMA nº 357, de 15 de junho de 2005. **Diário Oficial da união**, 2005a.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **1º Caderno de Pesquisa em Engenharia de Saúde Pública - Estudos e pesquisas**. p. 244, 2013a. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/documents/20182/39040/3º+Caderno+de+pesquisa+de+engenharia+de+saúde+pública++2013.pdf>>. Acesso em: 29 ago, 2020.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual Prático de Análise de Água**, p. 153, 2013b. Disponível em:< <http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em:28 ago, 2020

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016. **Diário Oficial da união**, Brasília, 2016.

BRASIL. Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 de setembro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Plano de ação nacional de prevenção e controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022**, 2018a. Disponível em: <<https://data.dre.pt/eli/port/141/2018/05/18/p/dre/pt/htm>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Agenda de Prioridades na Pesquisa do Ministério da Saúde**. 2018b. Disponível em: <http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agenda_prioridades_pesquisa_ms.pdf>. Acesso em: 17 jun, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, p. 16, jan, 2018c. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 14 fev, 2021.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Programa Nacional de Saneamento Rural**, Brasília, p. 266. 2019a. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/documents/20182/38564/MNL_PNSR_2019.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil- Informe 2018**. P. 16, 2019b. Disponível em: <http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em: 15 fev, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Doenças diarreicas agudas (DDA)**. nov. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doencas-diarreicas-agudas-dda>>. Acesso em: 29 abr, 2021.

BRASIL. Instituto Trata Brasil. **Dia Mundial da Saúde: veja quais são as principais doenças por falta de saneamento**, 2021a. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/blog/2021/04/06/dia-mundial-da-saude-veja-quais-sao-as-principais-doencas-por-falta-de-saneamento/>>. Acesso em: 4 jun. 2021.

BRASIL. Instrução Normativa nº 83, de 23 de Fevereiro de 2021. **Diário Oficial da União**, 2021b. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-471-de-23-de-fevereiro-de-2021-304923190>>. Acesso em: 04 abr. 2021.

BRASIL. **Sisagua**. 2021c. Disponível em: <<http://sisagua.treinamento.saude.gov.br/sisagua/paginaExterna.jsf>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

BROWN, J.; BIR, A.; BAIN, R. E. S. Novel methods for global water safety monitoring: comparative analysis of low-cost, field-ready **E. coli** assays. **NPJ Clean Water**, v. 3, n. 1, p. 9, Dec. 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41545-020-0056-8>>. Acesso em: 14 abr, 2021. DOI: 10.1038/s41545-020-0056-8.

CARNEIRO, R. B. **Avaliação do desempenho de biorreatores anaeróbios de leito fixo ordenado e empacotado para remoção dos antibióticos sulfametoxazol e ciprofloxacina.** 2019. p. 248. Tese (doutorado em em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento). Universidade de São Paulo, São carlos, SP, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 infections associated with sprout consumption - Europe and North America May-July 2011. **Morbidity and mortality weekly report.** v. 62, n. 50 p. 1029-1031, Dec, 2013. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24352067/>>. Acesso em: 14 jul, 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Carbapenem-resistant Enterobacteriales (CRE).** Nov, 2019. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/>>. Acesso em: 13 ago, 2020.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Índice de Qualidade das Águas Brutas para Fins de Abastecimento Público (IAP).** 2013. Disponível em: <<https://www.cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2013/11/03.pdf>>. Acesso em: 24 fev, 2021.

CIMAFONTE, M. et al. Screen Printed Based Impedimetric Immunosensor for Rapid Detection of *Escherichia coli* in Drinking Water. **Sensors**, v. 20, n. 1, p. 274, Jan. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1424-8220/20/1/274>>. Acesso em: 14 jan, 2021. DOI: 10.3390/s20010274.

CHEN, Z. et al. Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water sources in Hangzhou City. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1133-1144, Jun. 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01133/full>>. Acesso em: 14 Sep. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01133.

CHEN, Z. et al. High concentration and high dose of disinfectants and antibiotics used during the COVID-19 pandemic threaten human health. **Environmental Sciences Europe**, v. 33, n. 1, p. 11, 29 Jan. 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33532166/>>. Acesso em: 30 mar. 2021. DOI: 10.1186/s12302-021-00456-4.

