

Aida Liliana Cruz Figueiredo

**Índice de Contaminação Microbiana e de SARS-CoV-2 em
efluentes urbanos e Águas de Recreio na região Algarvia**



**Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana**

Algarve
2023

Aida Liliana Cruz Figueiredo

**Índice de Contaminação Microbiana e de SARS-CoV-2 em efluentes
urbanos e Águas de Recreio na região Algarvia**

Mestrado: Biologia Molecular e Microbiana
Supervisor: Sílvia Monteiro (Instituto Superior Técnico)
Co-Supervisor: Helena Galvão (UALG)

Algarve
2023

Título do Trabalho:

**Índice de Contaminação Microbiana e de SARS-CoV-2 em efluentes urbanos e
Águas de Recreio na região Algarvia**

Declaração de Autoria do Trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

A autora:

Indicação dos Direitos de Cópia ou “Copyright”

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

A autora:

Resumo

A presença do SARS-CoV-2 nas águas pode designar uma preocupação e deve ser estudada para compreender melhor a disseminação do vírus e qual o papel que o ciclo urbano da água pode ter na transmissão deste vírus. Este estudo teve como objectivo avaliar os níveis de contaminação fecal das águas residuais com indicadores de contaminação fecal clássicos (*Escherichia coli* (*E. coli*) e Enterococos intestinais (IE)) e a eficiência de remoção nas estações de tratamento das ETAR's menos convencional (colifagos somáticos); bem como a possível detecção ou não de SARS-CoV-2.

O SARS-CoV-2 e os parâmetros microbiológicos foram monitorizados em amostras de águas residuais brutas e tratadas, e amostras ambientais foram colhidas em diversos locais da Ria Formosa. Cinco campanhas de amostragem foram realizadas entre 2020 e 2021. Foram colhidas amostras em três estações ambientais na Ria Formosa (Ilha de Faro, cais comercial de Faro, cais de Olhão) bem como afluentes e efluentes de três Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) (Faro-Aeroporto, Olhão e Vilamoura). A presença do SARS-CoV-2 nas águas residuais foi investigada, os resultados revelam alta prevalência de contaminação viral na ETARS da Ria Formosa. O SARS-CoV-2 parece não ter capacidade de sobreviver em áreas costeiras, bem como em estações de tratamento de água na região do Algarve. Este estudo mostrou o potencial de detectar o SARS-CoV-2 em águas residuais como uma ferramenta de alerta precoce e previsão para a propagação da doença.

Palavras-chave: *Águas residuais; Águas de recreio; Contaminação microbiana; SARS-CoV-2.*

Abstract

The presence of SARS-CoV-2 in waters can be a concern and should be studied to better understand the spread of the virus and what role the urban water cycle may play in the transmission of this virus. This study aimed to evaluate the levels of fecal contamination of wastewater with classical fecal contamination indicators (*Escherichia coli* (*E. coli*) and intestinal Enterococci (IE)) and the efficiency of removal in the treatment plants of less conventional WWTP's (coliphages somatic). SARS-CoV-2 and microbiological parameters were monitored in raw and treated wastewater samples, and environmental samples were collected at different locations in the Ria Formosa. Five sampling campaigns were carried out between 2020 and 2021. Three environmental stations were sampled in the Ria Formosa (Faro Island, Faro commercial pier, Olhão pier) as well as tributaries and effluents from three Wastewater Treatment Plants (Faro-Aeroporto, Olhão and Vilamoura). The presence of SARS-CoV-2 in wastewater was investigated, the results reveal a high prevalence of viral contamination at the Ria Formosa WWTP. SARS-CoV-2 appears to have no ability to survive in coastal areas as well as in water treatment plants in the Algarve region. This study showed the potential of detecting SARS-CoV-2 in wastewater as an early warning and prediction tool for the spread of the disease.

Keywords: *Wastewater; Recreational waters; Microbial contamination; SARS-CoV-2.*

Índice

Resumo	iv
Abstract.....	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Abreviaturas e Siglas	ix
1 Introdução.....	1
2 Bactérias.....	5
2.1. <i>Escherichia coli</i>	9
2.2. Enterococcus	13
3 Vírus.....	19
3.1. Vírus entéricos	26
3.2. Bacteriófagos	27
3.2.1. Colifagos somáticos.....	29
3.3. SARS-CoV-2	30
4 Qualidade microbiológica da água.....	36
4.1. Técnicas de avaliação da qualidade da água.....	36
4.1.1. Análises Físico-química	36
4.1.2. Análises microbiológicas.....	37
4.1.3. Análises virológicas.....	38
5 METODOLOGIA	41
5.2 Amostragem e processamento de colheitas	41
5.3 Quantificação do número de bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) em amostras de água	42
5.4 Detecção de Colifagos Somáticos.....	43
5.5 Determinação de SARS-CoV-2	44
5.5.1 Concentração de SARS-CoV-2 em águas residuais e águas ambientais	44
5.5.2 Extracção de RNA das amostras concentradas	44
5.5.3 RT-qPCR	45
6 RESULTADOS	45
7 DISCUSSÃO.....	47
8 CONCLUSÕES.....	52
Bibliografia.....	55

Índice de Figuras

Figura 1: Principais fontes de alteração da qualidade da água.....	2
Figura 2: Principais vias para SARS-CoV-2 chegar às águas.....	4
Figura 3: Parede celular de uma bactéria Gram-positivo e Gram-negativo.....	6
Figura 4: <i>E. Coli</i> em intestino humano no microscópio, ampliada 10 000 vezes.....	9
Figura 5: Estrutura de uma partícula viral normal.....	16
Figura 6: Rotas de infeção humana específicas.....	22
Figura 7: Exemplo de estrutura de um bacteriófago.....	27
Figura 8: Estrutura de uma partícula SARS-CoV-2.....	31
Figura 9: Possíveis rotas de transmissão oral-fecal do SARS-CoV-2.....	32
Figura 10: Exemplo de um teste de plaqueamento.....	39
Figura 11: Fases do PCR.....	40
Figura 12: Ponto das colheitas nas estações ambientais ao longo da Ria Formosa.....	42
Figura 13. Quanti-Tray- Selado e pós incubação. Imagem do autor.....	43
Figura 14: Método de camada dupla para detecção de colifagos somáticos.....	44
Figura 15: <i>Escheria coli</i> , <i>Enterococcus</i> (MPN por 100 mL), abundância de colifagos somáticos (Unidades Formadoras de Placas por 100 mL) e cópias genômicas SARS-CoV-2 ($\mu\text{g. L}^{-1}$) em 5 datas de amostragem (22/09, 21/10, 23/11 e 14/12 em 2020; 08/03 em 2021) em 3 estações da Ria Formosa (lagoa de Faro, porto/cais de Faro e porto/cais de Olhão) e 3 ETAR (entrada e saída) em Vilamoura, aeroporto de Faro e Olhão.....	46

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais doenças bacterianas transmitidas através da água potável.....	8
Tabela 2. Virótipos de <i>E. coli</i>	10
Tabela 3. Espécies <i>Enterococcus</i> e seus habitats.....	14
Tabela 4. Stressores ambientais que afetam negativamente a sobrevivência de <i>Enterococcus</i>	19
Tabela 5. Vírus humanos potencialmente transmitidos através da água.....	24
Tabela 6. Pesquisas sobre a transmissão do vírus por fontes secundárias em diferentes partes do mundo.....	34

Abreviaturas e Siglas

Aw	Actividade de água
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ETAR	Estação de Tratamento de águas residuais
EUA	Estados Unidos da América
FIB	Bactérias indicadoras fecais
IE	<i>Enterococos</i> intestinais
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido ribonucleico
SEM	Scanning electron microscope
UV	Ultra-violeta
SARS	Síndrome respiratório agudo grave
MERS	Middle East respiratory syndrome

1 Introdução

A água é um recurso natural que ocupa mais de 70% do nosso planeta, possui um valor ambiental, económico e social incalculável e é imprescindível à existência de vida (tal e qual a conhecemos) e dos ecossistemas. Estima-se que apenas 2% do volume total da água do planeta seja água doce. Este recurso natural precioso é diariamente exposto a vários tipos de contaminação química e microbiológica, incluindo bactérias, vírus e protozoários (Agência Portuguesa do Ambiente, 2012) Apesar da água ser um recurso abundante e cobrir 70% do planeta, a disponibilidade de água doce sofre grandes impactos das mudanças climáticas globais e dos aumentos da população humana, da urbanização e da poluição (Chahal et al., 2016). Uma vez que a água constitui um dos recursos ambientais mais valiosos e escassos, o seu aproveitamento racional e a preservação dos recursos de água doce devem configurar como metas preferenciais para a sociedade atual. A qualidade da água sofre influência direta e indireta de fenómenos naturais e ações humanas. Os resíduos industriais e domésticos têm originado graves problemas e preocupações nos últimos tempos e, por conseguinte, surgiu a necessidade de se estabelecerem parâmetros de qualidade, fundamentados num quadro legal (Veiga, 2006).

