

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



# **Análise microbiológica da água: técnica de PCR**

**Carolina de Lemos Coelho**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2020**



**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



# **Análise microbiológica da água: técnica de PCR**

**Carolina de Lemos Coelho**

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de  
Farmácia**

**Orientador: Professora Auxiliar, Doutora Cristina Maria  
Martins de Almeida**

**2020**



## Resumo

A falta de saneamento básico, condições de higiene, ou acesso a água potável são problemas a nível mundial com consequências nefastas para a saúde pública, devido à ingestão e utilização de água contaminada com microrganismos. No âmbito dos objetivos para o desenvolvimento sustentável para 2030 torna-se essencial encontrar soluções para contornar estes problemas de saúde pública, sendo importante a aplicação de métodos mais eficazes na deteção de microrganismos na água. Consequentemente, será possível atuar mais rapidamente no tratamento da água e prevenir surtos de doenças como é o caso da diarreia causada pela ingestão de água contaminada com *E.coli*.

Com este objetivo, são discutidos os fatores e as técnicas que contribuem para a melhoria da qualidade da água, bem como a suas vantagens e limitações. Entre elas constam a cloração e a sua monitorização em conjunto com a análise microbiológica da água por métodos de cultura e deteção rápida. Atualmente as normas estabelecem os métodos baseados em cultura como o método de referência para a análise microbiológica da água. No entanto estes métodos apresentam níveis de rapidez insatisfatórios na obtenção de resultados e consequentemente na eficácia de prevenção de surtos. Neste âmbito, torna-se necessário a implementação de técnicas com resultados mais rápidos e fiáveis como é o caso da reação de polimerização em cadeia quantitativa (qPCR). Esta revisão fornece uma descrição atualizada dos princípios gerais, vantagens e limitações da qPCR assim como os parâmetros de validação da mesma. Este método demonstrou ser uma técnica muito eficaz, com níveis de sensibilidade e precisão elevados que ao identificar e quantificar simultaneamente o organismo alvo consegue obter resultados rápidos e fiáveis de modo a tomar medidas preventivas e corretivas. Por esta razão é proposta a adoção desta técnica como método de referência para a monitorização microbiológica da água. Existem diferentes variantes da técnica de qPCR como a reação de polimerização em cadeia multiplex (multiplex-PCR), *nested* PCR e o PCR digital (dPCR) que permitem adaptar-se às diferentes necessidades de deteção de microrganismos. No entanto, é necessário padronizar os protocolos qPCR para obter concordância relativamente aos procedimentos a adotar nos diferentes laboratórios, sendo necessário a validação dos métodos adotados.

**Palavras-chave:** qPCR, análise microbiológica, qualidade da água, desinfecção, desenvolvimento sustentável

## Abstract

The lack of basic sanitation services, hygiene conditions, or access to drinking water is a worldwide problem that threatens public health due to the consumption of contaminated water by microorganisms. In the context of the sustainable development goals for 2030, it is essential to find solutions to overcome these public health problems and to apply more effective methods for detecting microorganisms in the water to prevent outbreaks of diseases such as diarrhea due to intake of contaminated water with *E.coli*.

Based on this goal, the factors and techniques to the improvement of water quality, as well as its advantages and limitations are discussed. These include chlorination and monitoring together with microbiological analysis of the water using culture and rapid detection methods. Currently, the culture-based methods were adopted as reference methods for microbiological analysis of water. However, these methods show unsatisfactory levels of speed in achieving results and, consequently, in the effectiveness of preventing outbreaks. Therefore, it is necessary to implement techniques with faster and more reliable results such as the quantitative polymerase chain reaction (qPCR). This review provides an up-to-date description of the general principles, advantages and limitations of qPCR as well as its validation parameters. This method has proven to be a very effective technique with high levels of sensitivity and precision by simultaneously identifying and quantifying the target organism. It can obtain rapid and reliable results to take preventive and corrective measures. For this reason, it is proposed to adopt this technique as a reference method for the microbiological monitoring of water. There are different variants of the qPCR technique such as multiplex-PCR, nested PCR and dPCR which allow adapting to the different needs of detection of microorganisms. There is, however, a need to standardize the qPCR protocols to obtain agreement on the procedures to be adopted.

**Key words:** qPCR, microbiological analysis, water quality, disinfection, sustainable development

## Agradecimentos

A elaboração deste trabalho e todo o percurso ao longo destes 5 anos até ter chegado aqui não seria possível sem aqueles que sempre me acompanharam e me viram crescer e que com a sua experiência me ajudaram a ultrapassar obstáculos e a fazer escolhas certas ao longo da vida.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Cristina Almeida, pela ajuda, dedicação, conhecimento e exigência assim como disponibilidade para me ajudar sempre que foi preciso.

Durante este tempo na faculdade, e que agora espero para o resto da vida, fui acompanhada pelas minhas amigas, Maria Duarte, Mariana Malagueira e Mariana Pereira a quem gostaria de agradecer por todo o apoio e partilha de momentos de vitória e também de frustração inerentes a qualquer percurso de um aluno do ensino superior. A interajuda que senti desde o início foi essencial para chegar até aqui.

Ao tubo de ensaios e a todos os seus elementos, desde os mais velhos até aos mais novos. Com este grupo aprendi o que é união, que se pode fazer tanto com tão pouco e que se realmente gostarmos daquilo que fazemos tudo é possível. Com eles o meu percurso académico tornou-se melhor do que alguma vez imaginei.

Ao meu grupo de amigos que trago da escola, em particular às minhas grandes amigas, Alexandra Prates, Carolina Faria, Rita Franco e Sofia Albuquerque, que sempre foram o meu porto seguro e que agora me vêm iniciar uma nova etapa que sem elas era mais difícil. Cada um dos seus percursos inspira-me a ser mais e melhor.

Ao Tomás, que com a sua paciência e amor me apoiou incondicionalmente e me incentivou a acreditar em mim. Com o seu exemplo de perseverança e dedicação aprendi muito.

Aos meus avós, Milu e Sílvio, que sei que mesmo sem estarem cá, teriam orgulho por tudo aquilo que alcancei e que me fazem sentir feliz por isso.

Ao meu irmão que me mostra sempre que a vida pode ser levada com leveza e brincadeira e que me transportou para sítios felizes e sem preocupações quando eu mais precisava.

Por fim, aos meus pais, que sempre me deram liberdade para fazer as minhas escolhas e que me deram espaço para errar e aprender sem juízos de valor. Que me fazem ver as minhas melhores qualidades e ensinam-me que nada se consegue sem esforço e trabalho todos os dias. Por todas as oportunidades que me deram e dedicação ao trabalho e à família, tornando-se o meu maior exemplo.

# Índice

Resumo.....	II
Abstract.....	III
Agradecimentos.....	IV
Índice de figuras.....	VII
Índice de tabelas.....	VIII
Acrónimos e abreviaturas.....	IX
1. Qualidade da água e saúde.....	1
1.1. Nota introdutória.....	1
1.2. Desenvolvimento sustentável: a importância da água.....	2
1.3. Água e saneamento.....	4
1.4. Contaminação microbiológica da água e saúde.....	5
1.4.1. Doenças hídricas: diarreia de origem infecciosa.....	6
1.5. Legislação nacional: parâmetros de controlo microbiológico e da desinfeção.....	8
2. Métodos de desinfeção da água.....	11
2.1. Cloração.....	11
2.1.1 Relação entre cloração, desinfeção e crescimento bacteriano.....	13
2.1.2. Cloro residual.....	14
2.1.2.1. Monitorização dos níveis de cloro residual.....	14
3. Métodos analíticos para o controlo microbiológico da água.....	16
3.1. Métodos de deteção rápida.....	16
3.2. <i>HPC</i> : contagem de microrganismos heterotróficos em placas.....	18
3.3. Técnica de fermentação em tubos múltiplos.....	20
3.4. PCR: reação de polimerização em cadeia.....	20
3.4.1 Fundamento e aplicações do método.....	21
3.4.2. Procedimento da técnica de PCR.....	22
3.4.3. Deteção e quantificação dos produtos de PCR em tempo real.....	23
3.4.3.1. Método da sonda TaqMan.....	24
3.4.3.2. Método do corante SYBR Green.....	25
3.4.4. Variantes da técnica de PCR.....	26
3.4.5. Validação do método.....	27
3.4.5.1 Especificidade.....	27
3.4.5.2. Precisão.....	28



3.4.5.3. Limite de quantificação (LOQ) .....	29
3.4.5.4. Limite de detecção (LOD) .....	29
3.4.5.5. Linearidade .....	30
3.4.5.6. Veracidade .....	31
3.4.5.7. Robustez .....	31
3.4.6. Vantagens e desvantagens do método PCR .....	31
3.4.7. Comparação entre qPCR e métodos de cultura .....	33
3.4.8. Inovação/otimização do método PCR .....	38
4. Conclusão .....	40
5. Bibliografia .....	42

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Os objetivos para o desenvolvimento sustentável para 2030 .....	3
<b>Figura 2</b> Percentagem de mortes entre crianças com menos de 5 anos causada doenças diarreicas, 2015 .....	8
<b>Figura 3</b> Relação entre HOCl e OCl <sup>-</sup> em vários valores de pH.....	13
<b>Figura 4</b> Mecanismo da sonda TaqMan.....	24
<b>Figura 5</b> Mecanismo da sonda SYBR Green .....	25
<b>Figura 6</b> Curva padrão para o uidA qPCR .....	34
<b>Figura 7</b> Concentrações de <i>E.coli</i> em amostras de água retiradas de vários locais. Para dois dos locais (estuário e águas balneares), foi adicionada uma quantidade conhecida de <i>E.coli</i> .....	35
<b>Figura 8 a)</b> Comparação do número de cópias do uidA qPCR em função da contagem de colónias para <i>E.coli</i> em amostras de água ambiental <b>b)</b> respetiva legenda. Está representada a regressão linear em qPCR com >100 CFU/PCR para o ensaio uidA ( $R^2=0,639$ ) .....	36
<b>Figura 9</b> Concentrações de <i>E.coli</i> calculadas a partir dos resultados do uidA qPCR em relação aos resultados de <i>E.coli</i> medidos para as amostras com concentrações de <i>E.coli</i> >1000 CFU/100 mL conforme medido por cultura e respetiva legenda .....	37

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> Parâmetros microbiológicos de rotina 1 .....	9
<b>Tabela 2</b> Parâmetros microbiológicos de rotina 2 .....	9
<b>Tabela 3</b> Parâmetros de controlo de desinfeção de rotina 2 .....	9
<b>Tabela 4</b> Concentrações de DNA para amostras de água (desvios padrão) .....	35
<b>Tabela 5</b> Comparação da percentagem das reações uidA qPCR sem amplificação em várias gamas de concentração de <i>E.coli</i> .....	37

## Acrónimos e abreviaturas

<b><math>\Delta Rn</math></b>	Sinal de fluorescência
<b>AT</b>	Adenina-Timina
<b>BGLB</b>	<i>Brilliant green lactose broth</i> , meio biliar de lactose verde brilhante
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> , albumina de soro bovino
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i> , Limiar de detecção
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , ácido desoxirribonucleico
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>dPCR</b>	<i>Digital PCR</i> , PCR digital
<b>DPD</b>	N,N-dietil- <i>p</i> -fenilenodiamina
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EMA</b>	<i>Ethidium Monoazide Bromide</i> , brometo de monoazida de etídeo
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i> , agência de proteção ambiental
<b>ERSAR</b>	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
<b>ETAR</b>	Estação de Tratamento de Águas Residuais
<b>FACTS</b>	<i>Free Available Chlorine Test, Syringaldazine</i> , teste da siringaldazina para a determinação do cloro livre
<b>GC</b>	Guanina-Citosina
<b>HAA</b>	Haloacetic Acids, ácidos haloacéticos
<b>HPC</b>	<i>Heterotrophic Plate Count</i> , contagem de microrganismos heterotróficos em placas
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i> , Organização Internacional de Padronização
<b>LOD</b>	<i>Limit Of Detection</i> , limite de detecção
<b>LOQ</b>	<i>Limit Of Quantification</i> , limite de quantificação
<b>MF</b>	<i>Membrane Filter method</i> , método filtro de membrana
<b>MPN</b>	<i>Most Probable Number</i> , número mais provável
<b>MRC</b>	Materiais de Referência Certificados
<b>NASBA</b>	<i>Nucleic Acid Sequence-Based Amplification</i> , amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos
<b>ODS 2030</b>	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável para 2030
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ONU</b>	Organização das Nações Unidas
<b>PAO</b>	<i>Phenylarsine Oxide</i> , óxido de fenilarsina
<b>PCA</b>	<i>Plate Count Agar</i> , agar para contagem em placa

<b>PMA</b>	<i>Propidium Monoazide</i> , monoazida de propídio
<b>PP</b>	<i>Pour Plate method</i> , método de placas
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> , reação de polimerização em cadeia quantitativa
<b>R</b>	Coefficiente de correlação
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinação
<b>R2A</b>	<i>Reasoner's 2A Agar</i>
<b>SP</b>	<i>Spread Plate method</i> , método de espalhamento em placas
<b>TBX</b>	<i>Tryptone Bile X-Glucuronide</i> , sais biliares de triptona com X-glucuronídeo
<b>THMs</b>	Trihalometanos
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colónias
<b>UNICEF</b>	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i> , Fundo das Nações Unidas para a Infância
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VBNC</b>	<i>Viable But Nonculturable</i> , viáveis mas não cultiváveis
<b>VP</b>	Valores Paramétricos
<b>WASH</b>	<i>Water, Sanitation and Hygiene</i> , água potável, saneamento e higiene

# 1. Qualidade da água e saúde

## 1.1. Nota introdutória

A contaminação de água para consumo humano representa uma preocupação significativa no que diz respeito à saúde pública. O risco microbiológico contribui para a existência e evolução de doenças hídricas em países desenvolvidos e subdesenvolvidos com diversos impactos na saúde da população e na economia. A presença de substâncias químicas indesejáveis ou poluentes, quer de origem natural ou antropogénica também são responsáveis pelo aparecimento de nefastos problemas de saúde (1). A falta de sistemas de saneamento, leva ao aparecimento de doenças como por exemplo a diarreia de origem infecciosa por utilização e ingestão de água contaminada, uma das principais causas de doença e morte entre crianças com menos de 5 anos em países subdesenvolvidos (2). De modo a reconhecer a importância da água para o desenvolvimento das populações e quais as ações que podem ser tomadas no sentido de contornar os vários problemas associados ao consumo e falta de acesso a água potável, a Organização das Nações Unidas (ONU) em conjunto com outras entidades como o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), desenvolveram um plano de ação a nível internacional: os “Objetivos de Desenvolvimento Sustentável para 2030 (ODS)” (3). Em concordância com estes objetivos, também são feitos esforços a nível nacional para valorizar a água como recurso indispensável e assegurar a disponibilidade desta com uma qualidade satisfatória. Para isso existem entidades responsáveis como é o caso das Águas de Portugal, cujo objetivo passa por conceber, construir, explorar e gerir sistemas de abastecimento de água e de saneamento de águas residuais, garantindo a sustentabilidade económica, financeira, técnica, social e ambiental deste recurso natural (4).

O ciclo urbano da água corresponde a todas as etapas e fases de utilização da água desde o momento em que é captada até ao momento da sua restituição à natureza. A água captada sofre vários tratamentos, de forma a corrigir as características físicas, químicas e bacteriológicas, tornando-a adequada para consumo. Depois da sua utilização, as águas são recolhidas e encaminhadas para as estações de tratamento de águas residuais (ETAR) onde ocorrem vários tratamentos, de forma a assegurar uma qualidade adequada para a sua libertação no meio hídrico recetor (rio). O saneamento seguro e a deteção eficaz de contaminações são essenciais para a defesa da saúde dos ecossistemas e humana (4).

Ao nível doméstico, também são usados sistemas de tratamento de água, os quais permitem a correção ou melhoria de alguns parâmetros de qualidade da água (tratamento de afinação). Neste grupo de sistemas de tratamento, destacam-se os sistemas com microfiltros

(5) e os descalcificadores (6). No entanto, estes dispositivos também podem apresentar problemas de higienização (7) uma vez que a água potável contém bactérias aeróbicas e heterotróficas, algumas das quais particularmente resistentes ao desinfetante (6,8). Estas podem originar a formação de biofilmes no interior do sistema, representando uma fonte de contaminação indesejável (9–11). A proliferação destes microrganismos e o desenvolvimento destes biofilmes é maior nos filtros de carbono ativo que removem o cloro e onde os fluxos de água são menores, permitindo a estagnação de água. A *Pseudomonas aeruginosa* é a bactéria mais frequentemente encontrada (5). Os limites definidos pelo Decreto-Lei n.º 152/2017 (12) para a presença de microrganismos são restritos, sendo necessário monitorizar não só a qualidade da água, assim como, a eficácia dos processos higienização, os quais utilizam soluções de cloro (5,13,14).