CHIA, P. Y. et al. The role of hospital environment in transmissions of multidrug-resistant gram-negative organisms. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 29, 11 Dec. 2020. Disponível em: < <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-020-0685-1>>. Acesso em: 14 set, 2020. DOI: 10.1186/s13756-020-0685-1.

CONTI, I. L.; SCHROEDER, E. O. **Convivência com o Semiárido Brasileiro: Autonomia e Protagonismo Social.** Brasília: Editora IABS, 2013. Disponível em: < http://plataforma.rede-san.ufrgs.br/biblioteca/mostrar_bib.php?COD_ARQUIVO=17909 >. Acesso em: 17 mai. 2021.

COSTA, C. M. S. **Caracterização molecular de amostras de *Escherichia coli* carreadoras dos genes stx isoladas de bovinos nos estados de Rondônia e do Rio de Janeiro.** p. 100,

2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

COURA, F.M.; LAGE, A.P. HEINEMANN, M.B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n.9, p. 811-818, nov. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000900001>>. Acesso em: 07 mai, 2021. DOI: 10.1590/S0100-736X2014000900001.

DA COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 7, n. 2, p. 45-57, mai./jun. 2017. Disponível em:<<https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao/article/view/2555/andersonv7n2.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2021. DOI: 10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57.

DESHMUKH, R. A. et al. Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: a retrospective minireview. **Microbiology Open**, v. 5, n. 6, p. 901–922, 10 Dec. 2016. Disponível em:< <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mbo3.383>>. Acesso em: 14 set, 2020. DOI: 10.1002/mbo3.383.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Estudos de Solos do Município de Frederico Westphalen, RS. **Circular Técnica 116**. Pelotas, RS, p. 32, set. 2011. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/905019/estudos-de-solos-do-municipio-de-frederico-westphalen-rs>>. Acesso em: 18 nov, 2020.

ERCUMEN, A. et al. Animal Feces Contribute to Domestic Fecal Contamination: Evidence from *E. coli* Measured in Water, Hands, Food, Flies, and Soil in Bangladesh. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 15, p. 8725–8734, 2017. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.7b01710>>. Acesso em: 10 abr, 2021. DOI: 10.1021/acs.est.7b01710.

ESTRELA, T. S. **Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira**. Saúde e Política Externa : os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018). **Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (MS)**, p. 307–327, 2018. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_politica_externa_20_anos_aisa.pdf>. Acesso em: 03 mai, 2020.

FINLEY, R. L. et al. The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 5, p. 704–710, 1 Sep. 2013. Disponível em:< <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cit355>>. Acesso em: 17 nov, 2020. DOI: 10.1093/cid/cit355.

FREDERICO WESTPHALEN. **Plano municipal de saneamento básico de Frederico Westphalen-RS**. p. 22, mar, 2012. Disponível em: < https://www.fredericowestphalen-rs.com.br/arquivos/saneamentobasico/5_1.PDF>. Acesso em: 01 mai, 2020.

GALL, A. M. et al. Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water. **PLOS Pathogens**, p. 1-7, 2015. DOI:10.1371/journal.ppat.1004867

HENDRIKSEN, R. S. et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1124, Dec. 2019. Disponível em: < <http://www.nature.com/articles/s41467-019-08853-3>>. Acesso em: 22 set, 2020. DOI: 10.1038/s41467-019-08853-3.

HUIJBERS, P. M. C. et al. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 20, p. 11993-12004, oct. 2015. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.5b02566>>. Acesso em: 21 mar, 2021. DOI: 10.1021/acs.est.5b02566.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Cidades e Estados**. Frederico Westphalen, 2010. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/frederico-westphalen.html>>. Acesso em: 14 fev, 2020.

ISHII, S.; SADOWSKY, M. J. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 2, p. 101–108, 2008. Disponível em: < http://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/23/2/23_2_101/_article>. Acesso em: 14 out, 2020. DOI: 10.1264/jsme2.23.101.

IWU, C. D.; OKOH, A. I. Characterization of antibiogram fingerprints in *Listeria monocytogenes* recovered from irrigation water and agricultural soil samples. **PLOS ONE**, v. 15, n. 2, p. e0228956, 10 fev. 2020. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0228956>>. Acesso em: 01 mar, 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0228956.

JANK, L.; HOFF, R. B.; COSTA, F. J.; PIZZOLATO, T. M. Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography– electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 1013-1037, 2014.

JIN, D. et al. Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 13368, Dec. 2018. Disponível em: < <http://www.nature.com/articles/s41598-018-31706-w>>. Acesso em: 08 out, 2020. DOI: 10.1038/s41598-018-31706-w.