A contaminação fecal das águas é uma preocupação crescente para a água potável em todo o mundo. Na maioria dos casos, os efluentes urbanos não recebem tratamento suficiente nas ETAR's e, conseqüentemente, prejudicam o meio aquático, principalmente as águas de recreio, colocando em risco a saúde pública. Esse risco associado à presença desses microrganismos depende da forma, tipo e concentração do microrganismo. Um artigo de revisão recente mostrou as principais fontes que alteram a qualidade da água, sendo que os microrganismos patogénicos são claramente dominantes neste caso (Pandey et al., 2014)

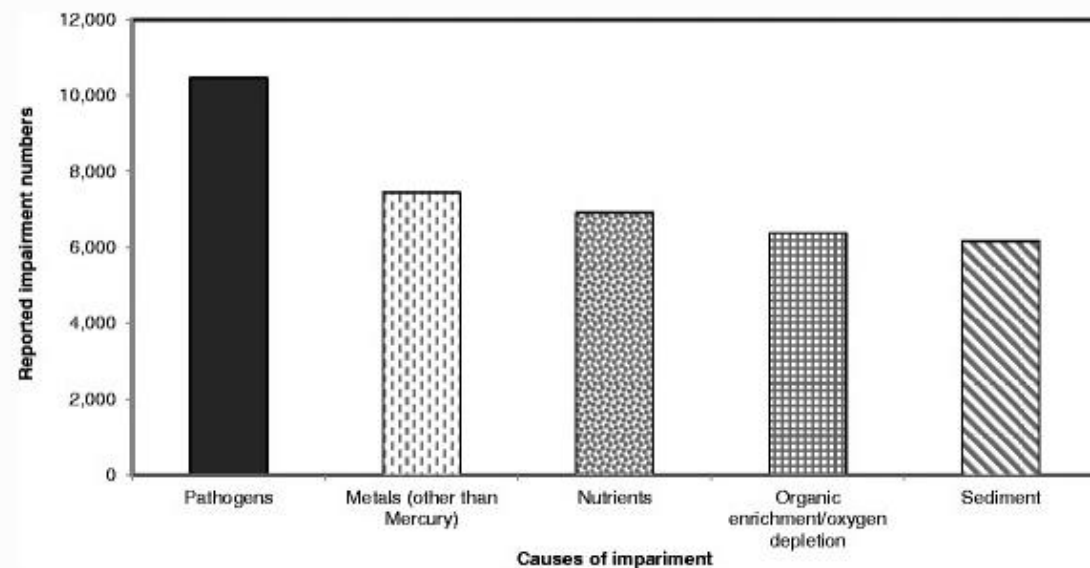


Figura 1: Principais fontes de alteração da qualidade da água. Os agentes patogénicos como bactérias são os que aparecem mais vezes nos estudos de contaminação, seguidos dos metais. Retirado de Pandley et al. (2014).

A principal causa da presença de organismos patogénicos em águas são as atividades antropogénicas, incluindo o uso de terra e fontes de poluição fecal. No entanto, organismos patogénicos transmitidos pela água podem ocorrer de forma ubíqua em muitos habitats aquáticos e solos húmidos (Pandley et al, 2014). Além disso, a contaminação na água também é uma preocupação em áreas rurais de países pouco desenvolvidos, onde existe a necessidade de partilhar instalações sanitárias e devido à dificuldade de manter uma boa higiene e de acesso a água potável (Russell & Walling, 2007)

Os seres humanos são infectados com bactérias e vírus entéricos predominantemente pela via fecal-oral, que inclui contato pessoa a pessoa, contato com vômitos e ingestão de alimentos ou água contaminados com fezes (Xie et al., 2017) Para além dos aspectos de saúde pública, a qualidade e segurança das águas recreativas interiores e costeiras são de extrema importância para os banhistas, com um impacto significativo na economia, nomeadamente nas zonas turísticas. Garantir a segurança das águas é uma prioridade na gestão dos recursos hídricos e uma grande preocupação para investidores e operadores económicos. Além disso, a proteção das águas na perspetiva das alterações climáticas é considerada uma prioridade. Isso requer um programa rígido de vigilância da qualidade de águas, nomeadamente a sua qualidade microbiológica (Ramírez-Castillo et al., 2015).

Devido à diversidade biológica de microrganismos e a sua capacidade infecciosa, as baixas concentrações em que podem ser muitas vezes encontrados no meio aquático e a falta de métodos para análises rápidas, complicam a sua deteção e quantificação. Além disso, a monitorização direta de um único agente patogénico pode fornecer apenas informações específicas sobre este e não permite aferir a presença de outros contaminantes potenciais na mesma amostra de água. Assim, embora técnicas muito promissoras para análise tenham sido desenvolvidas, (Oliver et al., 2014), a avaliação de segurança de águas sempre dependeu e ainda depende da quantificação de bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) (Singhal, 2020). Os FIB constituem uma ferramenta de triagem de microrganismos, que permite uma fácil monitorização da qualidade microbiológica da água. Infelizmente, a análise de FIB é atualmente baseado em métodos culturais que fornecem resultados em 24–48h, o que dificulta o fornecimento de informações em tempo real (Cheepsattayakorn & Cheepsattayakorn, 2020) Além disso, foi demonstrado que os FIBs apresentam grandes problemas na identificação de patógenos específicos, como vírus e protozoários, bem como na identificação da fonte de contaminação fecal (Singhal, 2020)

A Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) é uma doença causada pelo novo coronavírus severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), que tem vindo a afetar o mundo inteiro. Devido ao aumento do número de casos, primeiro na comunidade chinesa, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou pandemia em Março de 2020 (Chan et al., 2022) Apesar de ser um vírus respiratório, está provado que SARS-CoV-2 também pode estar presente em outras superfícies, como em roupas, papel ou plásticos (Lodder & de Roda Husman, 2020) tendo o material genético do vírus sido encontrado em concentrações elevadas nas fezes de doentes infectados (Cahill & Morris, 2020)

A presença do SARS-CoV-2 nas águas também pode ser uma preocupação adicional e que deve ser estudada para compreender melhor a disseminação do vírus e qual o papel que o ciclo urbano da água pode ter na transmissão deste vírus (Siddiqui et al., 2020) O risco de transmissão para humanos a partir de corpos d'água recreativos é desconhecido, uma vez que ainda não houve relatos da descoberta do vírus ou da capacidade de sobreviver em corpos d'água (Giacobbo et al., 2021) No entanto, alguns estudos recentes encontraram RNA viral do SARS-CoV-2 em águas residuais não tratadas colhidas em estações de tratamento de águas residuais (Gregersen, 1978; Boehm & Sassoubre, 2014; Mulani et al., 2019; Deborah Chen & Frankel, 2005).

A atenção adequada deve ser dada ao tratamento de águas residuais, uma vez que essas águas contaminadas podem servir como um possível canal para disseminação de microrganismos patogênicos no meio ambiente (Callaway, 2012). Assim, diante da situação atual da pandemia de COVID-19, é urgente uma discussão mais aprofundada sobre a presença de SARS-CoV-2 em águas residuais, bem como sobre as possíveis transmissões fecal-oral e fecal-nasal (Croxen et al., 2013). A Figura 2 ilustra as principais rotas para o SARS-CoV-2 atingir os cursos de água.



Figura 2: Principais vias para SARS-CoV-2 chegar às águas. O tratamento inapropriado ou insuficiente das Estações de Tratamento de Águas (ETARs) são uma das principais fontes do problema. Adaptado de Cahill & Morris (2020).

Atualmente, ainda não há estudos suficientes para afirmar com certeza se o vírus que causa a COVID-19 pode ser transmitido pela água, pelo contato com as fezes que contêm o vírus ou pelo esgoto. Com base em dados de surtos anteriores de Severe acute respiratory syndrome (SARS) e Middle East respiratory syndrome (MERS), os cientistas estimam que haja um baixo risco de transmissão deste vírus pela água. O risco de transmissão por sistemas de esgoto ou águas recreativas também é estimado como baixo (Meng et al., 2007)

Apesar de poucos dados existentes sobre a sobrevivência e infecciosidade do SARS-CoV-2 em água e o contágio não confirmado por meio dessas matrizes, a identificação do vírus deve ser minuciosamente investigada, principalmente no que diz respeito à possível transmissão via fecal-oral. Essa informação é extremamente importante, especialmente para comunidades com saneamento precário, onde as pessoas provavelmente estarão expostas a água contaminada ou mesmo esgoto não tratado. O desenvolvimento de metodologias de pré-tratamento e concentração especificamente para

a análise de vírus envelopados em matrizes aquosas complexas, como esgoto e água natural é essencial. É importante ressaltar que a eficiência da recuperação dos métodos deve ser confirmada por testes de cultura de células e não apenas por meio de análises de biologia molecular.

Dado a importância da água e a sua fácil contaminação, este trabalho tem como objetivos avaliar os níveis de contaminação fecal das águas residuais com indicadores de contaminação fecal clássicos (*Escherichia coli* (*E. coli*) e Enterococos intestinais (IE)) e a eficiência de remoção nas estações de tratamento das ETAR's menos convencional (colifagos somáticos). As águas residuais dizem respeito ao conceito utilizado para as águas que, depois da utilização humana, apresentam as suas características naturais alteradas. Podem ser definidas como uma combinação de um ou mais de: i) efluente doméstico composto por águas negras (excremento, urina e lamas fecais); ii) água de estabelecimentos e unidades comerciais nos quais se incluem os hospitais; iii) efluentes industriais, águas pluviais e outros escoamentos urbanos; iv) efluentes agrícolas, hortícolas e aquícolas (Duarte, 2022)

As Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETARs) é onde decorra toda a transformação das águas “sujas”. (Duarte, 2022)O tratamento de águas residuais é fundamental para a higiene ambiental, sobretudo em ambientes urbanos. Contudo, as ETARs recolhem produtos químicos, matéria orgânica e microorganismos, incluindo patogéneos e bactérias multiressistentes de várias fontes que podem ser libertados no meio ambiente (Numberger et al., 2019).