Neste contexto é vantajoso a utilização de técnicas analíticas que permitem obter resultados em tempo real da presença e concentração de bactérias como a *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococci* (15,16). O método de reação de polimerização em cadeia quantitativa (qPCR) apresenta-se como um método de controlo microbiológico da qualidade da água promissor e inovador, permitindo uma avaliação da qualidade da água em 4 a 8 horas, em contraste com os métodos convencionais, como o método de cultura, o qual só permite obter resultados em 24 horas a vários dias.

## **1.2. Desenvolvimento sustentável: a importância da água**

O desenvolvimento sustentável é definido como um desenvolvimento que satisfaz as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de satisfazerem as suas próprias necessidades. Para além de assegurar os recursos necessários à vida das gerações futuras, o principal objetivo do desenvolvimento sustentável passa pela estabilidade económica, social e ambiental a longo prazo. Erradicar a pobreza em todas as suas formas e dimensões, aliada à proteção dos direitos humanos é indispensável e representa o maior desafio global para atingir as metas de um desenvolvimento sustentável. O acesso equitativo à educação, cuidados de saúde, higiene, saneamento, água potável, alimentação, entre outros são direitos universais que em muitos países, principalmente nos subdesenvolvidos não são respeitados. Por esta razão foi criado um plano de ação em que constam 17 objetivos para o desenvolvimento sustentável [Fig. 1] a serem cumpridos até 2030, o qual inclui várias áreas de ação que em conjunto pretendem tornar o planeta mais sustentável e as comunidades mais justas, aumentando a qualidade de vida dos cidadãos (3).

O progresso na alimentação, saúde, educação, trabalho, igualdade e proteção ambiental está relacionado com a disponibilidade e gestão sustentável de diversos recursos, entre eles a água e o acesso universal a sistemas eficazes de eliminação dos nossos resíduos.

Atualmente ainda existem bilhões de pessoas sem acesso à água potável e saneamento, resultando em mortes evitáveis, doenças crônicas, falta de oportunidade de educação e reduzida produtividade (3).

Ao mesmo tempo a procura e utilização de água para a agricultura e indústria, principalmente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, assim como o seu uso doméstico, está a aumentar e a poluição da água e degradação de ecossistemas estão a ser agravados pelo aumento de descargas de águas residuais não tratadas. É necessário combater o fraco financiamento, planeamento e capacidade dos serviços de distribuição de água e saneamento e tornar a resolução deste problema uma prioridade. Consequentemente, devem ser aplicadas novas tecnologias e recolhidos dados inerentes a estes avanços tecnológicos, para que esta mudança seja eficaz e seja analisado o impacte no nível de vida das pessoas (3).



**Figura 1** Os objetivos para o desenvolvimento sustentável para 2030 (3)

Podemos perceber que a falta de acesso a água potável ou a má utilização da mesma geram diversos problemas que são de extrema importância para a preservação da água como recurso natural e a reafirmação da sua disponibilidade como um direito universal. Existem diversas ações que podem ser tomadas de modo a contornar estes problemas que são contempladas no ODS 6, que estabelece que o acesso a água potável, criação de melhores condições de higiene e o saneamento básico, são direitos humanos fundamentais e que é necessário assegurar a disponibilidade e gestão sustentável da água e saneamento para todos (3).

Os recursos hídricos estão integrados em todas as formas de desenvolvimento (por exemplo, segurança alimentar, promoção para a saúde e redução da pobreza), na sustentabilidade do crescimento económico na agricultura, indústria e produção de energia, influenciando também a manutenção de ecossistemas saudáveis. As estimativas sugerem



que se o ambiente continuar a ser degradado e se a utilização insustentável aplicada aos recursos hídricos continuar, 45% do produto interno bruto, 52% da população mundial e 40% da produção de ganhos mundiais pode ser posta em causa em 2050. Como consequência populações pobres e marginalizadas vão ser desproporcionalmente afetadas pela falta de água, aumentando ainda mais a desigualdade (3).

Neste contexto, é importante reconhecer o valor da água como recurso através da sua utilização consciente, correto saneamento e implementação de medidas de higiene eficazes para o desenvolvimento de um nível de vida melhor, que contribui para a proteção da saúde e do meio ambiente e proteção das comunidades mais vulneráveis (17).

O acesso universal a água, saneamento e higiene (WASH) é essencial para acabar com as mortes evitáveis por doenças hídricas como a diarreia, e para melhorar a nutrição, a prestação de serviços de saúde, o bem-estar social e a produtividade económica (17). Além disso, a maior parte da água captada é utilizada na agricultura, e consequentemente, a escassez de água limita a produção de comida, particularmente em países em desenvolvimento, onde a procura de alimentos está a aumentar e a subnutrição é endémica, agravando os problemas de segurança alimentar e de sobrevivência das populações (3).

De modo a cumprir as metas propostas, e a contornar estes problemas, o ODS 6 contempla oito objetivos globais que são universalmente aplicáveis e que englobam todo o ciclo da água (3,18) desde o abastecimento, saneamento e higiene e o seu impacto, bem como a monitorização do tratamento de águas residuais e a sua reutilização segura e eficiente e a proteção e restituição dos ecossistemas relacionados com água.

Este objetivo acaba por influenciar outros como o objetivo 3, “Vida Saudável”, o qual está associado à melhoria da qualidade da água e o término das epidemias, entre elas, o das doenças transmitidas pela água (17,19).

Podemos, de acordo com estas metas, enquadrar também a necessidade de melhoria das capacidades de controlo da qualidade da água como uma medida complementar. A utilização de métodos com maior eficiência como a qPCR, aumenta a fiabilidade e rapidez da deteção de microrganismos infecciosos na água, permitindo atuar mais rapidamente no tratamento da água contaminada e consequentemente reduzir a taxa de incidência de doenças transmitidas pela água (2).

### **1.3. Água e saneamento**

O setor das águas subdivide-se em duas áreas distintas: o de abastecimento de água para consumo humano e o de saneamento de águas residuais urbanas. O ciclo urbano da água engloba todas as fases referidas para as atividades de abastecimento de água e saneamento de águas residuais, desde a captação da água até à rejeição final da água residual na

natureza. A atividade de saneamento de águas residuais urbanas compreende a descarga, a drenagem, a elevação, o transporte e o tratamento das águas residuais de origem urbana, bem como a sua rejeição no meio hídrico. Esta atividade é fundamental para garantir a qualidade da água, sendo determinante na integração das águas residuais, após tratamento adequado, num meio recetor aquático ou terrestre com a finalidade da sua reutilização, valorizando este recurso essencial à vida. As atividades de abastecimento público de água às populações e o saneamento de águas residuais urbanas constituem serviços públicos essenciais ao bem-estar geral, à saúde pública, à segurança das populações, às atividades económicas e à proteção do ambiente. Em Portugal, a entidade reguladora dos serviços e águas e resíduos (ERSAR) regula os serviços de abastecimento público de água e de saneamento de águas residuais urbanas, bem como de gestão de resíduos urbanos, e é a autoridade competente para a qualidade da água para consumo humano, garantindo a proteção dos utilizadores e a sustentabilidade da prestação dos serviços (20).

Em conjunto com a melhoria dos sistemas de saneamento, a implementação de planos de segurança, de controlo e vigilância da qualidade da água e recolha e tratamento de dados, torna possível a identificação e avaliação de riscos potenciais à saúde relacionados com falhas no saneamento. Assim é possível garantir a melhoria da qualidade, quantidade, acessibilidade, cobertura e continuidade do fornecimento de água potável dentro os padrões aceitáveis, de modo a evitar possíveis contaminações e consequentemente epidemias provocadas pelo consumo de água contaminada com microrganismos patogénicos (15,20).

Mundialmente, estima-se que a falta de acesso a água potável em conjunto com condições de higiene e saneamento inadequadas seja responsável por 1,8 milhões de mortes anuais e afeta 1,1 biliões de pessoas (15,18). A falta de saneamento e o armazenamento impróprio da água no circuito de tratamento e nas habitações dos consumidores, contribuem para a contaminação da mesma com resíduos fecais, expondo os consumidores a estes contaminantes, os quais comprometem a sua saúde (21), aumentam o risco de contrair doenças, estando também na origem de surtos infecciosos de origem hídrica (16,21).

#### **1.4. Contaminação microbiológica da água e saúde**

A ingestão de água contaminada com bactérias é a origem de grandes surtos de doenças e a sua transmissão tem um grande impacte na saúde humana. As fezes de animais ou humanas são a maior fonte de bactérias patogénicas, vírus, protozoários e helmintas (22) que são responsáveis pela transmissão das doenças via fecal-oral (21).

A contaminação fecal da água é identificada através da deteção de bactérias indicadoras como a *E.coli* numa amostra de 100 mL. Enquanto a presença de *E.coli* na água para consumo humano indica que esta está contaminada e imprópria para consumo, a sua

ausência não garante a sua segurança (23) uma vez que as bactérias têm a capacidade de entrar num estado viável não cultivável que lhes permite persistir no ambiente por longos períodos de tempo podendo causar doenças. Podem desenvolver resistência antimicrobiana pelo uso indevido de agentes antimicrobianos em pessoas e animais e pela sua libertação ambiental (por exemplo, antibióticos presentes nas águas residuais na forma livre ou na forma de metabolitos em resultado da sua utilização terapêutica). A exposição a bactérias resistentes a antibióticos pode levar a infeções difíceis ou mesmo impossíveis de tratar (23).

Como exemplos de surtos de origem hídrica podemos incluir a febre tifoide, cólera, hepatite infecciosa e a diarreia. Há vários microrganismos bacterianos potencialmente transmitidos pela água com modelos conhecidos de dose-resposta como o *Vibrio*, *Campylobacter*, *E. coli* O157, *Salmonella* e *Shigella*. Por exemplo a *Campylobacter* é uma importante causa de diarreia em todo o mundo sendo relativamente comum no meio ambiente. A *Shigella* causa mais de 2 milhões de infeções a cada ano, incluindo cerca de 60.000 mortes, principalmente nos países em desenvolvimento (24).

Apesar da desinfecção ser uma ferramenta de inativação microbiana, a segurança aumenta se houver a proteção dos recursos hídricos, seleção e métodos adequados para detetar microrganismos nas etapas de tratamento da água e gestão de sistemas de distribuição. Sem o constante e eficiente controlo destes sistemas, os surtos podem voltar a aparecer (25).

No que diz respeito à deteção exata e rápida destes microrganismos, torna-se essencial o desenvolvimento e aplicação de técnicas para examinar a qualidade da água de consumo, uma vez que os surtos de doenças transmitidas pela água podem afetar um grande número de pessoas em pouco tempo. Além disso podem ocorrer situações complexas, como é o caso da *Legionella*, com sintomas clínicos da doença difíceis de distinguir do de outras formas de pneumonia, em que se torna urgente identificar a espécie, de modo a adequar corretamente o tratamento e a localizar a fonte, prevenindo a saúde do cidadão (26).

Juntamente com a melhoria do acesso a água potável, saneamento adequado e promoção de boas práticas de higiene e pelas razões e exemplos já mencionados, é importante reiterar a importância do investimento em esforços para melhorar os sistemas de controlo de qualidade das águas do que toca à deteção de microrganismos de forma rápida e precisa.

#### **1.4.1. Doenças hídricas: diarreia de origem infecciosa**

As doenças transmitidas pela água estão intimamente ligadas não só à ingestão ou exposição a esta, mas também ao saneamento e à disponibilidade de água limpa para lavagem das mãos e higiene do corpo (27). Assim a água potável, saneamento e higiene inadequada podem ter um impacto adverso na saúde através de diferentes vias de

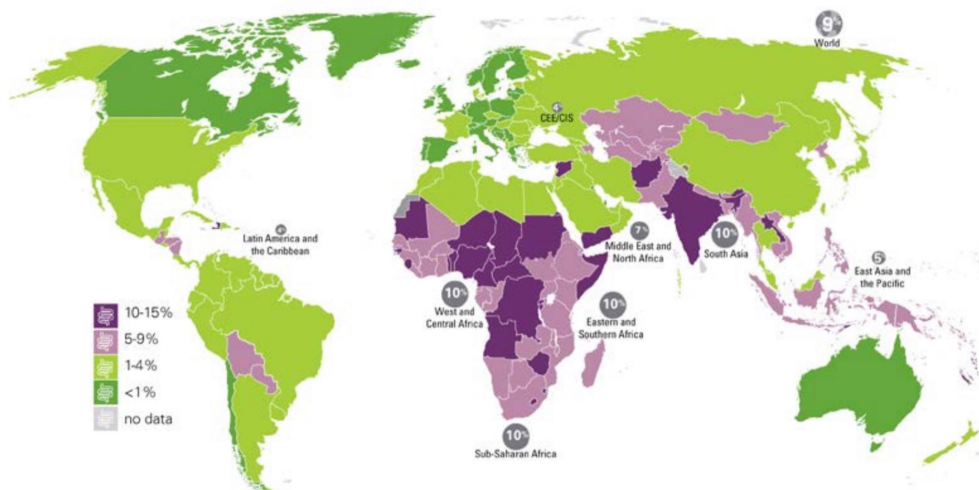
transmissão (25) gerando doenças como a diarreia, tracoma, sarna, esquistossomose, malária, dengue e legionelose, entre outras (25).

A diarreia é um sintoma comum das infecções gastrointestinais causadas por uma vasta gama de agentes patogênicos, incluindo bactérias. Contudo, apenas alguns agentes são responsáveis pela maioria dos casos agudos de diarreia infantil. O rotavírus é a principal causa de diarreia aguda. Outros agentes patogênicos bacterianos importantes incluem *E. coli*, *Shigella*, *Campylobacter* e *Salmonella*, juntamente com *Vibrio cholerae*. A maioria dos agentes patogênicos que causam diarreia partilham um modo de transmissão semelhante – a transmissão fecal-oral (27,28).

Estima-se que 88% das mortes causadas por diarreia em todo o mundo sejam atribuídas a água contaminada, saneamento inadequado e falta de higiene. As intervenções para melhorar a qualidade da água na fonte, juntamente com o tratamento da água em casa e dos sistemas de armazenamento adequados, demonstraram reduzir a incidência de diarreia entre 28% e 47 %. Com estas medidas, as mortes por diarreia entre crianças com menos de cinco anos diminuíram mais de metade, de 1,5 milhões em 1990 para 622 000 em 2012 (28). Na **[Fig. 2]** podemos ver a distribuição da percentagem de mortes por diarreia em crianças com menos 5 anos em diferentes regiões do mundo. Embora a maioria das mortes por diarreia ocorra em países subdesenvolvidos, o risco de surtos de doenças transmitidas pela água continua a ser uma ameaça constante, mesmo nos países mais desenvolvidos, caso as barreiras à contaminação da água sejam comprometidas (27).

Verifica-se um risco de contrair doenças através da água quando se passa de más condições de fornecimento de água potável para a implementação de sistemas de canalização, reduzindo o impacto de doenças em 23%. A filtração da água e o armazenamento, mostrou uma redução na incidência de doenças em 45%. Podemos concluir que uma água canalizada segura e livre de contaminação microbiana teria um impacto grande na incidência da diarreia (29).

Para além das opções de tratamento da água para uso doméstico aprovadas e testadas que são promovidas atualmente que incluem cloração, filtração, floculação e desinfecção combinadas, ebulição e desinfecção solar, a resolução deste problema também passa pela educação da comunidade no que diz respeito a toda a higiene, nutrição e imunização através de programas sociais (29,30).



**Figura 2** Percentagem de mortes entre crianças com menos de 5 anos causada por doenças diarreicas, 2015 (28)

### 1.5. Legislação nacional: parâmetros de controlo microbiológico e da desinfeção

Segundo o decreto-lei n.º 306/2007 de 27 de agosto (12) atualizado pelo decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro (31), uma água para consumo humano é toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais. Também é considerada água de consumo humano, toda a água utilizada numa empresa da indústria alimentar para o fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinadas ao consumo humano, assim como a água utilizada na limpeza de superfícies, objetos e materiais que podem estar em contacto com os alimentos, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada.

É possível obter uma água microbiologicamente própria para consumo humano através da instalação de sistemas de desinfeção com um controlo operacional adequado. O Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto e o Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro, institui a desinfeção como processo de tratamento da água obrigatório. As entidades gestoras devem assegurar a eficácia da desinfeção e garantir que, sem comprometer, a contaminação por subprodutos na água é mantida a um nível tão baixo quanto possível e sem pôr em causa a sua qualidade para consumo humano, nomeadamente o teor em cloro residual livre (32).