JOHURA, F. T. et al. Colistin-resistant *Escherichia coli* carrying *mcr-1* in food, water, hand rinse, and healthy human gut in Bangladesh. **Gut Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 1-8, Jan. 2020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6986151/>>. Acesso em: 17 mar. 2021. DOI: 10.1186/s13099-020-0345-2.

JOSÉ FIGUERAS, M.; BORREGO, J. J. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7, n. 12, p. 4179-4202, Dec. 2010. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1660-4601/7/12/4179>>. Acesso em: 17 nov, 2020. DOI: 10.3390/ijerph7124179.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004. Disponível em: < <http://www.nature.com/articles/nrmicro818>>. Acesso em: 07 set, 2020. DOI: 10.1038/nrmicro818.

KOUADIO-NGBESSO, N. et al. Comparative Biotypic and Phylogenetic Profiles of *Escherichia coli* Isolated from Resident Stool and Lagoon in Fresco (Côte d'Ivoire). **International Journal of Microbiology**, v. 2019, p. 1–7, Nov. 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2019/9708494/>>. Acesso em: 14 fev, 2020. DOI: 10.1155/2019/9708494.

LARSON, A. et al. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water samples from rural andean households in Cajamarca, Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 1363-1368, 2019. Disponível em: <<https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.18-0776>>. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0776.

LECLERC, H. et al. Advances in the Bacteriology of the Coliform Group: Their Suitability as Markers of Microbial Water Safety. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 201-234, Out. 2001. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.55.1.201>>. Acesso em: 30 jun. 2021. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.201

LEONARD, A. F. C. et al. Human recreational exposure to antibiotic resistant bacteria in coastal bathing waters. **Environment International**, v. 82, p. 92–100, 1 Sep. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25832996/>>. Acesso em 27 nov, 2020. DOI: 10.1016/j.envint.2015.02.013.

LIANG, Z. et al. Impact of mixed land-use practices on the microbial water quality in a subtropical coastal watershed. **Science of The Total Environment**, v. 449, p. 426–433, Apr. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969713001496>> . Acesso: 09 set, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.087.

LOCATELLI, M. A.; SODRE, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of Antibiotics in Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 3, p. 385–393, 2011.

LUCIEN, M. A. B. et al. Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: Perspective from resource-limited settings. **International Journal of Infectious Diseases**. v.104, p. 250-254, Mar. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971221000163>>. Acesso em: 3 jun. 2021. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.12.087.

LUZ, J. P. DA; MAZZARINO, J. M.; TURATTI, L. Água - Direito Humano Fundamental. **Revista Estudo & Debate**, Lajeado, v. 23, n. 2. p.265-279, 2016. Disponível em: <<http://www.univates.br/revistas/index.php/estudoedebate/article/view/1139/1055>>. Acesso em: 11 out, 2020. DOI: 10.22410/issn.1983-036X.v23i2a2016.1139.

MAAL-BARED, R. et al. Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 315–323, Jan. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969712014258>>. Acesso em: 27 fev, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.106.

MARQUEZI, M. C.; GALLO, C. R.; DIAS, C. T. dos S. Comparação entre métodos para a análise de coliformes totais e *E. coli* em amostras de água. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**,

São Paulo, v. 69, n. 3, p. 291–296, 2010. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/riahlutz/article/view/6329/6023>>. Acesso em: 07 nov. 2020.

MARTI, E.; VARIATZA, E.; BALCAZAR, J. L. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 36-41, Jan. 2014. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24289955/>>. Acesso em: 17 nov. 2020. DOI: 10.1016/j.tim.2013.11.001.

MARTINI, J. et al. Sulfamethoxazole degradation by combination of advanced oxidation processes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 4051-4060, Aug. 2020. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343718302938>>. Acesso em: 14 fev, 2021. DOI: 10.1016/j.jece.2018.05.047.

MARTINS, A. S. et al. Quality of raw water in the Guandu Basin of Rio de Janeiro state during water crisis of 2020, v. 16, n. 4, p. 1-11, May. 2021. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/ambiagua/a/mkmbPmdX8hyGsLTYz5BvfqB/?format=pdf&lang=en>>. Acesso em: 17 jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2703>.