O SARS-CoV-2 e os parâmetros microbiológicos descritos anteriormente foram monitorizados em amostras de águas residuais brutas e tratadas, e amostras ambientais foram colhidas em diversos locais da Ria Formosa no período de 2020 a 2021.

2 Bactérias

As bactérias são organismos microscópicos unicelulares e constituem as formas mais primitivas de vida na terra. Existe uma quantidade infindável de tipos de bactérias, capazes de viver em todos os ambientes concebíveis do mundo (e.g.: solo, água do mar, etc). Nem todos os tipos de bactérias causam doenças, na verdade apenas alguns têm esse efeito, sendo designadas de patogéneos. Algumas bactérias podem despoletar inflamações causando danos no coração, sistema nervoso, rins e trato

gastrointestinal.(Bush, 2020) Outras bactérias, como é o caso da *Helicobacter pylori* foram associadas ao aumento de risco de cancro (Moss, 2017)

As bactérias são categorizadas em dois grandes grupos: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com base em sua capacidade de serem coradas pelo corante de Gram (cristal violeta) enquanto permanecem incolores quando expostas ao álcool. As bactérias Gram-positivas retêm o corante, mas as bactérias Gram-negativas perdem a cor após serem tratadas com álcool. Sendo assim, as bactérias Gram-positivas, coram-se em roxo, enquanto as bactérias Gram-negativas coram-se em rosa (CAC, 2003) A reação à coloração é devida à estrutura da parede celular. Enquanto a parede celular das bactérias Gram-positivo é composta primariamente por uma espessa camada de peptidoglicano (representando mais de 90% dos seus constituintes), a parede celular das bactérias Gram-negativo é mais complexa. Consiste numa camada fina de peptidoglicano, representando apenas 10% da parede celular, estando esta rodeada por uma membrana externa (Ross et al., 2003).

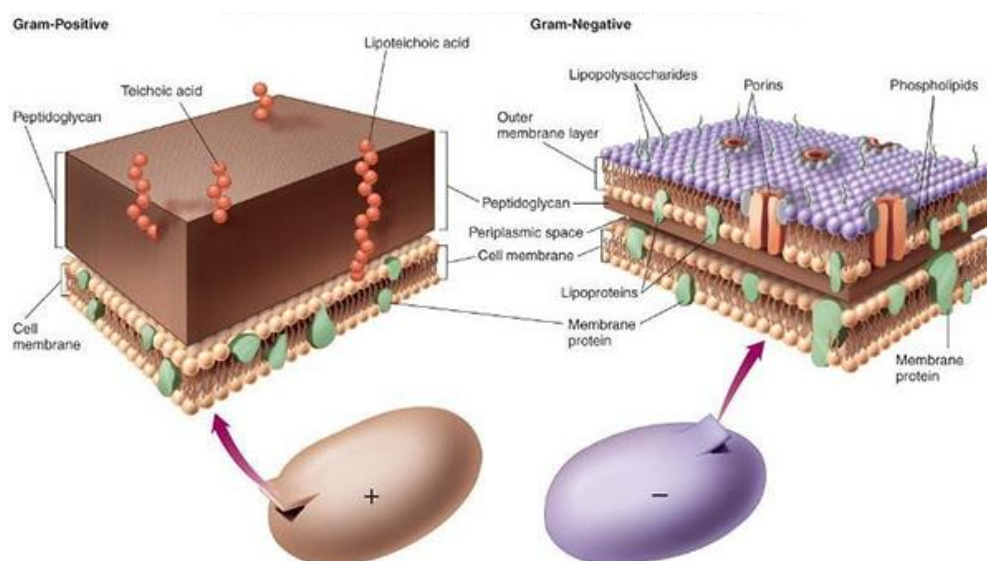


Figura 3: Parede celular de uma bactéria Gram-positivo e Gram-negativo. Retirado de Siddiqui et al. (2020).

Assim, as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas coram de forma diferenciada porque as suas paredes celulares são diferentes. Além disso, elas também causam diferentes tipos de infecções, sendo que requerem igualmente diferentes tipos de antibióticos.

As bactérias Gram-negativas estão entre os problemas de saúde pública mais significativos do mundo devido à sua alta resistência aos antibióticos. Dentro das bactérias Gram-negativas clinicamente mais preocupantes incluem-se dois grandes grupos: *Enterobacteriaceae* e *não fermentadores*. No entanto, também foram identificados outros tipos igualmente clinicamente preocupantes, nomeadamente: *Neisseria*, *Haemophilus spp.*, *Helicobacter pylori* e *Chlamydia trachomatis*. Os *Enterobacteriaceae* são um grupo heterogêneo largamente disperso na natureza, representando aproximadamente dos 80% dos isolados Gram-negativos, com uma quantidade enorme de doenças gerais/espécies em humanos, incluindo infecções do trato urinário, pneumonia, diarreia, meningite, sepse, choque endotóxico e muitos outros. As espécies gerais/espécies que frequentemente afetam os humanos são as seguintes: *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Shigella* e *Salmonella*, entre outras (Oliveira & Reygaert, 2022).

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores têm menor frequência de isolamento em comparação às *Enterobacteriaceae*; porém, representam um grupo significativo por provocarem infecções graves e letais, sobretudo em ambiente hospitalar. Além disso, causam doenças oportunistas em pacientes submetidos a procedimentos invasivos em ambiente hospitalar. Os principais microrganismos não fermentadores que causam doenças humanas são os seguintes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Stenotrophomonas.*, *Alcaligenes* e *Moraxella*. (Oliveira & Reygaert, 2022).

Os cocos Gram-positivos incluem o *Staphylococcus* (catalase-positivo), que cresce em aglomerados, e o *Streptococcus* (catalase-negativo), que cresce em cadeias. Os *Staphylococcus* subdividem-se ainda em espécies coagulase-positivas (*S. aureus*) e coagulase-negativas (*S. epidermidis* e *S. saprophyticus*). A bactéria *Streptococcus* subdivide-se em *Strep. pyogenes* (Grupo A), *Strep. agalactiae* (Grupo B), *Enterococcus* (Grupo D), *Strep viridans* e *Strep pneumonia* (Sizar & Unakal, 2022).

Os bacilos Gram-positivos (bastonetes) subdividem-se de acordo com sua capacidade de produzir esporos. *Bacillus* e *Clostridia* são bastonetes formadores de esporos, enquanto *Listeria* e *Corynebacterium* não são (Sizar & Unakal, 2022).

Os cocos Gram-positivos causam determinadas infecções no ser humano, incluindo difteria, erisipelotricose, listeriose, infecções enterocócicas e antraz. Os bacilos Gram-positivos, por sua parte, são responsáveis pelas seguintes infecções: infecções pneumocócicas, infecções por *Staphylococcus aureus*, infecções estreptocócicas e

síndrome do choque tóxico. Ademais, as bactérias Gram-positivas estão se a tornar cada vez mais resistentes aos antibióticos (Bush, 2021).

As espécies de bactérias normalmente encontradas em águas contaminadas são *Enterococcus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* (Ryu et al., 1999). Algumas das estirpes pertencentes a estas espécies são resistentes à ação da maioria dos antibióticos, representando novos paradigmas na patogênese, transmissão e resistência (Ferreira & Sousa, 2000).

Espécies de bactérias têm sido igualmente encontradas em águas potáveis/consumíveis. Na Tabela 1 apresentam-se as principais doenças bacterianas transmitidas através da água potável, de acordo com os trabalhos de Cabral (2010).

Tabela 1. Principais doenças bacterianas transmitidas através da água potável

Doença	Agente bacteriano
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i> , sorovariedades O1 e O139
Gastroenterite causada por vibriões	<i>Vibrião parahaemolyticus</i>
Febre tifoide e outras salmoneloses graves	<i>Salmonella entérica subsp. enterica</i> sorovar Paratyphi; <i>Salmonella entérica subsp. enterica</i> sorovar Typhi; <i>Salmonella entérica subsp. enterica</i> sorovar Typhimurium.
Disenteria Bacilar ou <i>Shigelose</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella boydii</i> <i>Shigella sonnei</i>
<i>Diarreias agudas e gastroenterite</i>	<i>Escherichia coli</i> , particularmente sorotipos como O148, O157 e O124

Fonte: Cabral (2010).