No que se refere aos parâmetros microbiológicos e aos parâmetros de controlo da desinfeção, estes diplomas apresentam várias especificações, relativas aos parâmetros a monitorizar, aos valores paramétricos (VP) permitidos e respetiva expressão de resultados, de acordo com o apresentado nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** Parâmetros microbiológicos de rotina 1 (31)

Parâmetro	VP	Unidade
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> )	0	Número/100 mL
Enterococos	0	Número/100 mL

**Tabela 2** Parâmetros microbiológicos de rotina 2 (12)

Parâmetro	VP	Unidade
Bactérias coliformes	0	N/100 mL
Número de colónias a 22 °C	Sem alteração anormal	N/mL a 22 °C Notas 1 e 2
Número de colónias a 36 °C	Sem alteração anormal	N/mL a 36 °C Notas 1 e 2

**Tabela 3** Parâmetros de controlo de desinfeção de rotina 2 (12)

Parâmetro	VP	Unidade
Cloritos	0,7	mg/LClO <sub>2</sub> – Nota 3
Cloratos	0,7	mg/L ClO <sub>3</sub> - Nota 3
Desinfetante residual		mg/L– Nota 4
Tetracloroetano e tricloroetano	10	µg/L
Trihalometanos	100 80 (ponto de entrega)	µg/L

**Notas:**

- 1) Não é desejável que o número de colónias a 22 °C e a 36 °C seja superior a 100 e 20, respetivamente.
- 2) Sem alteração anormal significa, com base num histórico de análises, resultados dentro dos critérios estabelecidos pelas entidades gestoras. Quando ocorre uma alteração anormal, é desejável que a entidade gestora averigue as respetivas causas.

- 3) O valor deve ser tão baixo quanto possível sem comprometer a eficácia da desinfecção e deve apenas ser controlado quando é utilizado o dióxido de cloro no processo de tratamento da água.
- 4) Recomenda-se que a concentração deste parâmetro na água da torneira do consumidor esteja entre 0,2 e 0,6 mg/l de cloro residual livre ou 0,1 e 0,4 mg/l de dióxido de cloro. No caso dos abastecimentos em alta, recomenda-se que a concentração do desinfetante residual nos pontos de entrega seja, no mínimo, igual ao valor máximo dos intervalos referidos para a torneira do consumidor. A determinação deste parâmetro não é obrigatória nas situações previstas no n.º 3 do artigo 9.º do presente decreto-lei (3 — As entidades gestoras podem ser dispensadas pela autoridade de saúde do cumprimento do disposto no número anterior se, através do histórico analítico, demonstrarem não terem tido incumprimentos aos parâmetros microbiológicos sem recurso à desinfecção.).

Compete às entidades gestoras garantir que a água destinada ao consumo humano seja salubre, limpa, desejavelmente equilibrada e designadamente que não contenha nenhum microrganismo, parasita ou substância em quantidade ou concentração que possa constituir um perigo potencial para a saúde humana (32).

De acordo com a legislação nacional, os métodos a utilizar na monitorização dos parâmetros microbiológicos são os seguintes (33):

- a) Bactérias coliformes e *E. coli*, segundo a norma da Organização internacional para a Padronização (ISO) 9308 -1(32) e ISO 9308-2 (33) o método a utilizar é baseado numa filtração por membrana com subsequente cultura com o meio de agar cromogéneo para deteção de coliformes e cálculo do número de organismos detetáveis na amostra.
- b) Enterococos segundo a norma ISO 7899-2 (34) o método a utilizar é a filtração por membrana;
- c) *Pseudomona aeruginosa* segundo a norma ISO 16266-2 (35) o método a utilizar é baseado no crescimento dos organismos a identificar no meio líquido para posterior cálculo no número mais provável (MPN) de organismos segundo as tabelas de referência do MPN. Também é possível utilizar o método de filtração por membrana segundo a norma ISO 16266.
- d) Enumeração de microrganismos viáveis — número de colónias a 22 °C (ISO 6222) (36);
- e) Enumeração de microrganismos viáveis — número de colónias a 36 °C (ISO 6222) (36);

Para efeitos da avaliação da equivalência de métodos alternativos com princípios distintos dos aplicáveis à cultura com os métodos previstos no presente decreto-lei, os laboratórios podem recorrer à norma ISO 17994 (37) ou, em alternativa, à série da norma ISO 16140 (38) ou a quaisquer outros protocolos idênticos internacionalmente aceites (21).

Na ausência de um método analítico que satisfaça as características mínimas de desempenho enunciadas, os laboratórios devem garantir que a monitorização se efetua utilizando as melhores técnicas disponíveis e sem envolver custos excessivos.

## **2. Métodos de desinfecção da água**

As atuais práticas de desinfecção na produção de água potável fornecem os meios para controlar a maioria dos microrganismos responsáveis pelas principais doenças transmitidas pela água (29). Existem diferentes substâncias químicas usadas na desinfecção da água, como o cloro, ozono, dióxido de cloro, cloraminas, entre outros, sendo o seu principal objetivo matar ou inativar os microrganismos patogénicos e conseqüentemente diminuir a exposição aos mesmos durante a distribuição garantindo a qualidade da água (39). A adaptação de qualquer método de desinfecção na produção de água potável pode ser avaliada com base na sua eficácia contra os agentes patogénicos presentes na água que depende da concentração e tempo de contacto do desinfetante ou espécies dos microrganismos (39). Na escolha do método de desinfecção a precisão com que os níveis de desinfetante podem ser monitorizados e controlados, a capacidade de fornecer a atividade biocida residual necessária no sistema de distribuição, as características organolépticas da água tratada e a formação de subprodutos tóxicos são fatores a ter em conta. Independentemente do método utilizado, a desinfecção é apenas um dos requisitos de um sistema de abastecimento de água potável e depende de outras etapas e condições de operação da estação de tratamento de água (ETA) (40).

### **2.1. Cloração**

A cloração é o método mais utilizado na desinfecção da água potável (41). A cloração consiste em 3 fases: pré-oxidação, desinfecção e recloração. Na fase de pré-tratamento da água (oxidação ou pré-desinfecção) ocorre a remoção de ferro solúvel, manganês, e ácido sulfídrico, controlo de sabor e odor, prevenção do crescimento de algas entre outros (41). De seguida é utilizado um desinfetante primário, após-filtração das águas subterrâneas ou na etapa final do tratamento de águas superficiais. Na rede de distribuição é utilizado um desinfetante secundário, para recloração, para manter uma concentração residual de cloro livre e deste modo prevenir a proliferação de microrganismos no sistema de distribuição (29,42).

A tecnologia para a técnica de cloração está bem desenvolvida (41) e por isso não requer vastos conhecimentos técnicos e adapta-se a sistemas de abastecimento de tamanho variável. Apresenta várias vantagens, tais como, elevada eficiência na inativação de microrganismos patogénicos, elevada disponibilidade mundial e em grandes quantidades e baixo custo (41). A sua persistência na água, através da produção de uma concentração



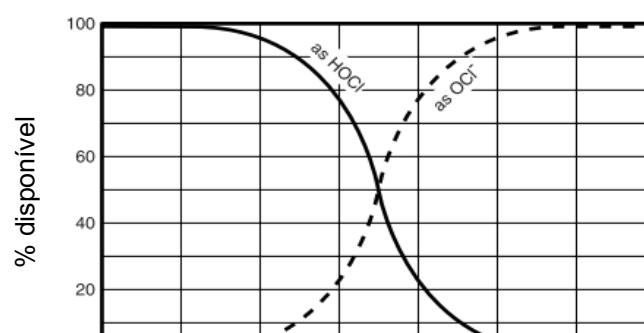
residual de cloro, permite que a água mantenha o poder desinfetante até ao fim da rede de distribuição (41) e é uma característica que valida a preferência deste método a outros disponíveis. O cloro está disponível como hipoclorito de cálcio e sódio, cujas soluções são mais vantajosas para sistemas mais pequenos do que o cloro gasoso, que é aplicado em grandes instalações e é menos seguro uma vez que é um gás tóxico corrosivo (40).

Uma das desvantagens deste processo é o facto de alguns agentes patogénicos como o *Cryptosporidium* e outros protozoários transmitidos pela água serem muito resistentes às concentrações de cloro usualmente utilizadas na etapa de desinfecção.

A cloração é menos eficaz a pH elevado devido à predominância do ião hipoclorito sobre o ácido hipocloroso e quando adicionado à água, o cloro livre reage com matéria orgânica natural e brometo para formar subprodutos de desinfecção, (principalmente trialometanos (THMs) e alguns ácidos haloacéticos (HAAs) que podem ser prejudiciais à saúde humana (40). Estes compostos orgânicos clorados potencialmente cancerígenos, como por exemplo o clorofórmio são alvo de monitorização na legislação nacional (41). O odor e o sabor causados pelos fenóis e outros compostos orgânicos presentes na água também podem ser intensificados após a desinfecção com cloro (40,41).

No que diz respeito ao processo químico, o cloro molecular quando é adicionado à água reage e são formadas duas espécies químicas, ácido hipocloroso (HOCl) e o hipoclorito (OCl<sup>-</sup>) (41). Classificadas como cloro livre, estas espécies existem em equilíbrio e as quantidades relativas de cada uma variam com o pH e a temperatura da água (40). A eficácia da cloração como desinfetante depende principalmente do pH e da conseqüente dominância da formação de ácido hipocloroso sobre o ião hipoclorito. A pH baixo, o ácido hipocloroso domina enquanto que a pH alto o ião hipoclorito é mais predominante. Uma vez que o ácido hipocloroso é mais reativo do que o ião hipoclorito e é também um desinfetante e oxidante mais forte, podemos concluir que a desinfecção é mais eficaz em pH neutro a ácido (43) [Fig. 3]. Em soluções diluídas e a níveis de pH acima de 4,0, existe muito pouco cloro molecular. As concentrações de ácido hipocloroso e do ião hipoclorito são aproximadamente iguais a pH = 7,5 e a 25 °C (39).

O cloro também reage com a amónia, ferro, manganês, sulfureto e algumas substâncias orgânicas e certos compostos azotados presentes na água para formar o cloro combinado. O cloro e a amónia reagem e formam cloraminas: monoclорamina, dicloramina e tricloreto de nitrogénio. A presença e as concentrações destas formas combinadas dependem principalmente do pH, temperatura, razão inicial de cloro/nitrogénio e tempo de reação(43).



**Figura 3** Relação entre HOCl e OCl<sup>-</sup> em vários valores de pH (39)

### 2.1.1 Relação entre cloração, desinfecção e crescimento bacteriano

Os sistemas de canalização representam um local ideal para o crescimento de bactérias uma vez que existe um elevado nível de carbono orgânico, relação superfície/volume alta e elevados períodos de estagnação. Neste sentido, a desinfecção torna-se essencial no controlo do crescimento de microrganismos na água uma vez que o mecanismo da ação biocida muito eficaz do cloro contra bactérias indicadoras envolve a alteração da permeabilidade da membrana celular e a paragem de reações enzimáticas dentro da célula, decorrentes do processo oxidativo (44).

. As bactérias coliformes totais, coliformes termo tolerantes e *E.coli* devem estar ausentes sendo que são muito menos resistentes à desinfecção do que outros microrganismos heterotróficos e aeróbicos e a sua presença seria uma indicação imediata de uma qualidade inaceitável da água (41).

Segundo um estudo realizado na Alemanha (43), o tratamento contínuo com cloro de forma a originar um residual de 0,3 mg/L de cloro livre, duas vezes por semana, a concentração de cloro livre era controlada pelo método colorimétrico da N,N-dietil-*p*-fenilenodiamina (DPD), apresentando valores entre 0,22 mg/L e 0,30 mg/L, leva a uma redução da unidade de formação de colónias (UFC)/cm<sup>2</sup> para valores próximos do limite de deteção após 70 dias de tratamento. Neste mesmo estudo, a análise semanal mostrou que há uma redução sucessiva das colónias formadas. Mesmo após a eliminação da UFC, a contagem total de células ainda se encontrava num nível superior a 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> (42).

Quanto mais fortes forem as propriedades de oxidação do desinfetante químico e quanto maior a dose, menor será o tempo de contacto necessário para a desinfecção e eliminação das bactérias. Contudo, é desejável uma dosagem química mais pequena para evitar ou reduzir a formação de subprodutos, exigindo um aumento correspondente no tempo de contacto para se conseguir a inativação microbiana (45).

A existência de populações com maior resistência ao desinfetante é mais provável se o ambiente se encontrar com pH elevados, alta salinidade, privação de nutrientes, oxidação ou

exposição ao cloro (46). Para além destes fatores, bactérias com resistência a antibióticos mostram ser mais tolerantes à cloração (43).

Deste modo é importante manter presente uma concentração residual de desinfetante que permita que as bactérias não cresçam durante os períodos de estagnação, permitindo manter a eficácia na inibição do crescimento bacteriano (47) e o controlo das características organoléticas da água decorrentes de uma atividade microbiana excessiva, a qual pode interferir com os resultados de outros parâmetros utilizados para monitorizar a qualidade da água (43).

### **2.1.2. Cloro residual**

O cloro residual é o nível de cloro remanescente na água a seguir a um determinado período ou tempo de contacto após a sua aplicação inicial. Constitui uma prevenção importante contra o risco de contaminação microbiana subsequente ao tratamento. Existem três formas de cloro residual: livre, combinado e total. O cloro residual livre é composto por iões hipoclorito dissolvidos, ácido hipocloroso e cloro gasoso. O cloro residual combinado é composto por cloraminas. O cloro total é a soma do cloro residual livre e do cloro residual combinado (41,43).

O desinfetante residual é normalmente consumido por produtos de corrosão na superfície interna da canalização (depósitos de ferro e manganês), por microrganismos e espécies químicas que estão presentes na água. Portanto, a manutenção de uma concentração residual de desinfetante deve ser auxiliada pelo controlo e manutenção da corrosão, garantir baixos níveis de matéria orgânica dissolvida, e instalação de um sistema que garanta curtos tempos de transporte da água entre a estação de tratamento e o consumidor (43).

Nos extremos das redes de distribuição, a concentração residual de desinfetante pode chegar a ser zero. De modo a evitar esta situação, um dos métodos para manter um desinfetante residual é garantir uma alta concentração residual à medida que a água sai do tratamento. No entanto, este processo tem a desvantagem de que os consumidores imediatamente a jusante das estações de tratamento recebem água com concentrações de desinfetante indesejáveis, as quais são impróprias sob o ponto de vista organolético e de saúde do consumidor. Uma solução pode ser a instalação de estações de desinfecção ao longo da rede que monitorizam a concentração do cloro residual e são responsáveis por mantê-las nos níveis em que se verifica eficácia através de libertação automática de cloro na rede (48).

#### **2.1.2.1. Monitorização dos níveis de cloro residual**

O cloro pode conferir um sabor e odor desagradável à água ou estar numa concentração insuficiente para eliminar os microrganismos patogénicos ou acima do valor recomendado, sendo prejudicial à saúde do consumidor. A monitorização da concentração de um desinfetante na distribuição é importante por diversas razões. O cloro também pode ser precursor de vários produtos indesejáveis como por exemplo os THMs (46). Os estudos existentes indicam que quanto maior for a quantidade de cloro e a concentração de matéria orgânica presente maior será a tendência para a formação de THMs (49). A aplicação de tratamento adequado antes da distribuição minimiza os compostos precursores orgânicos e, portanto, é importante no controlo de THMs. Se os precursores orgânicos dos THMs permanecerem, a cloração adicional poderá criar mais THMs. Para além do controlo da concentração de matéria orgânica, também é necessário fazer a monitorização da concentração do cloro residual ao longo da rede de distribuição por todas as razões já expressas (48).

Para cumprir o objetivo principal da desinfecção e minimizar quaisquer efeitos adversos, é essencial que os procedimentos dos testes sejam realizados com um conhecimento prévio das limitações da determinação analítica e ter conhecimento da concentração mínima e máxima aceitável de cloro residual sendo que na europa, as concentrações-alvo comuns para resíduos de cloro residual livre na água da torneira são entre 0,1 e 0,5 mg/L (49).

O método de titulação amperimétrica baseia-se na leitura de um ponto de equivalência que é determinado através da medição da corrente elétrica produzida pela reação do cloro com uma solução padrão redutora, como o tiosulfato de sódio ou o óxido de fenilarsina (PAO) a pH 7 (48,49). É geralmente o método padrão para a determinação de cloro residual combinado e livre e apresenta como vantagens o facto de ser pouco afetado por agentes oxidantes e não estar sujeito a interferências de cor, turbidez e variação de temperatura. Apesar disso não é tão simples quanto os métodos colorimétricos e é mais suscetível a erros sistemáticos. Este método pode ser utilizado para determinar concentrações de cloro residual livre abaixo de 0.2 mg/L (50).