MIRANDA, C. et al. Implications of antibiotics use during the COVID-19 pandemic: Present and future. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3413-3416, Dec. 2020. Disponível em:< <https://academic.oup.com/jac/article/75/12/3413/5896238>>. Acesso em: 03 fev, 2021. DOI: 10.1093/jac/dkaa350.

MONTEIRO, M. A. **Determinação de Resíduos de Antimicrobianos em Águas no Estado do Rio de Janeiro Associada à Avaliação do Perfil de Resistência Antimicrobiana e os seus Efeitos Ecotoxicológicos**. Rio de Janeiro, 2018, p. 197. Tese (Doutorado em Engenharia de processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2018.

MORETO, M. do. R. S. D. **Relação entre saúde pública e saneamento na bacia hidrográfica do ribeirão marinho, inserido na unidade de gerenciamento de recursos hídricos – 15, estado de São Paulo**. 2010, p. 76. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Gestão e Regulação em Recursos Hídricos – Prof-Água). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, SP, 2019.

NATHAN, C.; CARS, O. Antibiotic Resistance - Problems, Progress, and Prospects. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 19, p. 1761–1763, Nov. 2014. Disponível em:< <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmp1408040>>. Acesso em: 12 jul. 2020. DOI: 10.1056/NEJMp1408040.

NAVAB-DANESHMAND, T. et al. *Escherichia coli* contamination across multiple environmental compartments (soil, hands, drinking water, and handwashing water) in urban Harare: Correlations and risk factors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 803-813, 2018. Disponível em:< [/pmc/articles/PMC5930891/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30891/)>. Acesso em: 14 abr, 2020. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0521.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409–420, ago. 2011. Disponível em:<

<https://www.scielo.br/j/jbpm/la/kwn5RVkLXyYLzpQf5mbwCTt/?lang=pt>>. Acesso em: 19 nvo. 2020. DOI: 10.1590/S1676-24442011000400004.

OLASOJI, S. O. et al. Water quality assessment of surface and groundwater sources using a water quality index method: A case study of a peri-urban town in southwest, Nigeria.

Environments - MDPI, v. 6, n. 2, p. 1-23, Feb. 2019. Disponível em:<
<http://www.mdpi.com/2076-3298/6/2/23>>. Acesso em: 19 dez, 2020. DOI:
10.3390/environments6020023.

OLIVEIRA, T. R.; GOMES, R. P. Genes de resistência a β -lactamases na água bruta do Rio Meia Ponte –Goiás, **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.4, p.36330-36342, abr. 2021. Disponível em: < <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/27895/22076>>. Acesso em: 17 jan. 2022. DOI: 10.34117/bjdv7n4-206.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. **The review on antimicrobial resistance**. Mai, 2016. Disponível em: < https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2020.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU). **O Direito Humano à Água e ao Saneamento – Marcos**. Zaragoza, p. 4, 2010. Disponível em: < https://www.un.org/waterforlifedecade/pdf/human_right_to_water_and_sanitation_milestones_por.pdf>. Acesso em: 10 nov, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Resistência antimicrobiana**. 2015. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

PADILHA, R. G. **Desenvolvimento de uma metodologia de pcr em tempo real para quantificação de *Escherichia coli* em água para consumo humano**. 2016. P. 79. (Mestrado em Ciências (biotecnologia)). Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Duque de Caxias- RJ, 2016

PANDEY, P. K. et al. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. **AMB Express**, California, v. 4, n. 1, p. 1-16, Jun. 2014. Disponível em: < <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-014-0051-x>>. Acesso em: 17 fev. 2020. DOI: 10.1186/s13568-014-0051-x.

PARK, J et al. A waterborne outbreak of multiple diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections associated with drinking water at a school camp. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 66, p. 45-50, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article>>. Acesso em: 17 jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.09.021>.

PATEL, C. B. et al. Q-PCR based culture-independent enumeration and detection of enterobacter: An emerging environmental human pathogen in riverine systems and potable water. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 172-182, Feb. 2016. Disponível em:<
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389>>. Acesso em: 14 jun, 2021. DOI:
10.3389/fmicb.2016.00172.

PEHRSSON, E. C. et al. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. **Nature**, v. 533, n. 7602, p. 212–216, 12 mai. 2016. Disponível em: < [/pmc/articles/PMC4869995/](https://pmc/articles/PMC4869995/)>. Acesso em: 24 set. 2020. DOI: 10.1038/nature17672.

PENG, X. et al. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. **Science of The Total Environment**, v. 397, n. 1–3, p. 158–166, Jul. 2008. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969708002441>>. Acesso em: 17 ago, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.02.059.