No entanto, as bactérias intestinais não costumam sobreviver no meio aquático, perdendo gradativamente a capacidade de crescer em meios diferenciais e seletivos devido ao stresse fisiológico a que são submetidas. A sua taxa de mortalidade depende da

temperatura da água, dos efeitos da luz solar, das populações de outras bactérias presentes e da composição química da água (Àvila et al., 2019)

2.1. *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* foi descoberta pelo alemão-austriaco Theodor Escherich, em 1885. São bactérias aeróbias facultativas, pertencentes à família das Enterobacteriaceae. Podem ser encontradas nas fezes de todos os mamíferos e não se multiplicam no ambiente em regiões não tropicais (Edwards & Ewing, 1972) *E. coli* cresce a 44-45°C, fermenta lactose e manitol, libertando ácido e gás e produz indol a partir do triptofano (Su, 1995)

E. coli pertence à família *Enterobacteriaceae*, fazendo parte do grupo de bactérias coliformes fecais. É uma bactéria com forma bacilar, tal como podemos ver na Figura 4, não formadora de esporos e Gram-negativa. Na década de 1890, esta bactéria foi escolhida como indicador biológico para tratamentos de água por Theobald Smith, uma vez que esse microrganismo pode ser encontrada no sistema gastrointestinal e fezes de animais de sangue quente (Edwards & Ewing, 1972; Su, 1995; Denton, 2007) Sua presença sugere o aparecimento de outras bactérias, incluindo aquelas que são prejudiciais aos seres humanos (Denton, 2007).



Figura 4: *E. Coli* em intestino humano no microscópio, ampliada 10 000 vezes. Retirado de Denton (2007).

Embora a maioria das estirpes de *E. coli* não seja patogênica, doenças podem surgir como resultado da disseminação da bactéria para outros órgãos ou, no caso de

enterite ou meningite, invasão por estirpes patogênicas diferentes das habituais do indivíduo (Wong et al., 2012).

Além de fazer parte da flora intestinal comensal, esta bactéria é também encontrada no chão de hospitais e instituições de longa permanência. É a mais comum no trato gastrointestinal humano e carece de virulência neste cenário. Não obstante, quando encontrada fora do trato intestinal, a *E. coli* pode provocar infecções do trato urinário (ITU), pneumonia, bacteremia e peritonite, entre outras (Mueller & Tainter, 2022).

Odonkor e Ampofo (2013), identificaram no seu artigo os seguintes virótipos de *E. coli*, seus respectivos hospedeiros e consequências da infecção (Tabela 2).

Tabela 2. Virótipos de *E. coli*

Nome	Hospedeiros	Consequências
<i>E. coli enterotoxigénica</i>	Humanos, suínos, ovinos, caprinos e bovinos.	Diarreia aquosa, especialmente em lactentes e em viajantes (diarreia do viajante).
<i>E. coli enteropatogénica</i>	Humanos, coelhos e cães.	Diarreia aquosa, especialmente em lactantes.
<i>E. coli enteroinvasiva</i>	Humanos.	Diarreia inflamatória
<i>E. coli enterohemorrágica</i>	Humanos, bovinos e caprinos.	Produzem várias citotoxinas, neurotoxinas e enterotoxinas, incluindo a toxina <i>Shiga</i> (verotoxina), e provocam diarreia sanguinolenta; a síndrome hemolítico-urêmica desenvolve-se em 2 a 7% dos casos.
<i>E. coli enteroagregativa</i>	Humanos.	Diarreia persistente, sobretudo em pacientes com HIV e em crianças residentes em áreas tropicais.

Fonte: Odonkor & Ampofo (2013).

A *E. coli* é um importante indicador microbiológico usado em estudos da qualidade da água. Por conseguinte, a avaliação da qualidade da água é relevante, uma vez que esta bactéria tem sido frequentemente encontrada em águas naturais, esgotos e solos que receberam contaminação fecal (Roveri & Muniz, 2016).

A *E. coli* é transmitida aos seres humanos, sobretudo, mediante o consumo de alimentos contaminados, assim como através de carne moída crua mal cozida e leite cru.

Outros fatores que podem levar à infecção são a contaminação fecal da água e de outros alimentos, bem como a contaminação cruzada durante a preparação de alimentos (e.g.: utensílios de cozinha contaminados). Alguns exemplos envolvidos em surtos de *E. coli* incluem hambúrgueres mal cozidos, salame curado seco, iogurte e queijo feitos de leite cru. Um número cada vez maior de surtos está associado ao consumo de frutas e vegetais, em que a contaminação possivelmente ocorre em virtude do contacto com fezes de animais domésticos ou selvagens durante o cultivo ou manuseio. A infecção por *E. coli* também foi isolada de corpos de água (e.g.: lagoas e riachos), poços e bebedouros, sobrevivendo, contudo, por meses em estrume e sedimentos de bebedouros. A transmissão pela água foi reportada, tanto de água potável contaminada como de águas recreativas (World Health Organization, 2018).

Os sintomas da infecção por *E. coli* podem ir de leves a moderados até graves. Os sintomas leves podem durar de alguns dias até mais de uma semana e incluem: cólica abdominal, diarreia aquosa súbita e grave que pode mudar para fezes com sangue, perda de apetite ou náuseas, fadiga, febre, e em casos esporádicos, vômitos. Os sintomas graves podem incluir: urina com sangue, diminuição da produção de urina, pele pálida, contusões, desidratação. Sem tratamento, a infecção por *E. coli* pode evoluir para uma das seguintes condições, entre outras: infecção do trato urinário, infecção abdominal e pélvica, pneumonia, bacteremia, em que as bactérias entram na corrente sanguínea, e meningite, em que as bactérias atravessam a barreira hematoencefálica (Pietrangelo, 2021).

Sólidos estudos científicos dedicaram-se a analisar os fatores de risco para a infecção por *E. coli*. No estudo de Laupland et al. (2008) foram encontrados os seguintes fatores de risco: o género feminino; a diálise; o transplante de órgãos sólidos e a doença neoplásica (Laupland et al., 2008) Numa meta-análise realizada por Augustin et al. (2021), foram identificados os seguintes fatores de risco: a realização de viagens ao exterior; o contacto com pessoas e/ou animais contaminados; o consumo de alimentos contaminados; e a exposição a água potável não tratada. Relativamente às exposições alimentares, este estudo confirmou fatores de risco conhecidos, como o consumo de carne bovina mal cozida e outros tipos de carne (e.g.: carne processada, carne pronta) e o consumo de leite cru por crianças. Veículos alimentares recentemente identificados foram frango e peixe. A produção (frutas/legumes) não foi associado a infecção esporádica por *E. coli* (Augustin et al., 2021).

2.2. Enterococcus

As bactérias *Enterococcus* possuem uma forma de ovoide e são bactérias Gram-negativas. São bactérias anaeróbias facultativas não esporuladas e certas estirpes podem apresentar mobilidade. Este género de bactérias inclui espécies como *E. faecalis* e *E. faecium*. Adicionalmente, estas são relevantes como indicadores de contaminação fecal, visto que são as mais frequentes e também as mais virulentas para humanos (Feng et al., 2014).

A Tabela 3 apresenta as espécies conhecidas do género *Enterococcus* e os seus habitats atualmente conhecidos (Byappanahalli et al., 2012).

Tabela 3. *Espécies Enterococcus e seus habitats*

Grupo	Espécie	Habitat patogénico	Agente patogénico humano
<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Humano, animal (múltiplos), planta, inseto.	Sim
	<i>E. haemoperoxidus</i>	Superfície da água	
	<i>E. moraviensis</i>	Superfície da água	
	<i>E. silesiacus</i>	Água potável	
	<i>E. termitis</i>	Animal (termite)	
	<i>E. caccae</i>	Humano	
<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Humano, animal (múltiplos), planta, inseto.	Sim
	<i>E. durans</i>	Humano, animal (múltiplos), inseto.	
	<i>E. hirae</i>	Animal (múltiplos), planta.	
	<i>E. mundtii</i>	Solo, planta	Sim
	<i>E. villorum</i>	Animal (porco)	
	<i>E. canis</i>	Animal (cão)	
	<i>E. ratti</i>	Animal (rato)	
	<i>E. asini</i>	Animal (burro)	
	<i>E. phoeniculicola</i>	Animal (pássaro)	
	<i>E. canintestini</i>	Animal (cão)	
	<i>E. thailandicus</i>	Humano, animal (gado)	
	<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i>	
<i>E. pseudoavium</i>		Humano	

	<i>E. malodoratus</i>	Animal (gado)	
	<i>E. raffinosus</i>	Humano	Sim
	<i>E. gilvus</i>	Humano	
	<i>E. pallens</i>	Humano	
	<i>E. hermannienseis</i>	Humano (cão)	
	<i>E. devriesei</i>	Animal (gado)	
	<i>E. viikkienseis</i>	Animal (frango)	
<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i>	Humano, animal (múltiplos), inseto	
<i>E. cecorum</i>	<i>E. cecorum</i>	Animal (galinha)	
	<i>E. columbae</i>	Animal (pombo)	
Não classificadas	<i>E. saccharolyticus</i>	Animal (gado), esgoto	
	<i>E. aquimarinus</i>	Água do mar	
	<i>E. sulfureus</i>	Planta	
	<i>E. dispar</i>	Humano	
	<i>E. italicus</i>	Animal (gado)	
	<i>E. camelliae</i>	Planta	

Fonte: Byappanahalli et al. (2012).

A Figura 5 apresenta uma imagem de *Enterococcus faecium* tirada através de SEM (Microscopia eletrônica de varrimento).