O método DPD (colorimétrico) é mais simples para determinar cloro residual livre do que a titulação amperimétrica. A amina da DPD é oxidada pelo cloro formando dois produtos de oxidação. A pH neutro, o produto de oxidação primário é um composto catiónico semi-quinóide conhecido como corante *Würster*. Este radical livre relativamente estável é responsável pela cor magenta no teste colorimétrico DPD. O DPD pode ser oxidado ainda numa imina incolor relativamente instável. De seguida a solução é lida num espectrofotómetro a um comprimento de onda que varia entre 490 nm a 555 nm de modo a construir uma curva de calibração (49,50). Quanto mais intensa a cor da solução, maior a concentração de cloro livre. Concentrações elevadas de monoclорamina podem interferir com o cloro livre a menos que a reação seja interrompida com arsenito ou tioacetamida. O método DPD também está sujeito

a interferências por formas oxidadas de manganês mas podem ser compensadas com um branco. A cor e a turbidez da amostra podem interferir em todos os procedimentos colorimétricos, e os contaminantes orgânicos podem produzir uma leitura falsa de cloro livre (51).

O teste da siringaldazina para a determinação do cloro livre (FACTS) não é afetado pela presença de monocloramina, dicloramina, nitrato, nitrito e formas oxidadas de manganês. O produto da reação é um composto vermelho-púrpura com uma absorção máximo a 530 nm. O intervalo de aplicação é de 0,1 -10 mg/L Cl<sub>2</sub>. As principais desvantagens do método FACTS são a insolubilidade do indicador e do seu produto de reação, tempo de armazenamento da solução indicadora e sensibilidade variável ao cloro sendo o método menos utilizado (52).

Os métodos amperimétricos e DPD não são afetados pelas concentrações de dicloramina na faixa de 0 a 9 mg Cl<sub>2</sub>/L na determinação de cloro livre. O tricloreto de nitrogênio, se presente, pode reagir parcialmente com o cloro livre nos métodos amperimétricos, DPD e FACTS. A extensão dessa interferência no método DPD não parece ser significativa (49).

A determinação do cloro livre nas águas residuais pode ser feita por qualquer um dos métodos, desde que as substâncias interferentes conhecidas estejam ausentes ou sejam utilizadas técnicas de correção apropriadas. A determinação do cloro total em amostras que contêm matéria orgânica apresenta problemas especiais. Devido à presença de amônia, aminas e compostos orgânicos, particularmente nitrogênio orgânico, o cloro residual fica totalmente combinado. Para determinação do cloro total em amostras que contêm quantidades significativas de matéria orgânica, os métodos DPD, amperimétrico ou o método de titulação por retorno iodométrica são aconselhados para evitar o contato entre a concentração total de iodo e a amostra (49,51,53). Como os equipamentos disponíveis no mercado para monitorização *in situ* (equipamentos de campo) utilizam majoritariamente o método da DPD, esse é regra geral, o método mais utilizado.

### **3. Métodos analíticos para o controle microbiológico da água**

#### **3.1. Métodos de detecção rápida**

Os testes rápidos enquadram-se em duas categorias, os que envolvem procedimentos convencionais modificados e os que requerem equipamento e material específico (49). Embora os métodos microbiológicos tradicionais, como a contagem de placas e a cultura de células, sejam os métodos padronizados e de referência para confirmar a presença de agentes patogênicos, muitas vezes são necessárias no mínimo 24 h a 48 h para obter os resultados (54). A aplicação de métodos rápidos é extensível às águas residuais e à água

potável. Neste último caso, durante emergências que envolvem falhas em estações de tratamento de água ou outras perturbações no sistema de abastecimento, existe uma necessidade urgente de avaliação rápida da qualidade sanitária da água (51). Relativamente à análise microbiológica é necessário um teste que determine as populações bacterianas totais num período de tempo muito curto, para que possam ser tomadas medidas corretivas em tempo útil (55) de modo a proteger a integridade do abastecimento de água, salvaguardar os consumidores de contaminantes microbianos potencialmente patogénicos e assegurar o cumprimento das regulamentações ambientais (49).

Há duas etapas geralmente envolvidas na aplicação de uma tecnologia de deteção rápida. A primeira é a captura, na qual a espécie microbiana no caso de estar presente é removida, marcada ou amplificada de modo a diferenciá-la do restante material na amostra. Esta etapa é responsável pela seletividade da abordagem. O segundo passo é a deteção na qual o material recolhido é medido quantitativamente. O detetor atua tipicamente como um transdutor, traduzindo a alteração biológica, física ou química num sinal mensurável. Os padrões de água usados como indicadores bacterianos apresentam aproximadamente 100 UFC/100 mL, ou 1 célula/mL (55).

Apesar da rapidez de obtenção de resultados com este tipo de métodos, a sua sensibilidade pode ser comprometida uma vez que a concentração de microrganismo na água pode estar abaixo da do limite de deteção (55). Por isto os maiores impedimentos técnicos à implementação destes métodos são a sensibilidade de deteção e o volume ensaiado. A maioria das tecnologias de deteção baseia-se na medição de volumes de amostras inferiores a 1 mL. O padrão recomendado pela EPA (Environmental Protection Agency) é de 35 enterococos por 100 mL, o que equivale a menos de uma célula por mL. Assim, os detetores que medem apenas um volume de 1 mL, mesmo que sejam capazes de detetar uma célula por mL, têm necessariamente uma sensibilidade inaceitável e pouca precisão em concentrações próximas do padrão (55).

Há duas abordagens possíveis para ultrapassar a sensibilidade inadequada. A primeira é a melhoria da tecnologia de deteção para permitir a medição de amostras de maior volume. A segunda opção é a pré-concentração, que pode aumentar a sensibilidade várias vezes ao aumentar o número de organismos alvo por unidade de volume a um custo baixo. Existem várias técnicas de pré-concentração que incluem filtração, fracionamento, centrifugação entre outros. A maior desvantagem para além da possibilidade de perda parcial de organismos alvo ou da concentração involuntária de contaminantes ambientais, é o tempo adicional que requer (49,56).

A realização da captura pode envolver 3 classes de métodos diferentes.

A primeira baseia-se em métodos em que há o reconhecimento de superfície e de células inteiras. Exemplos destas técnicas são os testes de imunoenensaio e a utilização de sondas de ligação específica a moléculas.

A segunda classe são métodos de deteção de ácidos nucleicos, como PCR ou a amplificação baseada em sequência de ácido nucleico (NASBA) e os microarrays.

Por fim existe a classe dos métodos enzimáticos/substratos que utilizam substratos cromogénicos ou fluorogénicos através da técnica desenvolvida pelo laboratório IDEXX com os kits *Enterolert* e *Colilert*. Para a deteção podem ser utilizadas tecnologias óticas, eletroquímicas ou piezoeléctricas para quantificar o material recolhido, como por exemplo, a fluorometria, interferometria ou condutimetria (49).

### **3.2. HPC: contagem de microrganismos heterotróficos em placas**

Os organismos heterotróficos, onde se incluem as bactérias, leveduras e fungos, são definidos como microrganismos que requerem carbono orgânico para se desenvolverem. A contagem desses organismos presentes na água efetua-se através da sua cultura em placas (HPC) (57). Este é um procedimento que tem o objetivo de quantificar o número de bactérias heterotróficas vivas e cultiváveis na água e medir as suas alterações durante o tratamento e distribuição da mesma, fornecendo informação sobre a qualidade microbiológica e consequentemente da eficácia dos processos de tratamento da água (58).

Existem diferentes métodos HPC que variam consoante a composição dos meios, o tempo e temperatura de incubação (56), que levam a uma vasta gama de resultados quantitativos e qualitativos (23).

As temperaturas utilizadas variam entre os 20 °C e os 40 °C, os tempos de incubação entre horas, a sete dias ou algumas semanas, e as condições nutricionais variam de baixo a alto teor. As colónias podem surgir em pares, cadeias, aglomerados, ou células únicas - todas elas incluídas no termo UFC (56). O crescimento reflete-se normalmente em valores de HPC mais elevados. Os principais determinantes do crescimento são a temperatura, disponibilidade de nutrientes e a ausência de desinfetante residual (59).

Dentro das diretrizes da OMS sobre água potável (23), os resultados de HPC a 22 °C são descritos como tendo pouco valor sanitário, mas são um bom indicador da eficiência do tratamento da água, especificamente dos processos de coagulação, filtração e desinfecção, onde o objetivo é manter as contagens tão baixas quanto possível. Um aumento das bactérias HPC a 37 °C em comparação com as normalmente encontradas pode ser um sinal precoce de contaminação, especialmente se for acompanhado por um aumento semelhante dos números de HPC a 22 °C. Aumentos súbitos ou progressivos dos resultados de HPC na água

canalizada podem indicar o enriquecimento da água com carbono orgânico através da entrada de água não tratada na distribuição (59).

Relativamente aos diferentes métodos que podem ser utilizados para realizar o HPC, existe o método de placas (PP) que é simples, fácil de usar, de baixo custo o que o torna vantajoso. As desvantagens centram-se no facto de quando expostas e fundidas com o meio de agar aquecido a temperaturas entre os 43°C e os 46°C, as bactérias ficam suscetíveis a níveis de stress fisiológico que diminuem significativamente o seu crescimento. As bactérias ao serem incorporadas e as colónias se desenvolverem no meio de ágar compromete as suas características morfológicas que permitem identificá-las. O volume máximo de amostra que pode ser analisado é de 1,0 mL, limitando assim a utilidade do procedimento quando é necessário analisar um volume de amostra maior (49,56).

O método de filtração por membrana (MF) é o método mais flexível para a determinação do HPC, mas requer mais equipamento o que o torna um método mais caro. O método MF permite a análise de volumes de amostra inferiores a 1,0 mL até 10,0 L e é um método de escolha para águas com baixos números de organismos heterotróficos (<1 a 10 UFC/mL) (49).

O método de espalhamento de placas (SP), consiste em espalhar a amostra com uma vareta de vidro estéril numa placa com ágar previamente preparada. O ágar neste método só consegue absorver um pequeno volume de amostra ou amostra diluída, entre 0,1 mL a 0,5 mL. As condições de crescimento do método SP são fisiologicamente mais favoráveis ao crescimento das bactérias pois não há stress térmico e as colónias estão sobre a superfície expostas a condições aeróbias. O método SP produz quase sempre contagens bacterianas mais elevadas do que o método PP (57).

O método do substrato enzimático, SimPlate®, pode ser utilizado para analisar amostras de água com uma vasta gama de concentrações bacterianas. Em comparação com o método de placas, este utiliza um meio em que os substratos são hidrolisados por múltiplas enzimas, que causam a libertação de 4-metilumbeliferona que apresenta fluorescência quando exposta à luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda entre os 365 nm e os 366 nm, e o número de poços fluorescentes azuis corresponde a um MPN de bactérias na amostra. As colónias individuais não podem ser diretamente recuperadas para análise posterior (49).

No que diz respeito à seleção de um meio de cultura para o método e temperatura, os meios ricos em nutrientes (exemplo: PCA) e a utilização de uma temperatura de incubação elevada (35°C) favorecem o crescimento de bactérias que atingem a água como contaminantes de resíduos fecais animais e humanos, águas residuais municipais entre outros. A utilização de meios com baixo teor de nutrientes (exemplo: R2A), temperatura de incubação mais baixa (20°C ou 28°C) e tempo de incubação prolongado favorecem o desenvolvimento de bactérias com crescimento mais lento (61).



### **3.3. Técnica de fermentação em tubos múltiplos**

A técnica de fermentação em tubos múltiplos baseia-se na capacidade das bactérias coliformes em fermentar lactose. Na fase inicial, teste primário, aplica-se um meio à base de lactose, em que são detetados os produtos finais metabólicos da fermentação a 35°C, um gás e um ácido, no caso de haver contaminação da água por microrganismos (62). No entanto, o gás também pode ser produzido por outros organismos, pelo que é essencial um teste de confirmação posterior. Este é realizado em todos os tubos de fermentação que testaram positivo para contaminação bacteriana no teste primário. O meio dos tubos que mostraram um resultado positivo no teste é inoculado com meio biliar de lactose verde brilhante (BGLB). A formação de gás em qualquer altura no tubo indica um teste positivo confirmado para coliformes totais. Há uma terceira fase de testes onde se realiza o teste complementar em todas as amostras que apresentem um resultado positivo no teste de confirmação. A formação de gás no tubo de fermentação e a presença de bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos, em forma de bastão na cultura de ágar pode ser considerada um teste satisfatoriamente concluído, demonstrando a presença positiva de bactérias coliformes na amostra analisada (61,63).

Relativamente à quantificação das bactérias coliformes, esta é feita através do MPN de bactérias presentes que é estimado a partir do número de tubos inoculados e do número de tubos positivos, utilizando tabelas estatísticas especialmente concebidas para o efeito. A precisão do teste de fermentação na estimativa da densidade de coliformes depende do número de tubos utilizados. Será obtida uma maior precisão quando o maior inóculo de amostra examinado mostrar ácido e/ou gás em alguns ou todos os tubos e o menor inóculo de amostra não mostrar ácido ou gás em nenhum ou na maioria dos tubos (64).

Este tipo de teste pode ter algumas interferências como a irregularidade da distribuição de bactérias na água, a presença de cloro residual ou um derivado halogenado que podem impedir o crescimento bacteriano. É importante considerar que as tabelas de MPN são cálculos probabilísticos e têm pouca precisão. Incluem 23% de viés positivo que geralmente resulta num resultado elevado. A precisão do MPN pode ser melhorada aumentando o número de amostras analisadas a partir do mesmo ponto de amostragem (65).

### **3.4. PCR: reação de polimerização em cadeia**

Os métodos atualmente utilizados para controlar a segurança microbiológica da água baseiam-se em métodos de cultura como podemos confirmar nas normas e leis (12,31) relacionadas com o controlo da qualidade da água. No entanto, estes métodos devido a

fatores como a complexidade, baixa sensibilidade e especificidade e falta de rapidez na obtenção de resultados, tornam-se menos eficazes na detecção e prevenção da contaminação de água e prevenção do aparecimento de surtos de doenças infecciosas. Perante situações em que os microrganismos se encontram em stress ambiental ou afetados por processos de tratamento de água, os métodos baseados em cultura falham na sua detecção uma vez que apesar de viáveis (66) não são cultiváveis (67,68) podendo resultar em quantificações falso-negativas.

A introdução de ensaios moleculares melhorou e simplificou significativamente a detecção e identificação de microrganismos no ambiente (69) particularmente os métodos baseados na reacção em cadeia da polimerase. Desde 1985 que o PCR é o método mais utilizado para a amplificação dos ácidos nucleicos e tem desempenhado um papel importante na caracterização dos microrganismos presentes e identificados na água (67). Tem sido estudado como uma tecnologia alternativa para ultrapassar as atuais limitações, uma vez que oferece a possibilidade de reduzir o tempo de ensaio, melhorar a sensibilidade e especificidade da detecção, e identificar múltiplos alvos e patogénicos, incluindo estirpes novas ou emergentes (67) e microrganismos não cultiváveis. Provou-se que o método qPCR pode ser uma ferramenta eficaz para detetar e quantificar microrganismos em poucas horas (67), com elevada sensibilidade e capaz de detetar um baixo número de microrganismos. Existe, contudo, a necessidade de padronizar os protocolos qPCR se esta técnica for utilizada como uma ferramenta de diagnóstico para monitorização de qualidade da água (70).