PEREIRA, J. P. **Espacialização do uso de agrotóxico por região de saúde no RS**. 2014, p. 121. Monografia (Curso de Geografia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.

PERES, B. M. **Bactérias indicadoras e patogênicas em biofilmes de sistemas de tratamento de água, sistemas contaminados e esgoto**. 2011, p. 105. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

PERES, B. M. **Identificação e caracterização de bactérias patogênicas e indicadoras por métodos de cultivo e moleculares**. 2017, p. 84. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2017.

PIRES, S. M. et al. Attributing the human disease burden of foodborne infections to specific sources. **Foodborne pathogens and disease**, v. 6, n. 4, p. 417-424, May. 2009. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19415971/>>. Acesso em: 17 ago. 2020. DOI: 10.1089/fpd.2008.0208.

PNUD. **Fin de la crisis de agua y saneamiento**. In: Informe Mundial de Desarrollo Humano 2006, titulado “Más allá de la escasez: poder, pobreza y la crisis mundial”,. 2006.

RIBEIRO, J. W.; ROOKE, J. M. S. **Saneamento básico e sua relação com o meio ambiente e a saúde pública**. 2010, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora- MG. Disponível em: < <https://www.ufjf.br/analiseambiental/files/2009/11/TCC-SaneamentoSa%C3%BAde.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2022.

RIO GRANDE DO SUL. **Plano Estadual de Saneamento do Rio Grande do Sul (PLANESAN-RS)**, p. 255, dez. 2017. Disponível em: < <https://sema.rs.gov.br/upload/arquivos/202007/15182955-bloco01-programa-detalhado-de-trabalho.pdf>>. Acesso em: 17 abr, 2021.

RITTER, L. G. et al. Manejo da micro bacia do Lajeado Pardo. **Holos**, v. 6, p. 123, dez. 2015. Disponível em: < <http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/1685>>. Acesso em: 17 mar, 2021. DOI: 10.15628/holos.2015.1685.

ROCHELLE-NEWALL, E. et al. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-15, Apr. 2015. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00308/full>>. Acesso em: 14 nov, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00308.

SADIK, N. J. et al. Quantification of multiple waterborne pathogens in drinking water, drainage channels, and surface water in Kampala, Uganda, during seasonal variation. **GeoHealth**, v. 1, n. 6, p. 258-269, 31 Ago. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2017GH000081>>. Acesso em: 12 mar, 2020. DOI: 10.1002/2017GH000081.

SAEEDI, P. et al. A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals. **Microbial Pathogenesis**, v. 103, p. 186–195, Feb. 2017. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.01.001.

SCHETS, F. M. et al. *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water from private water supplies in the Netherlands. **Water Research**, v. 39, n. 18, p. 4485-4493, Nov, 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135405004902>>. Acesso em: 11 set, 2020. DOI: 10.1016/j.watres.2005.08.025.

SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M.K.; GROSSART, H. P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in microbiology**, v. 4, n. 47, p. 1-13, Mar. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3594987/>>. Acesso em: 19 fev. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00047.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 1, p. 1-22, 1 Apr. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701206003587>>. Acesso em: 11 jul, 2020. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.12.008

SILVA, R. A. da. et al. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 126, p. 607–623, set. 2020. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/sdeb/a/8sybmgm7ZxDmzF8stXfY9KS/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 15 dez. 2020. DOI: 10.1590/0103-1104202012602.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO (SNIS). 24º **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto**. Brasília, p. 186, dez. 2019. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/downloads/diagnosticos/ae/2018/Diagnostico_AE2018.pdf>. Acesso em: 17 jul, 2021.

STALEY, Z. R. et al. Agrochemicals indirectly increase survival of *E. coli* O157:H7 and indicator bacteria by reducing ecosystem services. **Ecological Applications**, v. 24, n. 8, p. 1945–1953, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29185664/>>. Acesso em: 22 Apr, 2021. DOI: 10.1890/13-1242.1.

SZYMAŃSKA, U. et al. Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: Recent trends and perspectives. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 729–740, Jun. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X18318617>>. Acesso em: 08 ago, 2020. DOI: 10.1016/j.microc.2019.04.003.