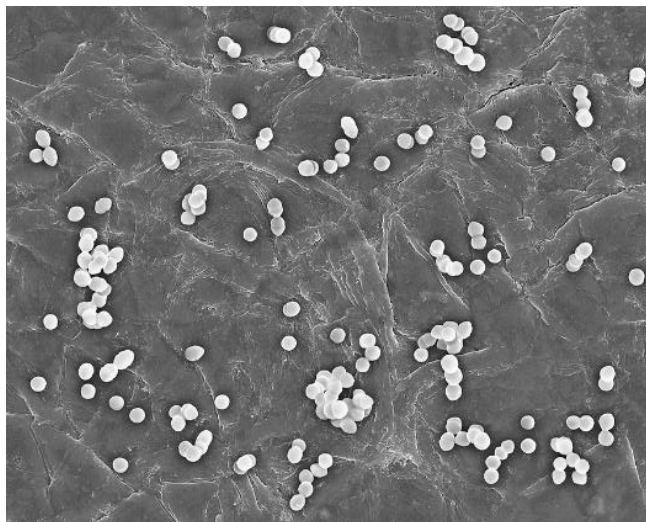


Figura 5: Imagem de *Enterococcus faecium* tirada através de SEM (Microscopia eletrônica de varrimento). Retirado de Feng et al. (2014).

Estas bactérias crescem a uma temperatura ótima de 35°C, embora a maioria das espécies possa crescer entre os 10 e 45°C. *Enterococcus* são também capazes de sobreviver em condições adversas como na presença de cloreto de sódio, pH 9.6 ou temperaturas de 60°C durante mais de 30 minutos (Feng et al., 2014).

Estes microrganismos habitam preferencialmente no trato gastrointestinal de mamíferos, mas também podem estar presentes em aves. São consideradas bactérias ubíquas, visto que podem estar presentes em diferentes meios ecológicos (plantas, solos, águas superficiais, vegetais ou alimentos crus e fermentados). Devido a esta capacidade de sobreviver numa grande variedade de ambientes, são também bactérias que contribuem para várias infeções e têm sido descritos vários casos de resistência a antibióticos (Anderson et al., 2007)

As espécies *Enterococcus* podem causar uma variedade de infeções, incluindo infeções do sistema urinário, bacteremia, endocardite e meningite. As infeções por *Enterococcus faecalis* tendem a ser mais perigosas do que as infeções por *Enterococcus faecium*. Além disso, a bacteremia por *E. faecalis* tem maior probabilidade de estar associada à endocardite do que a bacteremia por *E. faecium* (Feng et al., 2014).

Os *Enterococcus* são altamente resilientes e podem sobreviver a várias condições difíceis, como antissépticos e desinfetantes comuns, promovendo sua persistência

generalizada em itens inanimados hospitalares comuns. Ademais, eles são encontrados nas mãos dos profissionais de saúde (PS), respondendo pela sua fácil transmissão(Said & Tirthani, 2022). A *E. faecalis* é bastante comum em hospitais, propagando-se facilmente nesse ambiente, principalmente devido ao facto de muitos pacientes hospitalizados terem sistemas imunológicos enfraquecidos. Na maioria dos casos, as bactérias são transmitidas por pessoas que trabalham no hospital, alguma das quais carregam a *E. faecalis* no intestino. Outras vezes, os *Enterococcus* são transmitidos através de dispositivos médicos (Brennan, 2021).

De acordo com Koch et al. (2015), os *Enterococcus* contribuem significativamente para a mortalidade e morbidade dos pacientes, assim como para os custos de saúde. Além disso são resistentes a praticamente todos os antibióticos clinicamente disponíveis. (Koch et al., 2004) Os *Enterococcus* são igualmente capazes de sobreviver a uma ampla variedade de condições e ambientes, incluindo temperaturas extremamente altas e baixas (Brennan, 2021) Em geral, os *Enterococcus* tendem a estar presentes em concentrações cerca de uma a três vezes maiores que os *E. coli* em fezes e resíduos municipais. Além disso, foi comprovado que são mais resistentes às práticas de tratamento de águas residuais, e possuem uma sobrevivência prologanda em sedimentos marinhos e de águas doces (Health Canada, 2021).

Como os *Enterococcus* fazem parte da microbiota humana endógena normal, têm pouco potencial patogénico no hospedeiro normal. Não obstante, esta condição pode mudar na presença de determinados fatores de risco no hospedeiro, tais como: uso prévio de antibióticos; pacientes submetidos a procedimentos ou uso de dispositivos invasivos; presença de comorbilidade (neoplasias, doenças malignas do sangue, SIDA); pacientes submetidos a transplantes; realização de quimioterapia (González, 2010).

Os *Enterococcus* também são usados como indicadores de contaminação fecal de águas de recreio em todo o mundo. Apesar de não serem normalmente considerados prejudiciais aos seres humanos, a sua presença no ambiente pode indicar que outros agentes causadores de doenças, como vírus, bactérias e protozoários, também podem estar presentes. Quantidades significativas de *Enterococcus* num corpo de água podem afetar negativamente o valor recreativo e económico do recurso aquático. A superabundância de bactérias fecais na água pode causar encerramento de praias, proibição de natação e navegação e encerramento de áreas de pesca e marisco.(Brennan, 2021).

Nos Estados Unidos da América, o padrão de poluição fecal para águas balneares recreativas foi originalmente definido usando concentrações de coliformes totais, com

base nos resultados de um estudo do Serviço de Saúde Pública dos EUA sobre a saúde dos nadadores no Lago Michigan em Chicago, em 1948 (Falagas et al., 2014). Devido às bactérias Gram-negativas estarem naturalmente presentes na água, esse padrão foi evoluindo para um padrão de coliformes “fecais”, que pressupõe que apenas uma fração do total de coliformes era de origem fecal. No final da década de 1970 e início da década de 1980, estudos sobre a saúde dos nadadores foram realizados para auxiliar na identificação de novos organismos indicadores fecais que podem ser mais confiáveis do que os coliformes fecais. Os investigadores determinaram que as concentrações de *Enterococcus* medidas em águas de recreio estavam fortemente relacionadas ao número de nadadores que adoeciam com doenças gastrointestinais (Cohen et al., 2020). Resultados semelhantes foram obtidos noutros estudos (Chowdhury et al., 2021) Dadas essas evidências, os EUA, a União Europeia e a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendam que os *Enterococos* sejam adotados como um indicador da qualidade da água para recreação e do risco de doenças (Ryu et al., 1999).

A presença de *Enterococcus* nas águas pode fazer com que nadadores e outras pessoas que usam rios e ribeiros para recreação ou aqueles que comem mariscos ou peixes crus fiquem doentes. Os efeitos para a saúde deste tipo de contaminação incluem doenças de pele, ouvidos, olhos e trato respiratório. (Brennan, 2021).

Quando os *Enterococcus* são libertados do trato gastrointestinal de animais de sangue quente em habitats secundários, como águas ambientais, vegetação aquática ou sedimentos, eles são submetidos a uma série de stressores bióticos e abióticos que geralmente levam a um declínio na população ao longo do tempo. A Tabela 4 apresenta uma síntese desses stressores.

Tabela 4. *Stressores ambientais que afetam negativamente a sobrevivência de Enterococcus*

Stressor	Tipo	Fonte do <i>Enterococcus</i>
Luz solar	Luz solar ambiente e simulada	Estirpes ambientais; esgoto.
Salinidade	Águas estuarinas e marinhas	Estirpes ambientais; esgoto
Desinfecção	Cloro/UV/ácido peracético	Esgoto; culturas puras de <i>E. faecalis</i>
Inanição	Condições oligotróficas, deficiência de glicose	Culturas puras de <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. flavescens</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. pseudoavium</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. raffinosus</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. gallinarum</i> , e <i>E. casseliflavus</i>
Predação	Protozoários Bacterívoros	Estirpes ambientais; culturas puras de <i>E. faecalis</i>

Fonte: Byappanahalli et al. (2012).

3 Vírus

Os vírus sempre foram uma das mais abundantes classes do Planeta Terra – estima-se que existam cerca de 10^{31} partículas virais na biosfera. Devido ao seu tamanho extremamente pequeno, quando comparados com a biomassa procariótica, os vírus só representam cerca de 5% (Semedo et al., 2003; Semedo-Lemsaddek et al., 2011).

Os vírus são geralmente associados a um contexto negativo, por serem responsáveis por várias doenças, cuja monitorização, controlo e/ou eliminação são fundamentais. No entanto, os vírus também têm certas propriedades positivas que podem ser exploradas para outros propósitos, como por exemplo, a descoberta de vacinas ou de novos fármacos (Semedo-Lemsaddek et al., 2011).

Algumas características importantes dos vírus incluem (Conceição et al., 2014):

- Apenas se podem reproduzir em células vivas;
- Contêm DNA ou RNA;
- Não são capazes de reprodução sexuada ou assexuada;
- A composição química dos vírus varia consoante a sua família. Para os vírus mais simples, a sua estrutura é simplesmente constituída por proteínas estruturais e ácido nucleico. Os vírus tornaram-se mais complexos com o aparecimento do envelope. Estes não possuem organelas celulares ou citoplasma;
- São muito pequenos, quando comparados com organismos unicelulares (podem ir dos 10 nm aos 200 nm).