### **3.4.1 Fundamento e aplicações do método**

A PCR é uma técnica que consiste na polimerização do ácido desoxirribonucleico (DNA) em cadeia, anteriormente extraído, realizada *in vitro* e que consiste num método de amplificação por replicação semiconservativa enzimática originando múltiplas cópias de DNA, sem necessitar de um organismo vivo (69). Este método é baseado num ciclo térmico, processo que compreende uma série de ciclos a diferentes temperaturas envolvendo a desnaturação do DNA molde, ligação dos *primers* e extensão da cadeia pela DNA polimerase (69). Para além da sequência de DNA a ser amplificada e nucleótidos (71), uma reacção típica de PCR requer mais 2 elementos essenciais: Um conjunto de dois oligonucleótidos iniciadores (*primers*) que hibridam com cadeias opostas e flanqueiam a sequência de DNA a amplificar. Estes são responsáveis pela seletividade da técnica de PCR em conjunto com condições de temperatura específicas usadas no ciclo térmico. A escolha da sequência de iniciadores constitui um aspeto importante no sucesso desta técnica, uma vez que amplificações sucessivas podem originar erros. O outro elemento essencial é a enzima de síntese de DNA, por exemplo, *Taq DNA* polimerase (67). O primeiro requisito para uma DNA polimerase usada

na técnica de PCR compreende a sua atividade ótima a cerca de 75 °C e a capacidade de reter essa atividade após incubação prolongada mesmo a temperaturas elevadas (95 °C). A estabilidade da DNA polimerase na reação determina o sucesso da amplificação do DNA alvo. Estes elementos são adicionados a uma mistura reacional de modo a ocorrer a amplificação. Relativamente à classificação e quantificação dos resultados obtidos, existem diferentes métodos para separar e identificar os produtos PCR tais como a utilização de géis de agarose/ poliacrilamida ou detecção de fluorescência que é medida simultaneamente à amplificação por sistemas de análise de imagem (67).

Este método, assim como os métodos moleculares no geral, têm tido uma grande aplicação em várias áreas de investigação e diagnóstico, na medida em que pretende diminuir o tempo de análise e os custos de operação, aumentar a sensibilidade, ultrapassando as dificuldades dos métodos de detecção tradicionais e permitir a detecção de um número reduzido de microrganismos. Atualmente a técnica de PCR encontra as suas principais aplicações em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida, como na medicina forense, detecção de mutações ou preparação de fragmentos de DNA para clonagem, bem como para identificar patogénicos presentes em amostras. O PCR quantitativo pode ser aplicado para rastreio de fontes microbianas em fontes de água, para determinar a eficiência das estações de tratamento de água e águas residuais e atuar como instrumento de avaliação de risco (72).

### **3.4.2. Procedimento da técnica de PCR**

Após a recolha das amostras de água, os procedimentos de preparação de amostras de água para análise utilizando a técnica de PCR compreendem geralmente três etapas: concentração do organismo alvo (por exemplo, por filtração, centrifugação) (69,73), extração dos ácidos nucleicos (por exemplo, por choque térmico; lise química, mecânica e/ou enzimática) e purificação para eliminar possíveis inibidores (por exemplo, por precipitação química, extração de solventes, separação magnética) (67,69,74,75). Por conseguinte, um protocolo ideal de preparação de amostras de água deve extrair eficazmente os ácidos nucleicos do microrganismo, protegê-los da degradação, eliminar ou neutralizar os inibidores da reação de amplificação para fornecer a sensibilidade analítica necessária (67,76–78).

Após a extração do DNA molde, este é colocado na mistura reacional juntamente com uma solução tampão que cria um ambiente químico apropriado para uma boa atividade e estabilidade da DNA polimerase. Em alguns casos é necessário adicionar a albumina de soro bovino (BSA) que tem como função diminuir o efeito de potenciais inibidores do PCR. O volume final é ajustado com água ultrapura. Posteriormente, a mistura é colocada num

termociclador que faz ciclos de temperatura pré-definidos com tempos exatos e que é responsável pela amplificação do DNA.

A amplificação em cadeia engloba três passos fundamentais. A desnaturação do DNA molde por ação do calor, tipicamente acima dos 90 °C, ocorrendo a separação das cadeias por ruptura das ligações de hidrogénio entre as bases complementares. Durante este passo a enzima DNA polimerase é ativada para posterior replicação. O segundo passo é conhecido por hibridação e consiste na associação dos *primers*. Inicia-se com o emparelhamento dos oligonucleótidos iniciadores que ocorre por ligações de hidrogénio ao DNA alvo em cadeia simples. Esta reação ocorre a uma temperatura mais baixa entre os 50°C e 70 °C dependendo do comprimento do *primer*, uma vez que quando mais curto o *primer*, menor a temperatura. Dada a baixa complexidade deste tipo de iniciadores, há uma maior probabilidade de eventuais ligações indesejáveis, em locais não específicos do DNA molde, enquanto que iniciadores extensos, >40 pares de bases, requerem temperaturas de hibridação acima de 80 °C, temperaturas que podem afetar a atividade e estabilidade da DNA polimerase (77–79).

No caso da técnica de PCR em tempo real (qPCR) a quantificação e amplificação é realizada simultaneamente. O procedimento é semelhante ao da técnica geral de PCR, diferindo na característica que lhe confere o nome de PCR em Tempo Real, isto é, o DNA é quantificado após cada ciclo de amplificação (67).

### **3.4.3. Detecção e quantificação dos produtos de PCR em tempo real**

Na qPCR durante a amplificação, é possível ser realizada a deteção e quantificação simultânea de um alvo específico de DNA. Isto é conseguido através da monitorização de produtos PCR que emitem fluorescência utilizando sondas ou corantes fluorescentes que se vão hibridizar dentro da sequência alvo para gerar um sinal e, em conjunto com sistemas especializados, identificar e quantificar o produto PCR (80–82). Existem dois métodos preferencialmente utilizados, o método de sonda TaqMan e o SYBR Green. Os dados são recolhidos utilizando fotodetetores que apenas permitem a passagem dos comprimentos de onda desejados. Uma vez que os dados estão a ser recolhidos durante o ciclo térmico, o software de análise constrói um gráfico de amplificação. Este é essencialmente um gráfico de registo do  $\Delta Rn$  (sinal de fluorescência) em função do número do ciclo. Em ciclos de amplificação iniciais, a fluorescência emitida pelos corantes fluorescentes ainda está abaixo do limite de deteção do instrumento, mas quando  $\Delta Rn$  de uma determinada amostra cruza o valor do limite de deteção é registado o valor  $Ct$ , número do ciclo em que se deteta fluorescência. Este valor é inversamente proporcional à concentração inicial do DNA. O

produto amplificado é duplicado após cada valor *Ct* até a reação atingir um patamar. Os valores de *Ct* são utilizados para a quantificação absoluta e relativa do DNA (83).

### 3.4.3.1. Método da sonda TaqMan

As sondas TaqMan são concebidas para se ligarem à sequências alvo do produto de amplificação. Estas contêm um corante fluorescente (*reporter*) ligado à extremidade de 5' e uma substância que suprime a fluorescência do repórter (*quencher*) que está ligado à extremidade de 3' da sonda. A proximidade dos dois corantes inibe o *reporter* de emitir a fluorescência. A Taq DNA polimerase utilizada no método TaqMan tem uma atividade da exonuclease de 5' para 3' que permite a clivagem do nucleótido terminal de 5'. Uma vez que a Taq DNA polimerase amplifica o DNA a partir do *primer* na extremidade 5', esta encontra a sonda que está hibridizada e cliva o *reporter* durante a fase de extensão que emite fluorescência que é depois detetada e registada (78,84,85). O aumento da fluorescência é proporcional à quantidade do produto alvo do PCR uma vez que a atividade da exonuclease da polimerase Taq só atua se a sonda estiver hibridizada à sequência alvo (78).

Com o método TaqMan, diminui a hipótese de produtos não específicos e de contaminação em PCR serem interpretados como o produto amplificado alvo na reação, aumentando assim a especificidade da reação. Uma desvantagem do qPCR baseado em TaqMan é que, uma vez que a atividade de exonuclease de 5' a 3' é crucial para o bom funcionamento deste ensaio, no caso de as amostras testadas conterem inibidores de DNA polimerase, poucas ou nenhuma alternativas podem ser utilizadas para compensar a perda de sinal (78).

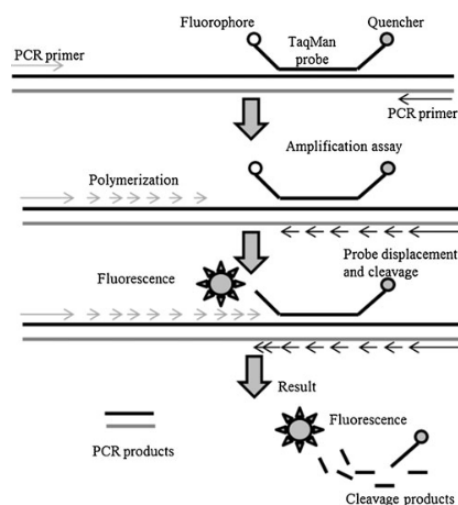
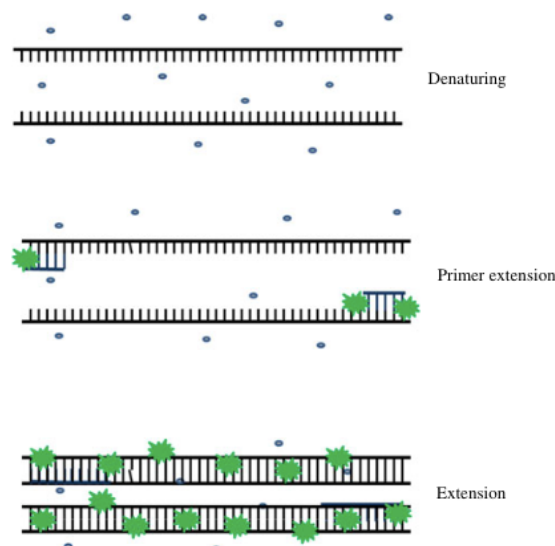


Figura 4 Mecanismo da sonda TaqMan (67)

### 3.4.3.2. Método do corante SYBR Green

O método SYBR Green baseia-se na capacidade do corante SYBR Green I em se intercalar com o DNA, emitindo um sinal fluorescente que pode ser detetado pelo fotodetector. No início de um novo ciclo térmico quando ocorre a desnaturação do DNA, o corante SYBR Green I é libertado e a emissão de fluorescência diminui (78,84,86). Portanto, o sinal fluorescente da amostra é recolhido no final da etapa de alongamento de cada ciclo de PCR para quantificar o aumento nos produtos amplificados (87). Devido à química do SYBR Green I, não se consegue distinguir entre os produtos alvo e os produtos não específicos, uma vez que SYBR Green I é um corante de ligação ao DNA não específico e irá ligar-se a todos os fragmentos de DNA presentes na reação (88,89), o que pode resultar em falsos positivos. A incorporação de uma análise da curva de fusão após a fase de PCR permite ao utilizador distinguir os produtos amplificados através da construção de um gráfico que relaciona a fluorescência em função da temperatura uma vez que diferentes produtos de DNA têm diferentes temperaturas de fusão devido às razões diferentes GC/AT.

Uma vez que a fluorescência do corante SYBR Green I depende da ligação do corante ao DNA, aplicam-se menos restrições às polimerases de DNA que podem ser utilizadas. Embora a atividade de exonuclease de 5' a 3' não seja necessária neste caso, a Taq DNA polimerase pode ainda assim ser utilizada. É importante otimizar cuidadosamente as condições de PCR e a conceção dos iniciadores e evitar a contaminação por DNA genómico (88).



**Figura 5** Mecanismo da sonda SYBR Green (67)

#### 3.4.4. Variantes da técnica de PCR

Na técnica de multiplex-qPCR, diferentes sequências de DNA alvo podem ser amplificadas simultaneamente utilizando múltiplos pares de *primers* distintos, com diferentes corantes na mistura reacional. O multiplex-PCR em tempo real é utilizado para rastrear um elevado número de amostras ambientais e para detetar e selecionar diferentes estirpes bacterianas num único ensaio (88). A vantagem sobre o monoplex qPCR é a amplificação de vários alvos de DNA numa única reação que subsequente reduz o custo dos ensaios, o tempo e os recursos (67).

As desvantagens incluem a seleção de *primers* que devem funcionar nas mesmas condições de reação, a ocorrência de formação de dímeros de *primers* levando a uma fraca sensibilidade e a amplificação preferencial de certos alvos. O ensaio só pode ser bem-sucedido se as concentrações de iniciadores, tampão PCR, temperaturas do ciclo e a quantidade do modelo de DNA e TaqDNA polimerase estiverem corretas. Os seguintes microrganismos foram detetados em amostras de água usando multiplex PCR em tempo real: *E. coli* O157:H7 (90,91), *Aeromonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* num único ensaio. Este estudo constatou que em combinação com um ensaio de multiplex-PCR SYBR Green em tempo real, foi 10 vezes mais sensível e menos demorado do que o protocolo de PCR ponto final (92,93).

Relativamente à técnica de *nested* PCR, esta é utilizada para aumentar a especificidade da amplificação do DNA através da utilização de 2 conjuntos de *primers* e são realizados 2 processos de amplificação. Dado que a especificidade e seletividade da técnica de PCR está intrinsecamente relacionada com a especificidade dos *primers* ao local de ligação, o produto amplificado é sujeito a novo processo de amplificação, com um conjunto de iniciadores distinto que clivam o fragmento produzido na primeira sequência de amplificações internamente aos *primers* originais, permitindo na segunda reação, a obtenção de um produto de menor dimensão. Em geral, obtém-se uma banda de maior intensidade e menor ruído, traduzindo-se numa diminuição da ocorrência de falsos negativos e falsos positivos, permitindo a amplificação do produto pretendido. O raciocínio subjacente baseia-se no facto de que caso tenha ocorrido um erro no local de amplificação, a probabilidade de ocorrer um novo erro na segunda amplificação, com o segundo par de iniciadores, é muito menor, dada a baixa probabilidade de que o produto indesejado do PCR contenha locais de ligação para ambos os *primers*, assegurando que o sinal do segundo produto amplificado é muito menos suscetível a interferências com produtos não pretendidos (91).

### 3.4.5. Validação do método

Para proceder à validação do método de qPCR, os parâmetros de desempenho do método devem ser fornecidos de modo a comprovar que este produz resultados adequados para o fim pretendido com um nível aceitável de incerteza e comparáveis com os obtidos pelo método de referência. Entre os parâmetros de desempenho constam a especificidade, precisão; limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), veracidade, linearidade, robustez. A norma da ISO, 20395:2019 apresenta as orientações sobre a validação do método de qPCR (92).

#### 3.4.5.1 Especificidade

A especificidade de um ensaio e a potencial reação cruzada com potenciais sequências homólogas presentes na amostra deve ser avaliada. A análise de controlos positivos (material biológico bem caracterizado ou solução de ácido nucleico) deve ser realizado, utilizando padrões estreitamente relacionados com o alvo (92).

Para a otimização inicial de um ensaio qPCR deve-se testar uma gama de temperaturas de hibridação, números de ciclos de PCR a efetuar e várias concentrações de *primer*, de modo a determinar as condições ótimas de detecção do sinal fluorescente. A modificação da temperatura de hibridação na técnica de PCR pode ser necessária para melhorar a especificidade do ensaio.

A resolução de um ensaio digital é uma medida quantitativa de como as duas populações comparadas (positiva - o DNA alvo e controlo negativo) podem ser diferenciadas. É definida como a diferença de fluorescência entre os dois picos, dividida pela largura combinada de ambos os picos. Foi proposta uma resolução de 2,5 para permitir diferenciar os dois picos em amostras mais difíceis (92).

A análise da curva de fusão também pode ser executada como prova da especificidade do *primer*. É uma análise pós-PCR realizada para avaliar a especificidade dos produtos amplificados com base nas suas características de fusão. Efetuam-se ensaios na presença de corantes de ligação ao DNA sujeitos a temperaturas de incubação crescentes. Para a detecção de uma única sequência alvo de ácido nucleico, deve ser observado um único pico no gráfico como prova de que um único produto de amplificação foi produzido na reação. A temperatura de fusão ( $T_m$ ) depende do comprimento da sequência de DNA, conteúdo de G:C, tampão, e disposição sequencial dos nucleótidos (92).

A taxa de falsos positivos do ensaio, expressa em percentagem (%) da concentração do DNA alvo ou quantidade por reação, deve ser calculada para cada ensaio. A taxa de falsos positivos é necessária para estabelecer limite de detecção (LOD) o qual será abordado no tópico 3.4.5.4. (92).



### 3.4.5.2. Precisão

A precisão mede a variabilidade dos resultados de medições independentes obtidos para a mesma amostra sob determinadas condições de ensaio. Dependendo destas condições, a precisão do ensaio pode ser dividida em repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade. No âmbito de uma única validação laboratorial, tanto a repetibilidade do método como a precisão intermédia devem ser determinadas.

O número de réplicas dentro da mesma experiência e em experiências independentes deve ser suficiente para fornecer uma estimativa fiável do desvio padrão (DP).