TRENT, M. et al. Access to Household Water Quality Information Leads to Safer Water: A Cluster Randomized Controlled Trial in India. **Environmental Science & Technology**, v. 52,

n. 9, p. 5319–5329, Mai, 2018. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.8b00035>>. Acesso: 17 fev, 2021. DOI: 10.1021/acs.est.8b00035.

TUNDISI, J. G.; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 631p.

TUDISI, JOSÉ GALIZIA; MATSUMURA- TUNDISI, T. **Recursos Hídricos no século XXI**. São Paulo: Oficina de Textos, 2011.

UNITED NATIONS CHILDREN’S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION. (UNICEF; WHO). **Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017: Special focus on inequalities**. New York, 2019. Disponível em: <<https://www.unicef.org/brazil/comunicados-de-imprensa/1-em-cada-3-pessoas-no-mundo-nao-tem-acesso-agua-potavel-dizem-unicef-oms>>. Acesso em: 14 Dec. 2020.

VALCÁRCEL, Y. et al. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. **Chemosphere**, v. 84, n. 10, p. 1336–1348, Sep. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004565351100539X>>. Acesso em: 17 jul, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.05.014.

VALENTINI, M. H. K. et al. Análise estatística de correlação e de variância do monitoramento da água bruta da Estação de Tratamento de Água Terras Baixas – Pelotas/RS, **Revista Thema**, v. 19, n. 3, p. 600-614, 2021. Disponível em: <<https://periodicos.ifsul.edu.br/index.php/thema/article/view/1702/1906>>. Acesso em: 17 jan.2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.15536/thema.V19.2021.600-614.1702>.

VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, v. 84, n. 2, p. 523-538, Jan. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11192-009-0146-3>>. Acesso em: 17 jan. 2020. DOI: 10.1007/s11192-009-0146-3.

VELUSAMY, V. et al. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 2, p. 232–254, Mar. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975009002134>>. Acesso em: 17 dez, 2020. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.

VITAL, M. et al. Evaluating the Growth Potential of Pathogenic Bacteria in Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6477-6484, Ouc. 2010. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00794-10>>. Acesso em: 19 mai. 2021. DOI: 10.1128/AEM.00794-10.

VOLPI, G. B. et al. (*no prelo*). **Parâmetros de qualidade de água avaliados na micro bacia Lajeado Pardo no município de Frederico Westphalen – Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, RS.

VOULGARI, E. et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* : now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiology**, v. 8, n. 1, p.

27-39, Jan. 2013. Disponível em: <
<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.12.130>>. Acesso em: 25 nov, 2020. DOI:
 10.2217/fmb.12.130.

WALKER, D. I. et al. A highly specific *Escherichia coli* qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. **Water Research**, v. 126, p. 101–110, 1 Dec. 2017. Disponível em:< <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135417306942>>. Acesso em: 09 out, 2020. DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.032.

WALL, B. A. et al. **Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production**. FAO, p. 1-58, 2016. Disponível em: <
<http://www.fao.org/documents/card/es/c/d5f6d40d-ef08-4fcc-866b-5e5a92a12dbf/>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

WANG, Y. et al. Spatio-temporal distribution of fecal indicators in three rivers of the Haihe River Basin, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 10, p. 9036-9047, apr. 2017. Disponível em: < <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-5907-3>>. Acesso em: 23 ago, 2020. DOI: 10.1007/s11356-015-5907-3.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**, v. 43, n. 148, p. 348–365, 2017. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/>>. Acesso em: 19 mai, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2016 – 2018**. Early implementation. Geneva, 2018. Disponível em: <
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277359/9789241514880-eng.pdf>>. Acesso em: 17 jan, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections. No time to wait: infections from drug-resistant securing the future report to the Secretary-General of the United Nations**. Apr. 2019. Disponível em:< https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf?sfvrsn=5b424d7_6>. Acesso em: 23 jul, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNITED NATIONS CHILDREN’S FUND (WHO, UNICEF). **Water for life making it happen**. Geneva, 2005. Disponível em:<
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/43224>>. Acesso em: 05 mar. 2020.

WUIJTS, S. et al. Towards a research agenda for water, sanitation and antimicrobial resistance. **Journal of Water and Health**, v. 15, n. 2, p. 175-184, Apr. 2017. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28362299/>>. Acesso em: 29 nov, 2020. DOI: 10.2166/wh.2017.124.

YANG, K. et al. Global distribution of outbreaks of water-associated infectious diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1483, fev. 2012. Disponível em: <
<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001483>>. Acesso em: 14 ago, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001483.