O isolamento de vírus numa cultura celular é considerado uma das experiências mais importantes da microbiologia. Atualmente, a forma mais expedita de identificar um vírus é através de sequenciamento de alto desempenho (*Next generation sequencing* – NGS). O NGS é um avanço recente e significativo na detecção e identificação viral. Está se tornando cada vez mais uma abordagem padrão, principalmente para obter genomas inteiros de vírus em um curto período de tempo ou um grande número de dados genômicos de forma rápida e confiável (Sørensen et al., 2001).

Os vírus são entidades acelulares, o que significa que não têm estrutura celular – não tem organelos, ribossomas ou membranas. No entanto, os vírus contêm proteínas, como enzimas. Uma partícula viral completa contém material genético (DNA ou RNA), protegido por uma capsídeo. Além do capsídeo, alguns vírus têm também uma membrana lipídica externa que envolve todo o capsídeo conhecida como envelope. O envelope é uma membrana rica em lípidos que envolve toda a partícula viral, constitui-se de peplômeros, que são encontradas ancoradas ao envelope tal como representa a Figura 5.

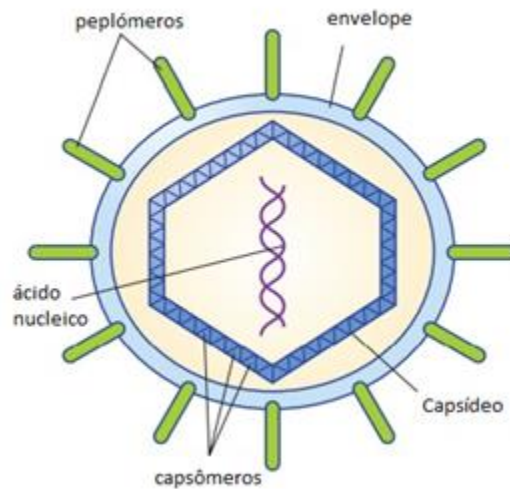


Figura 5: Estrutura de uma partícula viral normal. O ácido nucleico (ADN ou RNA) está no meio, rodeado do capsídeo (invólucro que envolve o material nucleico) e capsômeros (subunidades proteicas que constituem o capsídeo). O envelope é uma membrana rica em lípidos que envolve toda a partícula viral e os peplômeros são estruturas geralmente constituídas de glicoproteínas e lípidios, que são encontradas ancoradas ao envelope. Adaptado de Stevenson (1953).

O risco de infecção viral e/ou doença na população humana é determinado pelas características tanto do vírus como dos indivíduos suscetíveis e da população hospedeira, tais como a resistência inata e adquirida. Além disso, a transmissão do vírus é influenciada por fatores comportamentais, ambientais e ecológicos. A transmissão do vírus pode ocorrer de forma horizontal ou vertical; porém, a maior parte da transmissão é horizontal, isto é, entre indivíduos da população de risco. A Figura 6 apresenta um esquema das rotas de infecção humana específicas.

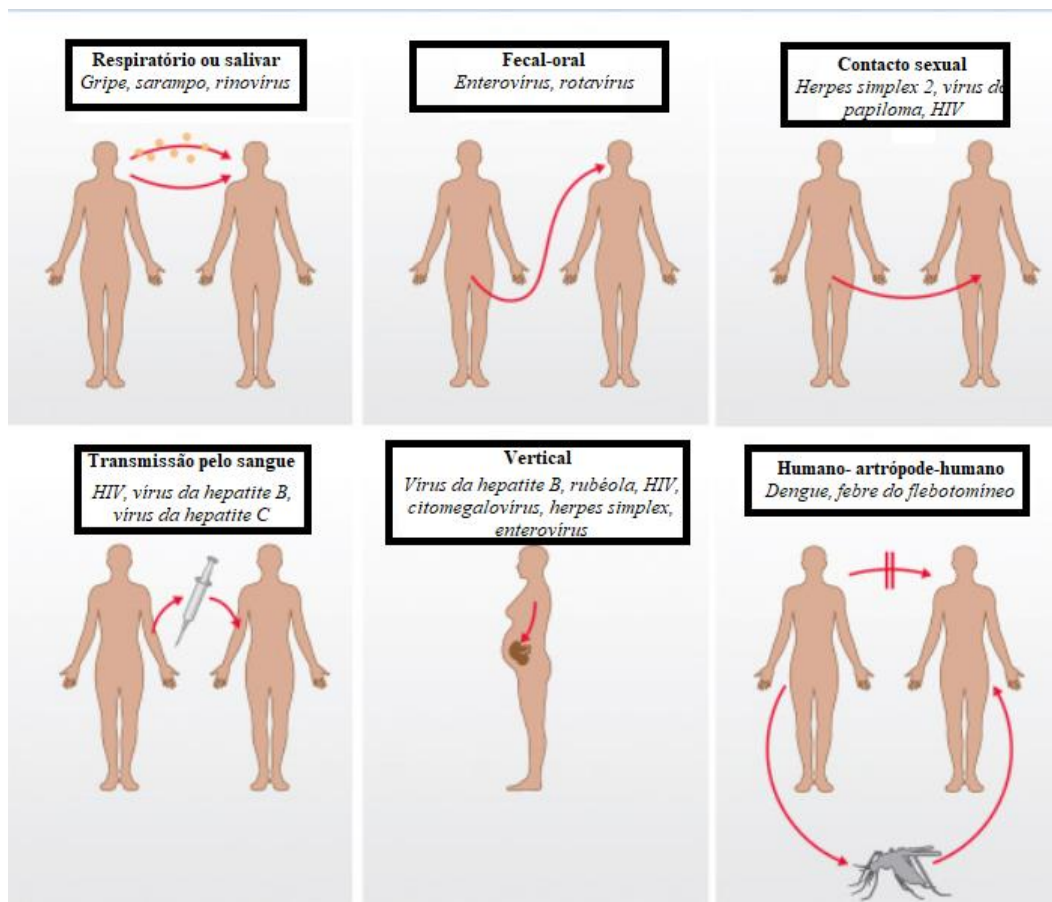


Figura 6: Rotas de infecção humana específicas. Estas rotas de transmissão são definidas principalmente pelas diversas maneiras usadas por diferentes vírus para perfurar o revestimento epitelial externo contínuo do corpo. A rota de entrada é um fator preponderante na determinação dos padrões de ocorrência, da forma de propagação e das populações de risco para cada infecção viral. Adaptado de (Burrell et al., 2017).

De um modo geral, os vírus são específicos dos hospedeiros. Sendo assim, os vírus que infectam humanos não infectam hospedeiros não humanos, tais como animais e plantas. O contrário também sucede, assim, vírus que infectam animais e plantas, por norma, não infectam humanos. Não obstante, um pequeno número de vírus entéricos já foi detectado em humanos e animais. A maioria dos vírus infeta, também, apenas tipos específicos dentro de um hospedeiro. Os tipos de células suscetíveis dependem do vírus e, como tal, as consequências a nível de saúde relacionados a uma infecção viral variam extensivamente consoante a localização das células suscetíveis no corpo. Ademais, a infecção viral pode despoletar respostas imunes que causam sintomas inespecíficos (Health Canada, 2011).

Os vírus não se podem replicar fora dos tecidos dos seus hospedeiros e, por conseguinte, não se podem multiplicar no ambiente. No entanto, podem sobreviver no

ambiente por longos períodos temporais, mais do que a maioria das bactérias intestinais. Como tal, torna-se inseguro depender somente de padrões bacteriológicos de qualidade da água. Na verdade, os vírus podem sobreviver e permanecer infecciosos por até 130 dias na água do mar, por até 120 dias em água doce e por até 100 dias no solo a temperaturas que variam entre os 20 e os 30 °C (la Rosa et al., 2012). Na Tabela 5 apresentam-se os vírus humanos potencialmente transmitidos através da água.

Tabela 5. Vírus humanos potencialmente transmitidos através da água

Grupo	Género	Família	Doença causada
<i>Norovírus</i>	<i>Norovírus</i>	<i>Caliciviridae</i>	Gastroenterite
<i>Enterovírus humano A-D</i>	<i>Enterovírus</i>	<i>Picornaviridae</i>	Paralisia, herpangina, meningite, doença respiratória, doença mão-pé-boca, miocardite, anomalias cardíacas, corrimento, pleurodinia, diabetes
<i>Vírus da hepatite A</i>	<i>Hepatovírus</i>	<i>Picornaviridae</i>	Hepatite
<i>Adenovírus humano A-G</i>	<i>Mastadenovirus</i>	<i>Adenoviridae</i>	Gastroenterite, doença respiratória, conjuntivite
<i>Vírus da hepatite E</i>	<i>Hepevírus</i>	<i>Hepeviridae</i>	Hepatite
<i>Vírus da gripe A</i>	<i>Vírus da gripe A</i>	<i>Orthomyxoviridae</i>	Gripe
<i>Coronavírus humano</i>	<i>Coronavírus</i>	<i>Coronaviridae</i>	Gastroenterite, doença respiratória
<i>Poliomavírus humano</i>	<i>Poliomavírus</i>	<i>Polyomaviridae</i>	Doenças de pele, leucoencefalopatia multifocal progressiva, nefropatia, cistite hemorrágica
<i>Picobirnavírus humano</i>	<i>Picobirnavírus</i>	<i>Picobirnaviridae</i>	Diarreia
<i>Papilomavírus</i>	<i>Papilomavírus</i>	<i>Papillomaviridae</i>	Verrugas na pele e na garganta (mais raro), cancro cervical e outros cancros menos comuns, mas graves.