Uma análise de variância unidirecional (ANOVA) pode ser realizada para calcular a repetibilidade relativa ( $S_{repet,rel}$ ) e a variação *entre ensaios* ( $S_{run,rel}$ ) dos desvios padrão de acordo com as equações (1) e (2) respetivamente:

$$(1) \quad S_{repet,rel} = \frac{\sqrt{MS_{mesmo\ ensaio}}}{\bar{C}_{n^{\circ}\ c\u00f3pias}}$$

$$(2) \quad S_{run,rel} = \frac{\sqrt{\frac{MS_{entre\ ensaio} - MS_{mesmo\ ensaio}}{\bar{n}_{r\u00e9plicas}}}}{\bar{C}_{n^{\circ}\ c\u00f3pias}}$$

Em que:

$MS_{mesmo\ ensaio}$	m\u00e9dia quadrada dos valores obtidos no mesmo ensaio calculada por ANOVA unidirecional;
$MS_{entre\ ensaio}$	m\u00e9dia quadrada dos valores obtidos em ensaios diferentes pela ANOVA unidirecional;
$\bar{n}_{r\u00e9plicas}$	n\u00famero m\u00e9dio de r\u00e9plicas por ensaio;
$\bar{C}_{n^{\circ}\ c\u00f3pias}$	concentra\u00e7\u00e3o m\u00e9dia das amostra relativa a todos os ensaios realizados.

A repetibilidade (precis\u00e3o a curto prazo ou varia\u00e7\u00e3o intra-ensaio) refere-se \u00e0 precis\u00e3o e robustez dos resultados obtidos com as mesmas amostras analisadas repetidamente, com o mesmo analista, no mesmo laborat\u00f3rio e com o mesmo equipamento.

A repetibilidade tamb\u00e9m pode ser expressa como o desvio padr\u00e3o relativo ou coeficiente de varia\u00e7\u00e3o (CV) associado aos valores de  $C_q$  (95). O CV deve ser inferior ou igual a 25% em todo o intervalo do ensaio (94). Para expressar a repetibilidade em termos de coeficiente de varia\u00e7\u00e3o dos valores  $C_q$ , ( $CV_{C_q}$ ) pode ser utilizada a equa\u00e7\u00e3o (3):

$$(3) \quad CV_{Cq} = \sqrt[2]{(1 + E)^{(DP_{Cq})^2 \times \ln(1+E)} - 1}$$

Onde o  $DP_{Cq}$  é o desvio padrão dos valores  $Cq$  e  $E$  é eficiência do PCR

A precisão intermédia traduz a variações intra-laboratoriais. Pode ser avaliada através da preparação de 2 séries de amostras idênticas, sendo cada série preparada por diferentes analistas, em diferentes dias ou usando equipamentos diferentes, mas equivalentes (92).

A reprodutibilidade (precisão a longo prazo ou variação entre ensaios) refere-se à variação dos resultados obtidos por diferentes laboratórios e é tipicamente expressa como o DP ou o coeficiente de variação (CV) dos valores ou concentrações das várias réplicas analisadas por laboratórios independentes (ensaio interlaboratorial). Os valores  $Cq$  gerados a partir de diferentes experiências estão sujeitos à variação inerente entre elas, por conseguinte, não podem ser comparados (92). O CV entre ensaios deve ser inferior a 35% (95).

#### **3.4.5.3. Limite de quantificação (LOQ)**

O LOQ é calculado a partir da análise de amostras com concentrações no limite inferior do intervalo linear do método. O intervalo de concentrações da curva de calibração deve estar compreendido duas vezes acima e abaixo da concentração esperada para o LOQ. A variação de concentração entre os vários padrões deve ser pequena e devem ser efetuadas 10 réplicas para cada nível de concentração. A estimativa da precisão do LOQ depende do número de réplicas realizadas em cada concentração e do acréscimo na concentração entre as amostras (92). A precisão associada ao LOQ deve ser especificada como um DP ou DP relativo (CV, %).

#### **3.4.5.4. Limite de deteção (LOD)**

O LOD é definido como a concentração mais baixa na qual 95% das amostras positivas são detetadas. Ou seja, dentro de um grupo de amostras que contém o alvo com concentrações no LOD, não devem ocorrer mais de 5% de reações negativas (94). A estimativa do LOD deve ter em conta tanto a distribuição estatística dos resultados falso-positivos como a das amostras verdadeiras positivas. Deve ser especificada a probabilidade de deteção de falsos positivos ( $\beta$ ) e falsos negativos ( $\alpha$ ) ou confiança na classificação de um verdadeiro positivo (igual a  $1 - \alpha$ ) ou falso negativo (igual a  $1 - \beta$ ) (92).

A taxa de falsos positivos do ensaio é uma medida da especificidade do método e da análise dos controlos negativos (92).

A taxa de deteção de verdadeiros positivos deve ser estimada a partir de medições repetidas de amostras que contém quantidades do alvo no limite inferior da gama de trabalho do método, onde  $> 0\%$  e  $< 100\%$  das reações são positivas e cobrem o intervalo para o nível de confiança requerido (92). Por exemplo, com 95% de confiança, o LOD é a concentração mais baixa onde 95% das cópias são positivas.

Se o laboratório não conhecer o LOD, pode-se realizar um estudo piloto com apenas algumas réplicas em cada concentração, cobrindo uma gama de concentrações mais ampla, e depois utilizar um grande número de réplicas numa gama de concentrações mais apertada. (92).

#### 3.4.5.5. Linearidade

O intervalo linear deve ser caracterizado em termos de declive e coeficiente de correlação (por exemplo, coeficiente de correlação de Pearson, R) através da análise de regressão linear entre a quantidade esperada (calculada) de ácido nucleico e a quantidade observada de ácido nucleico. A curva de calibração deve ser construída utilizando padrões de medição independentes com concentrações absolutas ou relativas especificadas (por exemplo, concentração do número de cópias, cópias/ $\mu\text{L}$ ) que tenham a mesma matriz ou uma matriz semelhante às amostras de ensaio. O coeficiente de variação associado à curva de calibração ( $CV_m, \%$ ) deve refletir a incerteza de medição das concentrações das amostras ensaiadas. As soluções de calibração devem ser distribuídas uniformemente por toda a gama de concentrações, e de preferência estender-se para além desta. Deve ser utilizado um mínimo de 5 níveis de concentração, cada uma no mínimo em duplicado. As concentrações das amostras de ensaio são estimadas a partir da curva de calibração. A concentração ( $ci$ ) é estimada utilizando a equação (4):

$$(4) \quad \log_{10} ci = \frac{Cq - a}{b}$$

Em que:

$Cq$  é o  $Cq$  da amostra de teste;

$a$  é a calibração ordenada na origem;

$b$  é o declive.

De modo a fornecer uma resposta instrumental ou resultados proporcionais à quantidade de analito a ser determinada na amostra de laboratório (92).

As amostras utilizadas para a avaliação da linearidade devem ser representativas das amostras de ensaio típicas e podem ser materiais de calibração ou uma série de diluições de uma amostra. Para uma série de diluições, a quantidade relativa deve ser analisada. Recomenda-se um declive entre 0,95 e 1,05. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) deve ser superior a 0,99 com uma ordenada na origem igual a zero (92).

#### **3.4.5.6. Veracidade**

A veracidade da medição reflete a proximidade entre a média de um número infinito de resultados produzidos pelo método e o valor de referência. Existem três abordagens gerais para obter um valor de referência adequado:

- a) utilização de materiais de referência certificados (MRC);
- b) ensaios de recuperação utilizando amostras com quantidade conhecida de analito com uma matriz que é próxima ou idêntica à da amostra de interesse;
- c) comparação com resultados obtidos por outro método.

Os MRC devem ter uma matriz muito semelhante à da amostra de ensaio e uma concentração próxima à expectável para as amostras a analisar (92).

#### **3.4.5.7. Robustez**

Durante o teste de robustez, deve ser investigado o efeito de pequenos desvios nos parâmetros relevantes sobre o desempenho do método, ou seja, os resultados do ensaio. Os parâmetros relevantes do método que podem influenciar o resultado do método são a concentração e a fonte (fabricante) dos *primers* e sondas, composição dos reagentes PCR, termociclador e parâmetros do ciclo térmico. Considera-se geralmente que o método PCR digital (dPCR), sendo um método de PCR ponto final, é mais robusto do que os métodos qPCR, contudo a amplitude da fluorescência e a temperatura da etapa de hibridação são parâmetros importantes na discriminação entre resultados positivos e negativos, pelo que os parâmetros acima descritos devem ser variados durante os testes de robustez (96).

#### **3.4.6. Vantagens e desvantagens do método PCR**

A principal vantagem do qPCR baseia-se na rápida deteção e quantificação das sequências do DNA alvo e por conseguinte da concentração do microrganismo. O método de cultura é considerado como o método padrão na deteção e quantificação bacteriana a nível internacional pois a maioria das bactérias de importância clínica e segurança alimentar, pode ser cultivada. Contudo nos casos em que é necessária uma intervenção crítica e rápida para evitar surtos de doenças infecciosas, as técnicas tradicionais são lentas e com várias etapas, não conseguindo fornecer resultados num tempo razoável. Esta limitação é agravada pela

necessidade de realizar testes adicionais (determinação de espécies, identificação de fatores de virulência ou resistência antimicrobiana) e não é capaz de detetar microrganismos que se encontrem viáveis mas não cultiváveis (VBNC). O qPCR é capaz de fornecer a informação necessária num curto espaço de tempo devido à sua capacidade de amplificar e quantificar simultaneamente o DNA alvo (96,98). Para além disso é mais seguro uma vez que é necessária menos manipulação de amostras após a amplificação evitando contaminações cruzadas. A utilização de *primers* específicos para o alvo de interesse confere ao método uma seletividade elevada, garantindo assim que se trata do microrganismo que se pretende identificar. Este método é capaz de distinguir o microrganismo de outros semelhantes, mas geneticamente distintos garantindo assim a ausência de interferências e falsos positivos (99). Por conseguinte, o teste qPCR também apresenta uma elevada sensibilidade. Por último, requer uma quantidade reduzida de amostra para que haja deteção de microrganismos e é um método automatizado que pode permitir a análise simultânea de várias amostras numa única reação (multiplex-PCR) (67,96).

Apesar da técnica de qPCR apresentar muitas vantagens também tem algumas limitações. A viabilidade dos microrganismos tem um impacto direto na sua capacidade patogénica e, por conseguinte, desempenha um papel importante na avaliação de potenciais riscos associados à presença de organismos numa fonte de água. A qPCR não consegue distinguir entre microrganismos viáveis ou não viáveis apesar de detetá-los. No entanto, é possível a utilização de corantes fluorescentes que se intercalam com o DNA como a monoazida de propídio (PMA) e o brometo de monoazida de etídeo (EMA) (100) que permitem distinguir os organismos viáveis dos não viáveis. Neste método, o critério para a determinação da viabilidade é a integridade da membrana. As células metabolicamente ativas (independentemente da sua capacidade de cultura) com integridade total da membrana mantêm os corantes fora das células e são, portanto, consideradas como viáveis. No entanto, se a integridade da membrana plasmática for comprometida, os corantes penetram na célula, ou reagem com o DNA fora das células mortas. O DNA alvo das células não viáveis não fica disponível para a amplificação por qPCR e a diferença entre células não fluorescentes e fluorescentes fornece informação sobre a proporção de células viáveis na amostra (100–102).

Os ensaios de qPCR podem dar resultados falso-negativos por várias razões. Alguns dos problemas mais frequentes são a remoção inadequada dos inibidores da PCR na amostra, a libertação ineficaz do conteúdo de DNA microbiano das células e a fraca recuperação do DNA após as etapas de extração e purificação. Os métodos para assegurar o melhor processamento da amostra incluem: incorporação de controlos internos de amplificação ao ensaio de PCR para monitorizar a presença tanto de DNA de amostra purificado como de potenciais inibidores de PCR, indução de vários métodos de lise celular para libertar eficazmente o conteúdo de DNA microbiano. Devido à eficácia variável de cada uma destas

medidas, os esforços para melhorar a sensibilidade de detecção de um ensaio podem precisar de ser ajustados individualmente com base na aplicação clínica do ensaio e no microrganismo de interesse. Outro obstáculo pode ser a presença de contaminantes nas amostras ambientais de água (103). A presença de sedimentos, compostos orgânicos e inorgânicos, detritos celulares e metais pesados que podem interferir na extração de DNA, reduz a recuperação dos microrganismos alvo e ácidos nucleicos, e inibe a atividade da polimerase o que pode levar a resultados falso-negativos (100). Nestes casos, poderia ser incluída uma etapa de purificação a fim de reduzir ou, eliminar os inibidores naturalmente presentes nas amostras ambientais (69,102,104). Contudo, alguns dos reagentes utilizados nos protocolos de purificação do DNA (por exemplo, etanol, isopropanol) podem ser difíceis de eliminar da amostra de água e podem também causar inibição da amplificação (97). Outras abordagens para reduzir a interferência dos contaminantes na detecção incluem adição de moléculas facilitadoras (por exemplo, BSA) (105).

A contaminação por material genético transportado de reações PCR anteriores, que podem ser alojados e transmitidos através de reagentes PCR, tubos, pipetas e superfícies de laboratório diminui significativamente a sensibilidade do método. Devido ao poder de amplificação da PCR, mesmo quantidades muito pequenas de contaminação por "*carry-over*" podem servir como substratos para amplificação e conduzir a resultados falso-positivos. As tentativas de descontaminação de materiais PCR envolveram quase todos os métodos conhecidos de destruição de DNA, incluindo radiação ultravioleta, tratamento químico e digestão enzimática (55,106–108).

As amostras de água ambiental são naturalmente diluídas (55,69,105), o que implica uma pequena concentração dos microrganismos alvo num grande volume de água. A legislação estabelece que são necessários para uma análise fiável volumes de 100 mL (água destinada ao consumo humano e água para banho) e 250 mL de água (água engarrafada). No entanto, as tecnologias baseadas em PCR utilizam tipicamente volumes pequenos (normalmente, 1 ou 2mL), o torna o método menos sensível devido à dificuldade em concentrar todos os microrganismos numa amostra de água (97). Para minimizar a probabilidade de ocorrer um erro na detecção do DNA alvo, são realizadas etapas de extração e purificação do DNA antes da amplificação da PCR como meio de concentrar o DNA total a partir de um volume de amostra maior. Também pode ser incluída uma etapa de concentração que aumenta várias vezes o número de microrganismos alvo num volume gradualmente menor de amostra de água (74,109–116), tornando possível a análise de pequenas amostras de água.

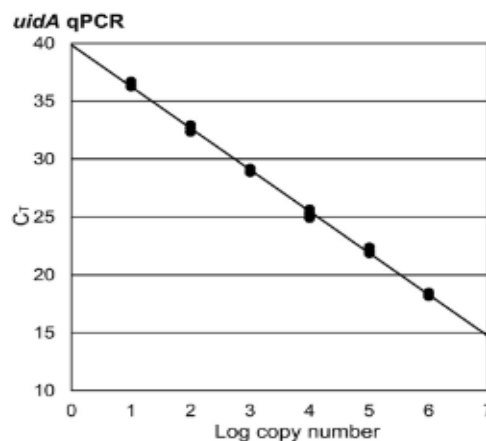
#### **3.4.7. Comparação entre qPCR e métodos de cultura**

Vários estudos que comparam o método de cultura e qPCR em diferentes tipo de água mostraram uma taxa mais alta de resultados positivos e valores de quantificação mais

elevados e precisos na técnica de qPCR comparando com a de técnica de cultura (117). Walker *et al.* (117) avaliou o potencial do método qPCR para a rápida detecção e quantificação da *E.Coli* em amostras de água ambiental comparativamente ao método de cultura colorimétrico da TBX.

A sensibilidade e especificidade foram avaliadas utilizando um conjunto de 87 estirpes de *E.Coli* e 23 estirpes de bactérias não-*E.Coli*, incluindo microrganismos estreitamente relacionados do género *Escherichia*. O método de cultura TBX, não detetou 3 das 72 estirpes de *E.coli* e 2 com um serotipo O157:H7 obtendo-se uma sensibilidade de 94,3%. Em contraste, o ensaio qPCR que tinha com alvo o gene *uidA* da *E.coli*, amplificou 98,9% das estirpes de *E.coli* mostrando-se mais sensível. Apesar disso, método *uidA* qPCR deu resultados falso-positivos para espécies não *E.coli* *Escherichia* diminuindo assim a especificidade do método.