Fonte: La Rosa et al. (2012) (la Rosa et al., 2012).

Alguns fatores são identificados na literatura como tendo a capacidade de reduzir a população viral, nomeadamente a temperatura viral elevada, o aumento da luz solar, uma maior concentração antimicrobiana e níveis mais elevados de oxigénio. Além disso, a sobrevivência dos vírus é menor em águas não estéreis (Pinon & Vialette, 2018).

A detecção do vírus é algo bastante complexo ainda agora na prática médica. Múltiplos métodos são usados para a detecção laboratorial de infecções virais, incluindo cultura celular, detecção de antígeno e detecção de ácido nucleico. A detecção de vírus por cultura celular embora não sendo uma prática tão recorrente atualmente devido à existência de técnicas mais rápidas de biologia molecular (que proporcionam resultados rápidos, específicos, e sensíveis), é ainda o *gold standard* para a detecção de vírus, particularmente quando é necessário aferir da sua infecciosidade. Embora a importância relativa do isolamento viral como método de detecção está a diminuir rapidamente, ainda é necessário porque é a única técnica capaz de fornecer um vírus isolado viável que pode ser usado para caracterização adicional, como nos testes de tipagem, nomeadamente no que se refere ao vírus da polio (Cabelli, 1983). Uma vantagem adicional é que, em contraste com a maioria dos métodos de detecção de antígenos e ácidos nucleicos, a cultura em linhas celulares permite a detecção de vários vírus (Cabelli, 1983).

A primeira etapa para realizar uma análise virológica da água é a concentração, que tenta recuperar e concentrar o maior número possível de partículas virais, ou mesmo manter o material genético em suspensão (Boehm & Soller, 2011). Existem vários procedimentos de concentração disponíveis, e a escolha depende do tipo de material e vírus a ser isolado. A recuperação viral e técnicas de concentração incluem ultrafiltração (Whitman et al., 1998), floculação (Chibani-Chennoufi et al., 2004), adsorção-eluição usando filtros ou membranas (Dimmock et al., 2016), separação de duas fases com polímeros (Stanley, 1938) e o uso de colunas cromatográficas monolíticas.

É importante reconhecer que nenhum método pode ser universalmente reconhecido como superior: eficiência, constância de desempenho, robustez, custo e complexidade são todos fatores a serem considerados para cada método e as características de desempenho devem ser monitorizadas continuamente (de Villiers et al., 2004).

As águas residuais são frequentemente contaminadas por vírus entéricos, como adenovírus e rotavírus, e bacteriófagos (Hurst & Reynolds, 2002). Quanto ao SARS-CoV-2, a sua presença em águas contaminadas continua a ser alvo de estudo por parte dos investigadores (Callaway, 2012).

A presença de vírus na água representa um risco à saúde pública e, por conseguinte, a prevenção da transmissão do vírus pela água requer políticas adequadas para reforçar os sistemas de abastecimento de água e melhorar a vigilância epidemiológica (Peláez-Carvajal et al., 2016).

3.1. Vírus entéricos

O vírus entéricos referem-se a todos os vírus encontrados no sistema gastrointestinal humano e que podem causar infecções ou doenças em pessoas expostas a eles pela via fecal-oral (Soule et al., 2000). Esses vírus invadem as células do sistema gastrointestinal do hospedeiro humano e proliferam através da replicação viral. Os vírus entéricos são particularmente prevalentes em águas residuais urbanas, sendo expelidos em grandes quantidades nas fezes de pessoas infectadas com contagens variando de 10^5 – 10^{13} partículas virais por gramas de fezes (Ericsson et al., 2002). Em contraste, os vírus não entéricos, como os vírus respiratórios, não são considerados patogêneos transmitidos pela água (Health Canada, 2011).

Os vírus entéricos são encontrados com muita frequência nas águas, sendo que tem sido comprovado que várias epidemias tiveram a sua origem na água consumida pelas populações. Depois de contaminarem o hospedeiro, os vírus entéricos invadem o trato intestinal e são eliminados abundantemente através das fezes e da urina. Estes vírus estão entre os mais recorrentes e perigosos relacionados com infecções originadas na água, sendo responsáveis por patologias digestivas, sobretudo a diarreia que é a mais comum, bem como hepatites, conjuntivites, infecções do sistema nervoso central e doenças crônicas (Aparício, 2014).

Essa enorme quantidade de agentes pode ser disseminada entre as pessoas através da água, encerrando assim o ciclo de transmissão fecal-oral (Gilgen et al., 1997). Na água, os vírus entéricos podem sobreviver (e potencialmente infectar) por meses (Schwab et al., 1993). Devido à forte especificidade do hospedeiro dos vírus entéricos humanos, a identificação desses vírus em habitats aquáticos permite a determinação conclusiva da contaminação fecal humana (Kovač et al., 2009; Bosch et al., 2011). Estes vírus possuem cápsides robustas o que faz com que se mantenham infecciosos durante bastante tempo, mesmo sob condições adversas. Ademais, são bastante resistentes à desinfecção, aquecimento, pressão e pH baixo da água. Como tal, a sua eliminação ou perda de infecciosidade na água requer a utilização de processos com cloro, ozono e/ou exposição à radiação UV nas Estações de Tratamento de Água (ETA) e nas ETARs (Salvador et al., 2020). A remoção de vírus entéricos é complicada devido ao seu pequeno tamanho e relativa facilidade de passagem pelas barreiras de infiltração; não obstante, estes vírus são facilmente inativados através da aplicação de diversas tecnologias de desinfecção, em

dosagens relativamente baixas. Nas alimentações de água potável com sistema de distribuição, deve-se manter sempre um resíduo desinfetante (Health Canada, 2011).

A detecção de vírus entéricos em amostras de água de fonte pode ser utilizada como uma ferramenta para avaliar os potenciais riscos relacionados ao uso de uma fonte de água bruta específica e para garantir que o tratamento adequado esteja em vigor. Além disso, os testes de vírus entéricos pode ser extremamente útil para investigadores e autoridades de saúde pública durante investigações de surtos nas quais as evidências epidemiológicas indicam que a água pode ser a fonte de infecção (Health Canada, 2011).

3.2. Bacteriófagos

Os bacteriófagos são entidades que infetam seres superiores. Tal como os vírus, estes reproduzem-se após a infeção do seu hospedeiro. São de natureza ubiquitária e conseguem sobreviver nas mais variadas condições. A gama de temperaturas para a sobrevivência dos bacteriófagos varia desde 4 a 95°C e quanto ao pH, conseguem sobreviver entre 1 a 11 (Ashbolt, 2004).

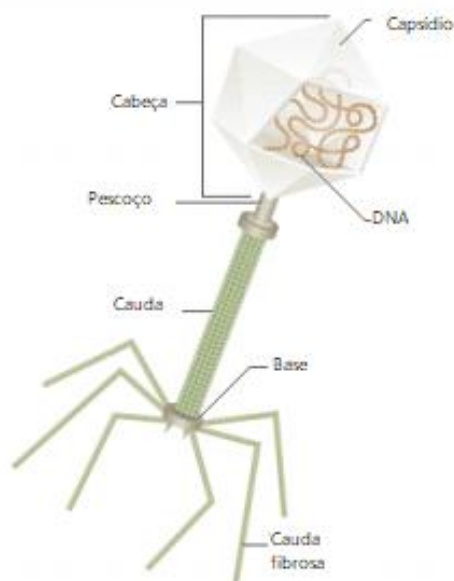


Figura 7: Exemplo de estrutura de um bacteriófago. Os bacteriófagos com DNA normalmente apresentam os seguintes constituintes: cabeça cauda e fibras da cauda (cauda fibrosa). A cabeça é o local onde está o material genético, sendo que a cauda e as fibras estão associadas à penetração do material genético na célula hospedeira. Adaptado de Ashbolt (2004).

De acordo com a sua morfologia, tipo de ácido nucleico e presença ou ausência de envelope ou camada lipídica, podem ser classificados em 13 famílias. Em termos de

morfologia, os fagos podem ser isométricos (icosaedro) com cauda, em forma de hélice (filamentosos) ou pleomórficos (Barth, 2007).

Quanto à infecção da célula bacteriana pelo fago, o primeiro passo é dado pelas fibras da cauda, que aderem a receptores específicos na bactéria. Quando o fago adere à célula hospedeira, o material genético passa da cabeça para a cauda e entra na bactéria. Normalmente, este é o único componente que entra dentro da bactéria, todos os restantes ficam de fora. Alguns fagos possuem enzimas que digerem vários componentes do invólucro bacteriano, que ajuda à entrada (Messacar et al., 2017).

Os fagos podem ser líticos (ou virulentos), que por definição são fagos que se multiplicam no interior da bactéria, destruindo-a no final do ciclo de vida, ou lisogénicos, com possibilidade de integração no genoma do hospedeiro replicando com o mesmo (Barth, 2007).