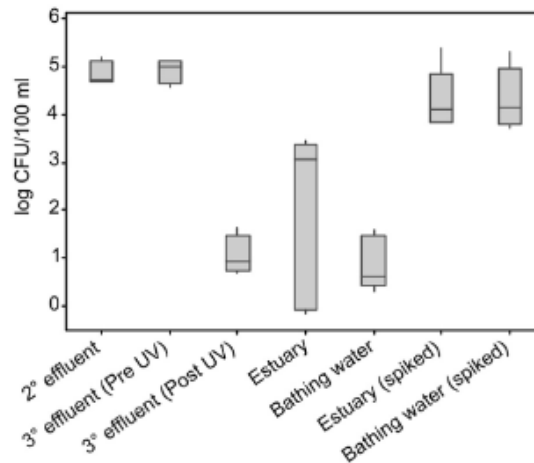
Foi traçada uma curva padrão a partir de uma série de 10 diluições da sequência alvo da *E.coli* para cada ensaio [Fig 6.] . O ensaio *uidA* qPCR obteve um limite de detecção de <10 cópias, sem amplificações positivas abaixo deste limite. Ao amplificar entre 10 e 10<sup>6</sup> cópias, o desvio padrão entre as reações de replicação foi menor que 0,32 ciclos, o que reflete uma boa precisão. O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) foi 0,998 o que demonstra uma elevada correlação (linearidade) entre o número de cópias e o ciclo em que o limite de detecção é ultrapassado (quanto maior o número de cópias, menos ciclos são precisos para se detetar fluorescência, pois há mais concentração de DNA, em menos tempo). A eficiência de amplificação foi calculada como 89,8%. O conjunto de resultado destes parâmetro tornam o método válido para medição da concentração da *E.coli*.



**Figura 6** Curva padrão para o *uidA* qPCR (117)

Foram recolhidas amostras de água de vários locais mensalmente. O número de células *E.coli* viáveis em cada amostra de água foi inicialmente medido utilizando o método de cultura [Fig 7.]

Através da análise estatística ANOVA mostrou-se que a concentração de *E.coli* diferia significativamente entre as amostras ( $p < 0,001$ ). O número de células no 2º e 3º efluente foram semelhantes, mas o número de células viáveis depois do tratamento com UV foi significativamente mais baixo. Em conjunto com a análise baseada em cultura, foram extraídos ácidos nucleicos de todas as amostras de água [Tabela 4]. Existiam concentrações relativamente baixas de DNA nas amostras de água do estuário e águas balneares, em comparação com as amostras dos efluentes.



**Figura 7** Concentrações de *E.coli* em amostras de água retiradas de vários locais. Para dois dos locais (estuário e águas balneares), foi adicionada uma quantidade conhecida de *E.coli* (117)

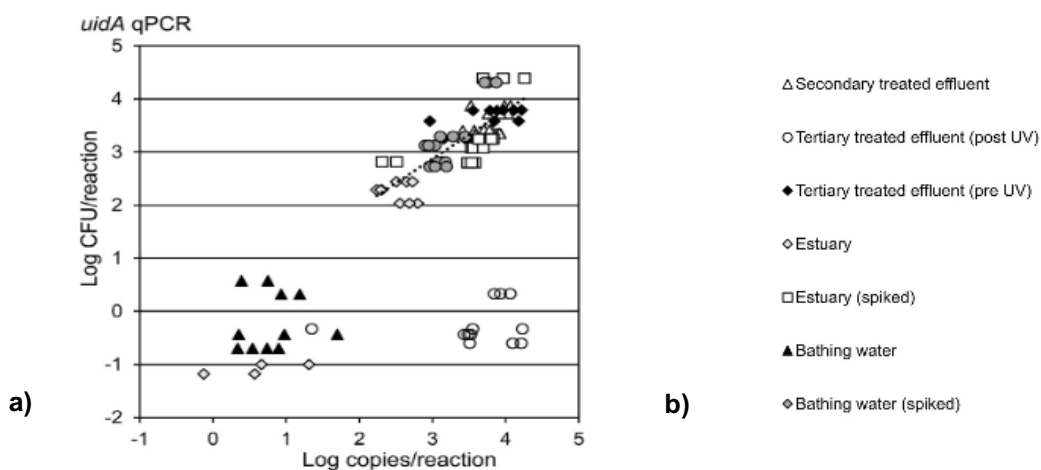
**Tabela 4** Concentrações de DNA para amostras de água (desvios padrão) (117)

Tipo de amostra	Concentração média de DNA (ng/µL)
2º efluente	3,9 (1,5)
3º efluente (antes da UV)	3,1 (1,4)
3º efluente (depois da UV)	2,9 (1,0)
Estuário	1,3 (0,8)
Águas balneares	0,8 (0,5)
Estuário (com concentração conhecida de <i>E.coli</i> )	1,3 (0,8)
Águas balneares (com concentração conhecida de <i>E.coli</i> )	0,9 (0,7)

Para determinar se o número de cópias de DNA pode prever com fiabilidade as UFC em amostras ambientais, relacionou-se o número de cópias de DNA (medido utilizando o ensaio uidA qPCR) e o número de UFC de *E.coli* (medido por cultura) [Fig.8]. Confirma-se uma



relação linear entre o logaritmo do número de cópias e o logaritmo do número de UFC ( $R^2=0.639$ ) quando se ultrapassa as 100 UFC por reação de PCR. Apesar do elevado coeficiente de determinação encontrado para o ensaio qPCR representado na figura 6, este diminuiu para 0,639 quando estes ensaios foram aplicados a amostras de água ambiental. Para além do erro inerente a todas as metodologias microbiológicas, a presença de *E.coli* não viáveis que foram detetadas por PCR mas não pelo método de cultura TBX pode levar à diminuição da linearidade e consequentemente da eficácia do método. A incapacidade da qPCR para distinguir entre células bacterianas viáveis e não viáveis é demonstrada neste estudo pela semelhança dos números de cópias detetadas para efluentes antes e depois do tratamento UV, apesar das diferenças significativas na contagem de UFC. A utilização de corantes como o PMA consegue discriminar células bacterianas viáveis de não viáveis por PCR e a adoção destes métodos pode servir para aumentar a fiabilidade destes ensaios de PCR.



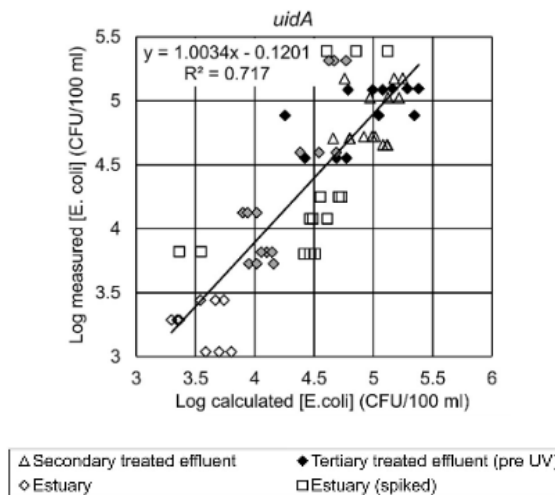
**Figura 8 a)** Comparação do número de cópias do uidA qPCR em função da contagem de colónias para *E.coli* em amostras de água ambiental **b)** respetiva legenda. Está representada a regressão linear em qPCR com  $>100$  CFU/PCR para o ensaio uidA ( $R^2=0,639$ ) (117)

A tabela 5 mostra a percentagem de reações que não tiveram amplificação em diferentes gamas de concentração de *E.coli*. Reações que contêm menos de um equivalente a 10 UFC não amplificaram de forma fiável para nenhum dos ensaios.

**Tabela 5** Comparação da percentagem das reações uidA qPCR sem amplificação em várias gamas de concentração de *E.coli* (117)

CFU/reacção	% de reacções uidA qPCR sem amplificação
<1	29,5
1-10	25,9
10-100	n/a
100-1000	4.8
1000-10000	0.0
>10000	0.0

A figura 9 mostra as concentrações calculadas de *E.coli* em função das concentrações medidas para as amostras que tinham concentrações de *E.coli* maiores que 1000 UFC/100 mL uma vez que só a partir dessa concentração é que se verificou amplificação fiável (tabela 5). Há uma relação linear entre as concentrações de *E.coli* calculadas e medidas pelo uidA qPCR, ( $R^2=0,717$ ). Não foram encontradas diferenças significativas na proporção de *E.coli* calculada para a concentração medida entre os tipos de amostra para os ensaios uidA qPCR. Isto sugere que o qPCR, quando utilizado em combinação com o método de extração de ácido nucleico, neste caso o de *magnetic beads*, é capaz de prever a contagem de UFC em amostras retiradas de vários tipos de água.



**Figura 9** Concentrações de *E.coli* calculadas a partir dos resultados do uidA qPCR em relação aos resultados de *E.coli* medidos para as amostras com concentrações de *E.coli*>1000 CFU/100 mL conforme medido por cultura e respetiva legenda (117)

O qPCR é capaz de detetar de forma fiável a *E.coli* a partir de amostras de água e permite uma identificação mais específica do que métodos baseados em cultura ou de deteção rápida através da obtenção de resultados com um nível de correlação elevado e comparáveis com o

esperado. A adoção de controlos internos de amplificação e corantes de viabilidade, tais como PMA, permite que o qPCR seja capaz de quantificar com mais precisão a *E.coli* uma vez que elimina os interferentes. O principal fator de limitação da deteção em amostras de águas ambientais é frequentemente a concentração e extração do DNA da *E.coli*. Isto pode ser contornado em parte através da filtração de maiores volumes de água, contudo, torna-se impraticável para a análise de amostras de rotina e reduz a rapidez do método, podendo também introduzir maiores concentrações de inibidores também. Posto isto, o estudo futuro de métodos rápidos de base molecular para deteção e quantificação microbiana na água deve-se concentrar na melhoria da eficiência, rapidez e fiabilidade do método de extração de DNA (117).

### **3.4.8. Inovação/otimização do método PCR**

A inovação da técnica de PCR é importante na medida que confere ao método mais especificidade e sensibilidade de maneira a obter resultados cada vez mais credíveis. Algumas das soluções de otimização da técnica para ultrapassar certas limitações já foram apresentadas, contudo, as limitações do método qPCR, tais como o viés na quantificação devido à utilização de curvas padrão e a suscetibilidade aos inibidores de PCR, são obstáculos mais difíceis de ultrapassar com impacto na implementação destes métodos no controlo microbiológico da água. A PCR digital (dPCR) oferece a oportunidade de manter as vantagens do qPCR sobre os métodos baseados em cultura e ao mesmo tempo melhorar estas duas principais limitações (119). O dPCR consiste na divisão da amostra antes da amplificação em milhares de compartimentos onde ocorrem as reações de PCR. Os resultados são examinados individualmente quanto à fluorescência, e a densidade de DNA é calculada a partir da fração de reações finais positivas utilizando a lei de Poisson (118,120) para estimar a concentração das cópias do DNA alvo. Assim deixa de ser necessário a quantificação em tempo real da fluorescência. A base para a quantificação digital por PCR não é, portanto, a rapidez com que um sinal fluorescente é detetado (como em qPCR), mas se o alvo amplifica ou não em cada compartimento. Esta quantificação direta elimina a necessidade de curvas padrão, eliminando a mão-de-obra, material e erro associados à criação e funcionamento de padrões (119,121) e o viés associado à variabilidade do padrão e à eficiência de amplificação não compatível entre padrões e amostras. O confinamento das reações e medições de parâmetros em pequenos compartimentos conduz a outras vantagens de desempenho, incluindo a redução da suscetibilidade à inibição, aumento da repetibilidade e reprodutibilidade, e aumento da capacidade de medir múltiplos alvos numa única análise (multiplex). Podemos concluir que o dPCR devido à suas vantagens como simplicidade,

precisão e sensibilidade pode ser adequado para a monitorização da qualidade da água e é particularmente vantajoso uma vez que é um método autónomo.

## 4. Conclusão

De modo a prevenir a ocorrência de surtos de doenças hídricas como a diarreia e fornecer condições de saneamento e higiene adequadas sem comprometer a saúde pública, é necessário um sistema eficaz de monitorização e gestão da qualidade da água para controlo químico e microbiológico da água. No que concerne aos métodos microbiológicos, os métodos de controlo atuais e os de referência na legislação nacional apresentam diversas desvantagens, tornando-os ineficientes na deteção e quantificação de microrganismos em tempo real (24 h – 48 h).

O processo de desinfecção da água, nomeadamente a cloração, também contribui para a eliminação destes organismos patogénicos, mantendo a qualidade da água ao longo da rede de distribuição. A utilização de métodos que monitorizam o cloro residual como DPD permitem ajustar a dose de desinfetante garantindo que este se encontra na concentração adequada para prevenir que os microrganismos se instalem nas redes de distribuição e possam provocar surtos.

O método de cultura é considerado o método de referência para análise microbiológica da água, no entanto tem se demonstrado ineficiente e com algumas limitações no que respeita à precisão, sensibilidade e rapidez. Existem técnicas capazes de detetar microrganismos na água como os métodos de deteção rápidos, a HPC e a técnica de fermentação em tubos múltiplos, mas nenhuma apresenta a vantagem que as técnicas baseadas em análises moleculares, como a PCR, apresenta: uma maior rapidez na obtenção dos resultados, sem perda de eficácia.

Os métodos baseados em PCR são ferramentas promissoras para fornecer análises sensíveis, rápidas e quantitativas para a deteção dos indicadores atualmente utilizados no controlo microbiológico da qualidade da água, células viáveis mas não cultiváveis e novos agentes patogénicos e indicadores emergentes. O principal interesse em utilizar a técnica de qPCR em detrimento das restantes centra-se no facto que com a obtenção de resultados mais rápido em simultâneo com a deteção e quantificação, conseguem ser aplicadas medidas preventivas em caso de identificação de microrganismos patogénicos de modo a evitar a evolução de surtos.

Apesar do método qPCR apresentar algumas limitações na diferenciação de células viáveis e não viáveis existem métodos capazes de contornar este obstáculo de modo a classificar corretamente o risco de contaminação.

A variedade de técnicas e aplicações disponíveis para métodos baseados na PCR aumentou consideravelmente e os custos envolvidos foram substancialmente reduzidos, o que em conjunto contribuiu para a potencial padronização destas técnicas. No entanto, ainda

necessitam de um maior aperfeiçoamento para serem padronizadas e aplicadas à variedade de águas ambientais e às suas características específicas.

A aplicação da qPCR a diferentes áreas de diagnóstico de rotina microbiano, juntamente com a falta de procedimentos padrão para a determinação de parâmetros por qPCR, levou a um cenário em que a padronização de métodos é realizada de acordo com diferentes regras por diferentes laboratórios. Existem diferenças em relação à validação e padronização dos ensaios de qPCR e os protocolos qPCR têm sido notoriamente difíceis de replicar entre investigadores individuais e laboratórios diferentes.

Em conclusão, a cultura continua a ser atualmente o método de referência. No entanto, no futuro, a qPCR para a classificação de risco de contaminação pode ser ajustada para assegurar a proteção da saúde pública com o benefício de que quaisquer ações preventivas ou corretivas possam ser realizadas num período de tempo muito mais curto, o que pode impedir a exposição contínua a um sistema fora de controlo por um período de vários dias. É importante assegurar que qualquer método de PCR utilizado tenha características de desempenho adequadas, em conformidade com as normas nacionais e internacionais, e seja pelo menos tão sensível como os métodos de cultura padrão. Quando este método é utilizado para analisar volumes equivalentes de água, o número de ocasiões em que é necessário tomar medidas é semelhante quando se utiliza a PCR e quando se utiliza a cultura. Embora haja a possibilidade de surgir um pequeno aumento no número de ocasiões em que é preciso tomar medidas como consequência dos resultados da qPCR, estas serão preventivas e, portanto, aumenta os benefícios para a saúde pública.

## 5. Bibliografia

1. Al-Sulaiman, Sabah A. Abdul-Wahab, Chemical Safety of Drinking-Water: Assessing Priorities for Risk Management. *International Journal of Environmental Studies*. 2012;69(6):1001–1001.
2. Prüss-Üstün A, Wolf J (Jennyfer), Corvalán C (Carlos), Bos R, Neira M, World Health Organization, et al. Preventing disease through healthy environments: a global assessment of the burden of disease from environmental risks. 2016. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204585/9789241565196\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204585/9789241565196_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
3. Johnston RB. Arsenic and the 2030 Agenda for sustainable development. In: *Arsenic Research and Global Sustainability - Proceedings of the 6th International Congress on Arsenic in the Environment, AS 2016*. 2016. 12–4.
4. Política do Sistema de Responsabilidade Empresarial. 2019. Available from: [https://www.adp.pt/pt/grupo-adp/missao-e-visao/downloads/file247\\_pt.jpg](https://www.adp.pt/pt/grupo-adp/missao-e-visao/downloads/file247_pt.jpg)
5. Bolelli L, Ferri EN, Sangiorgi S, Novelli G, Girotti S. The pursuit of good microbiological conditions in domestic softeners: A new improvement. *Journal of Water and Health*. 2020;18(2):200–6.
6. Walker JT, Marsh PD. Microbial biofilm formation in DUWS and their control using disinfectants. *Journal of Dentistry*. 2007; 35(9): 721–30.
7. Bolelli L, Ferri EN, Girotti S. Control of microbial contamination in drinking water from microfiltering dispensers by dialysis ultrafilters. *Ovidius University Annals of Chemistry*. 2016;27(2):87–93.
8. Mazzola PG, Martins AMS, Penna TCV. Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. *BMC Infectious Diseases*. 2006; 16;6(131).
9. Culotti A, Packman AI. *Pseudomonas aeruginosa* promotes *Escherichia coli* biofilm formation in nutrient-limited medium. *PLoS ONE*. 2014;9(9).
10. Sacchetti R, de Luca G, Dormi A, Guberti E, Zanetti F. Microbial quality of drinking water from microfiltered water dispensers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2014;217(2–3):255–9.

11. Abdallah SA, Khalil AI. Impact of cleaning regimes on dental water unit contamination. *Journal of Water and Health*. 2011;9(4):647–52.
12. Decreto-Lei nº 306/2007 do Ministério do Ambiente , do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional de 27 de Agosto 2007, sobre a regulação da qualidade da água utilizada para consumo humano. *Diário da República 1ª Série*, nº 164, pp 5747–65. Available from: <https://dre.pt/application/file/a/640836%0Ahttps://dre.pt/application/conteudo/640931>
13. World Health Organization. A global overview of national regulations and standards for drinking-water quality. 2018. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
14. Conselho da União Europeia. Diretiva 98/83/EC do Conselho de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 1998; 330/32(5.12.98):32–54.
15. Hutton G, Chase C. The knowledge base for achieving the sustainable development goal targets on water supply, sanitation and hygiene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI AG; 2016;13(6):536.
16. UN. Resolution adopted by the Human Rights Council: The human right to safe drinking water and sanitation. 2002. Available from: <http://www2.ohchr.org/english/bodies/hrcouncil/docs/18session/A.HRC.RES.18.1.English.pdf>
17. World Health Organization, Organization for Economic Co-operation. *Assessing Microbial Safety of Drinking Water - Improving approaches and methods*. 2003. Available from: <http://www.oecd.org/pdf/M000014000/M00014623.pdf>
18. World Health Organization, UNICEF. *Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene: 2017 Update and SDG Baselines*. 2017. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.



19. World Health Organization. Combating waterborne disease at the household level. 2007. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43621/9789241595223\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43621/9789241595223_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
20. Pato JHowell. História das políticas públicas de abastecimento e saneamento de águas em Portugal. Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos; 2011. Available from: <http://hdl.handle.net/10451/20099>
21. World Health Organization (WHO). Guidelines on sanitation and health. World Health Organization. 2018. Available from: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/guidelines-on-sanitation-and-health/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/guidelines-on-sanitation-and-health/en/).
22. World Health Organization, UNICEF. Safely managed drinking water - thematic report on drinking water 2017. Available from: <http://apps.who.int/bookorders>.
23. World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality fourth edition incorporating the first addendum. 2017. Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf?sequence=1)
24. Cho MS, Ahn TY, Joh K, Lee ES, Park DS. Improved PCR assay for the species-specific identification and quantitation of Legionella pneumophila in water. Applied Microbiology and Biotechnology. 2015;99(21):9227–36.
25. Griffiths JK. Waterborne Diseases. In: International Encyclopedia of Public Health. Elsevier Inc.; 2016. p.388–401
26. Prüss A, Kay D, Fewtrell L, Bartram J. Estimating the burden of disease from water, sanitation, and hygiene at a global level. Environmental Health Perspectives. 2002;110(5):537–42.
27. WHO World Health Organization. Preventing diarrhoea through better water, sanitation and hygiene. 2014;1–48. Available from:

[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/preventing-diarrhoea/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/preventing-diarrhoea/en/)

28. Wardlaw T, Salama P, Brocklehurst C, Chopra M, Mason E. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *The Lancet*. United Nations Children's Fund; 2010;375(9718): 870–2
29. Li Y, Yang M, Zhang X, Jiang J, Liu J, Yau CF, et al. Two-step chlorination: A new approach to disinfection of a primary sewage effluent. *Water Research*. 2017;108:339–47.
30. Jacangelo JG, Trussell RR. International report: water and wastewater disinfection-trends, issues and practices. 2002. Available from: <https://iwaponline.com/ws/article-abstract/2/3/147/25613/International-report-water-and-wastewater?redirectedFrom=PDF>
31. Decreto-lei n.º152/2017, do Ministério do Ambiente, Do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional de 7 de dezembro de 2017 sobre a regulação da qualidade da água utilizada para consumo humano. *Diário da República 1ª Série, nº 235, pp 6555–76*. Available from: <https://dre.pt/application/conteudo/114315242>
32. ISO 9308-1: Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. 2014. Available from: <https://www.iso.org/standard/55832.html>
33. ISO 9308-2: Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria — Part 2: Most probable number method. 2012. Available from: <https://www.iso.org/standard/52246.html>
34. ISO 7899-2: Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci — Part 2: Membrane filtration method. 2000. Available from: <https://www.iso.org/standard/14854.html>

35. ISO 16266-2: Water quality — Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* — Method by membrane filtration. 2006. <https://www.iso.org/standard/70091.html>
36. ISO 6222: Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium. 1999. Available from: <https://www.iso.org/standard/28960.html>
37. ISO 17994: Water quality — Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods. 2014. Available from: <https://www.iso.org/standard/56617.html>
38. ISO 16140-6: Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures. 2019. Available from: <https://www.iso.org/standard/66327.html>
39. Hapke HF. Drinking water and health. Disinfectants and disinfectant by-products. *Toxicol.* 1988;26(10):968.
40. Spira L, Grimbleby FH. Chlorine in drinking water. *Journal of Hygiene.* 2003;43(2):142–5.
41. Office of environmental enforcement. *Water Treatment Manual: Disinfection.* 2011. Available from: [www.epa.ie](http://www.epa.ie)
42. Lee Y, von Gunten U. Oxidative transformation of micropollutants during municipal wastewater treatment: Comparison of kinetic aspects of selective (chlorine, chlorine dioxide, ferrateVI, and ozone) and non-selective oxidants (hydroxyl radical). *Water Research.* 2010;44(2):555–66.
43. Dufour A, Snozzi M, Koster W, Bartram J, Ronchi E, Fewtrell L, et al. *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management.* 2003. Available from: [www.iwapublishing.com](http://www.iwapublishing.com)

44. Lenz J, Linke S, Gemein S, Exner M, Gebel J. Verification of the efficiency of chemical disinfection and sanitation measures in in-building distribution systems. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2010;213(3):198–203.
45. Khan S, Beattie TK, Knapp CW. Relationship between antibiotic- and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water. *Chemosphere*. 2016;152:132–41.
46. Anágua TAS. Trihalometanos como Subprodutos da Cloração. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Industrial. 2011. Available from: <https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/2481/1/Trihalometanos%20como%20Subprodutos%20da%20Clora%C3%A7%C3%A3o.pdf>
47. ALS. Residual Chlorine Technical Datasheet. ALS Environ Ltd. 2005;44:1–2. Available from: [www.alsenvironmental.co.uk](http://www.alsenvironmental.co.uk)
48. Harp DL. Current Technology of Chlorine Analysis for Water and Wastewater, Technical Information Series. Hach Company Inc, USA Booklet. 2002;17:34.
49. American Public Health Association, Water Environment Federation, American Water Works Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. *Choice Reviews Online*. 2012;49(12):49-6910.
50. Eftekhar B, Skini M, Shamohammadi M, Ghaffaripour J, Nilchian F. The Effectiveness of Home Water Purification Systems on the Amount of Fluoride in Drinking Water. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)*. 2015;16(3):278–81.
51. Masaaki K SP. Rapid Detection Technologies for Monitoring Microorganisms in Water. *Biosensors Journal*. 2014;3(1):109
52. Tanchou V. Review of methods for the rapid identification of pathogens in water samples. Publications Office; 2014. Available from: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC92395/lbna26881enn.pdf>

53. Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Regulations: Revisions to the Total Coliform Rule; Final Rule. 2013. Available from: [www.regulations.gov](http://www.regulations.gov)
54. Deininger RA, Lee J. Rapid Detection of Bacteria in Drinking Water. In: Modern Tools and Methods of Water Treatment for Improving Living Standards. 2005. p. 71–8.
55. Noble RT, Weisberg SB. A review of technologies for rapid detection of bacteria in recreational waters. *Journal of Water and Health*. IWA Publishing; 2005;3(4): 381–92.
56. Bartram J. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety: The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health. *Water Intelligence Online*. 2013;12:256.
57. Reasoner DJ. Heterotrophic plate count methodology in the United States. In: *International Journal of Food Microbiology*. 2004;92(3):307-15
58. Bengraïne K, Marhaba TF. Using principal component analysis to monitor spatial and temporal changes in water quality. *Journal of Hazardous Materials*. 2003;100(1–3):179–95.
59. Craun GF, Calderon RL. Waterborne disease outbreaks caused by distribution system deficiencies. *Journal / American Water Works Association*. 2001;93(9):64–75.
60. Li F, Zhao Q, Wang C, Lu X, Li XF, Le XC. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle labeling and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2010;82(8):3399-403.
61. 9131 Total coliform: Multiple-tube fermentation technique. 1986. Available from: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/9131.pdf>
62. World Health Organization. Multiple-tube method for thermotolerant ( faecal ) coliforms. In: *Guidelines for drinking water quality*. 1996. p. 189–238.
63. 9221 Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group.2017. Available from: <https://www.standardmethods.org/doi/10.2105/SMWW.2882.192>

64. Hernando-Amado S, Blanco P, Alcalde-Rico M, Corona F, Reales-Calderón JA, Sánchez MB, et al. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resistance Updates*. Churchill Livingstone; 2016;28: 13-27
65. Robben C, Fister S, Witte AK, Schoder D, Rossmann P, Mester P. Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. *Scientific Reports*. 2018;8(1):15132.
66. Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Calgua B, Huguet JM, Courtois S, Girones R. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *Journal of Virological Methods*. 2009;158(1-2):104-9.
67. Botes M, De Kwaadsteniet M, Cloete TE. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer Verlag; 2013; 405(1):91-108.
68. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology*. 1992;24:476-80
69. Mendes Silva D, Domingues L. On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Academic Press; 2015;113: 400-411
70. Horowitz GL, Zaman Z, Blanckaert NJC, Chan DW, DuBois JA, Golaz O, et al. Modular analytics: A new approach to automation in the clinical laboratory. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*. 2005;2005(1):8-25.
71. Shen R, Ma L. Review on quantitative PCR assay. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* .1997;221(1-2):137-42.
72. Jofre J, Blanch AR. Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. *Journal of Applied Microbiology*. 2010;109(6):1853-67.
73. Boissinot M, Bergeron MG. Toward rapid real-time molecular diagnostic to guide smart use of antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*. 2002;5: 478-82.

74. Lee J v., Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S, et al. An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems. *Journal of Applied Microbiology*. 2011;110(4):1032–44.
75. Cao Y, Raith MR, Griffith JF. Testing of general and human-associated fecal contamination in waters. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2018; 1768: 127-140
76. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*. Blackwell Publishing Ltd; 2004. 10(3): 190-212
77. Valasek MA, Repa JJ. Staying Current: Technology The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*. 2005;29:151–9.
78. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2005;5(2):209–19.
79. Kim DW. Real time quantitative PCR. *Experimental & Molecular Medicine*. 2001;33(1):101–9.
80. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(16):7276–80.
81. Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*. 1995;4(6):357–62.
82. Liu H, Wang H, Shi Z, Wang H, Yang C, Silke S, et al. TaqMan probe array for quantitative detection of DNA targets. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(1)
83. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 1998;36(5):255–69.
84. Mbongolo Mbella EG, Lievens A, Barbau-Piednoir E, Sneyers M, Leunda-Casi A, Roosens N, et al. SYBR®Green qPCR methods for detection of endogenous reference genes in commodity crops: A step ahead in combinatory screening of genetically modified crops in food and feed products. *European Food Research and Technology*. 2011;232(3):485–96.

85. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. BioFeature Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid. *Biotechniques*. 1997;22(1):130–8.
86. Cao H, Shockey JM. Comparison of TaqMan and SYBR green qPCR methods for quantitative gene expression in tung tree tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(50):12296–303.
87. Leong DT, Gupta A, Bai HF, Wan G, Yoong LF, Too HP, et al. Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials*. 2007;28(2):203–10.
88. Toplak N, Kovač M, Piskernik S, Možina SS, Jeršek B. Detection and quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using real-time multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2012;112(4):752–64.
89. Ibekwe AM, Watt PM, Grieve CM, Sharma VK, Lyons SR. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(10):4853–62.
90. Haff LA. Improved quantitative PCR using nested primers. *PCR Methods and Applications*. 1994;3(6):332–7.
91. Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, García-Pérez AL. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary Parasitology*. 2001;102(1–2):17–27.
92. ISO 20395:2019 Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR. 2019. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:20395:ed-1:v1:en>
93. ISO 5725-1-1994(en) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1- General principles and definitions . 1994. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5725:-1:ed-1:v1:en>
94. FDA. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetics and Veterinary Products. U.S. Food and Drug Administration. 2019;1:1–43.



95. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009;55(4):611–22.
96. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation; 2017;8:108
97. Sy R, Rothman RE, Yang S. PCR-based diagnostics PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004. Available from: <http://infection.thelancet.com>
98. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*. 2002;8(6):257–60.
99. Nocker A, Camper AK. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiology Letters*. 2009;291(2):137–42.
100. Green HC, Field KG. Sensitive detection of sample interference in environmental qPCR. *Water Research*. 2012;46(10):3251–60.
101. Rompré A, Servais P, Baudart J, de-Roubin MR, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. 2002;49(1):31-54.
102. Schriewer A, Wehlmann A, Wuertz S. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *Journal of Microbiological Methods*. 2011;85(1):16–21.
103. Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, de Abreu Corrêa A, et al. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*. Elsevier Ltd; 2010;44(15) 4325–39.
104. Baar C, D’Abbadie M, Vaisman A, Arana ME, Hofreiter M, Woodgate R, et al. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(8).

105. Quilliam RS, Williams AP, Avery LM, Malham SK, Jones DL. Unearthing human pathogens at the agricultural-environment interface: A review of current methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in freshwater ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2011;140(3-4): 354–60.
106. Council Directive 2009/54/EC of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters. *Official Journal of the European Communities*. 2009;52:45–58
107. Decision C. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. *Official Journal of the European Communities*. 2006; 064(1882):37–51.
108. European Union Council. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*. 1998;330:32–54.
109. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T. Comparison of Detection Methods for *Legionella* Species in Environmental Water by Colony Isolation, Fluorescent Antibody Staining, and Polymerase Chain Reaction. *Microbiology and Immunology*. 1993;37(8):617–22.
110. Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T. Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple-nutrient starvation. *FEMS Microbiology Ecology*. 2006;20(3):149–54.
111. Yaradou DF, Hallier-Soulier S, Moreau S, Poty F, Hillion Y, Reyrolle M, et al. Integrated real-time PCR for detection and monitoring of *Legionella pneumophila* in water systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(5):1452–6.
112. Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Creemers B, Ollevier F. Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. *Journal of Microbiological Methods*. 2007;68(1):137–44.
113. Wellinghausen N, Frost C, Marre R. Detection of *Legionellae* in Hospital Water Samples by Quantitative Real-Time LightCycler PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(9):3985–93.

114. Joly P, Falconnet PA, André J, Weill N, Reyrolle M, Vandenesch F, et al. Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: Data interpretation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(4):2801–8.
115. Levi K, Smedley J, Towner KJ. Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of Legionella pneumophila in hospital and environmental water samples. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003;9(7):754–8.
116. Buchbinder S, Trebesius K, Heesemann J. Evaluation of detection of Legionella spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002. Available from: <http://www.urbanfischer.de/journals/ijmm>
117. Walker DI, McQuillan J, Taiwo M, Parks R, Stenton CA, Morgan H, et al. A highly specific Escherichia coli qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Research*. 2017;126:101–10.
118. Cao Y, Griffith JF, Weisberg SB. The next-generation PCR-based quantification method for ambient waters: Digital PCR. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2016;1452:113-130
119. Marx V. PCR heads into the field. *Nature Methods*. 2015;12(5):393–7.
120. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods*. 2013;10(10):1003–5.
121. Vynck M, Vandesompele J, Thas O. Quality control of digital PCR assays and platforms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017;409(25):5919–31.