Mais recentemente, o tratamento de infeções por fagos que inativam agentes patogénicos infantais é considerado uma alternativa ao uso dos antibióticos. A terapia fágica preventiva pode eliminar bactérias patogénicas de produtos alimentares e águas, bem como ajudar no tratamento e controlo de doenças (Mocé-Llivina et al., 2005).

Os bacteriófagos podem ser usados como indicadores fecais da qualidade microbiana da água, qualidade dos alimentos e mariscos, contaminação de esgoto e eficiência do tratamento de água e esgoto. A análise é compilada através da análise das taxas de remoção mediante o processo de tratamento de esgoto, incluindo a eficácia da desinfecção UV. Eles também podem ser usados como indicadores de vírus patogénicos, como Noravírus e Rotavírus (ALS Environmental, n.d.).

Inspirados por estes estudos, mais investigadores apostaram nos fagos para resolver outro problema importante: a poluição da água. Os fagos são encontrados abundantemente em águas contaminadas, e, embora sejam um grupo diversificado, apresentam elevada especificidade no reconhecimento das bactérias hospedeiras (Fong & Lipp, 2005).

Devido à sua capacidade de infectar especificamente hospedeiros bacterianos, os fagos foram recentemente usados como novas ferramentas no controlo da poluição da água, sendo que foram considerados melhores indicadores de vírus entéricos do que as bactérias indicadoras fecais (Ji et al., 2021a). Com características morfológicas e biológicas similares, os bacteriófagos reproduzem o destino e o transporte dos vírus entéricos. Os bacteriófagos entéricos, especialmente os fagos que infectam *Escherichia coli* (colifagos), têm sido considerados como alternativas ou complementos às bactérias

indicadoras fecais (Toribio-Avedillo et al., 2021). Destarte, os fagos constituem-se potenciais indicadores virais, dado que são frequentemente encontrados em concentrações elevadas nos esgotos domésticos e por possuírem alta resistência a sistemas de tratamento, assim como a sua semelhança com os vírus entéricos patogêneos no que se refere à estrutura, composição tamanho e forma de replicação. Além disso, os fagos são mais fácil de serem detetados em comparação aos vírus entéricos patogêneos (Ramos et al., 2022).

A presença de bacteriófago F+ numa amostra de água normalmente indica poluição por águas residuais contaminadas por fezes humanas ou animais. A sua sobrevivência no meio ambiente, remoção por processos de tratamento de água amplamente utilizados e concentração/retenção por moluscos assemelha-se à dos vírus entéricos humanos de origem alimentar e hídrica, por exemplo, hepatite A, Norovírus e Rotavírus. Assim, eles são um organismo indicador potencial para a presença de tais vírus.(ALS Environmental, n.d.).

Ainda, possuem grande resistência no meio ambiente e nos sistemas de tratamento de águas residuárias, são simples e possuem baixo custo nas análises de detecção e enumeração, não são prejudiciais ao ser humano (Rajtar et al., 2009).

Esta nova tecnologia baseada em fagos tem potencial para não só ser um excelente indicador da qualidade da água, devido à alta especificidade do fago, como também um bom indicador para detectar fontes de poluição. Um dos grupos mais usados como indicador de contaminação fecal em águas são os colifagos somáticos (Ahmed et al., 2014).

3.2.1. Colifagos somáticos

Os colifagos somáticos são considerados os melhores indicadores de poluição fecal da qualidade microbiológica das águas. Os colifagos são fagos que infectam *E. coli* e outros membros da família *Enterobacteriaceae*. Portanto, são vírus que infectam bactérias coliformes, sendo utilizados em sistemas aquáticos para avaliação de risco para vírus entéricos humanos.(Singh et al., 2022). Os colifagos somáticos que infetam por via da parede celular pertencem a quatro famílias distintas: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* e *Microviridae* (Angel et al., 2007).

Dado que os colifagos são de fácil e rápida enumeração, a sua utilização como indicadores é apropriada. Além disso, a sua taxa de inativação é semelhante à reportada

de outros microrganismos patogênicos e encontram-se em abundância em águas poluídas (Santos & Hoshino, 2005).

Quanto aos métodos de detecção, geralmente envolvem a incubação da amostra e o estudo do hospedeiro bacteriano em meio com nutrientes para ser possível visualizar a formação de halos de lise. Estes halos são zonas transparentes no meio de cultura (onde se deu a lise celular bacteriana). A quantidade é expressa em unidades formadoras de colônias (PFU) pelo volume dado da amostra (World Health Organization, 2017).

3.3. SARS-CoV-2

A síndrome respiratória aguda severa (SARS) é altamente infecciosa e potencialmente letal apresentando-se com sintomas semelhantes aos de gripe (Lavanchy, 2011). Em dezembro de 2019, a OMS foi informada sobre 27 casos de pneumonia de etiologia desconhecida com início de sintomas a 8 de dezembro, incluindo sete casos graves. Em janeiro de 2020, a comunidade científica chinesa identificou o um novo coronavírus 2019-nCoV como agente causador da infecção, mais tarde esse esse novo coronavírus foi renomeado como SARS-CoV-2. Devido ao aumento súbito do número de casos de uma doença acima do que seria esperado, a OMS foi forçada a declarar pandemia a 11 de março. Desde então, ensaios clínicos e investigações têm sido desenvolvidas para se saber a origem deste vírus, as suas consequências para a humanidade e possíveis tratamentos para os infectados (Lavanchy, 2011)

A COVID-19 é uma doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2. A apresentação clínica é geralmente a de uma infecção respiratória com sintomas que vão desde uma constipação ligeira a uma pneumonia que pode ser fatal. Os sintomas mais comuns são febre, tosse e dificuldades respiratórias, no entanto alguns doentes apresentam-se assintomáticos. As complicações mais severas englobam falha de órgãos, choque séptico ou tromboembolismo venoso. Visto que se trata de um vírus respiratório, SARS-CoV-2 é altamente transmissível por gotículas, contacto com secreções respiratórias e aerossóis (Russell & Walling, 2007)

SARS-CoV-2 é geneticamente muito semelhante ao SARS-CoV-1 e ao coronavírus do morcego (RaTG13). O envelope viral está coberto por glicoproteínas S, protegendo o ARN (Figura 8). O primeiro passo de infecção é a ligação do vírus às células do hospedeiro através das sub-unidades das proteínas S. SARS-CoV-2 tem uma taxa de reprodução muito mais alta que outros vírus, o que facilita a rápida propagação (Kamar, 2014).

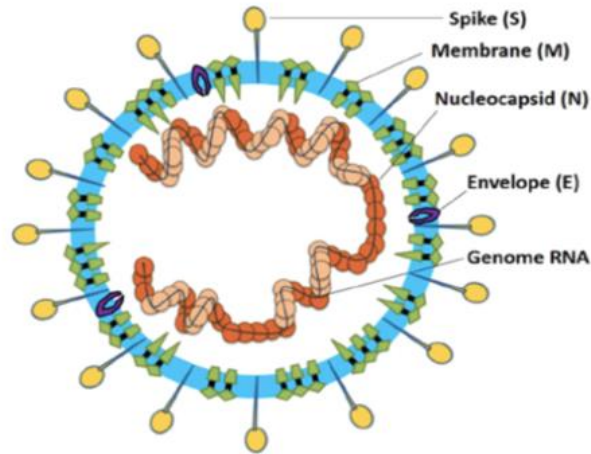


Figura 8: Estrutura de uma partícula SARS-CoV-2. O ácido nucleico (ARN) está no meio, rodeado do capsídeo (invólucro que envolve o material nucleico). O envelope é uma membrana rica em lípidos que envolve toda a partícula viral. Retirado de Kamar (2014).

Em geral, os vírus humanos podem ser transmitidos através de fluidos corporais humanos, tais como saliva, muco, fezes, vômito, urina e sangue, os quais ao entrar em contacto direto com outras pessoas, ou através da água, alimentos e superfícies, despoleta a contaminação. Relativamente à COVID-19, foram verificadas várias rotas de transmissão e outras apenas hipotetizadas. Alguns estudiosos levantaram a hipótese de uma possível transmissão fecal do vírus. Por exemplo, Heller et al. (2020), levantou a hipótese de que a partir das fezes as três principais rotas do vírus poderiam ser para a água, para superfícies ou para locais onde estão presentes insetos vetores. A partir desses ambientes, por diferentes vias, os vírus poderiam chegar à boca de outro indivíduo e infectar tanto o trato intestinal como o respiratório de outro indivíduo. Não obstante, outros estudos e relatórios técnicos, como é o caso do relatório da WHO, mencionaram que esse tipo de transmissão é muitíssimo baixa (Langone et al., 2021a). De facto, diferentes estudos mostraram que o RNA do SARS CoV-2 está presente nas fezes de pacientes com COVID-19, independentemente da gravidade da doença (Cerrada-Romero et al., 2022) (Wu et al., 2020).

A literatura sobre o tema indica que a transmissão respiratória é o modo dominante de transmissão do SARS-CoV-2; a transmissão vertical ocorre muito raramente; alguns animais tais como gatos e furões podem ser infetados e transmitir entre si, mas não há casos relatados de transmissão para o humanos. Embora o vírus vivo tenha sido isolado da saliva e das fezes e o RNA viral tenha sido isolado do sêmen e de doações de sangue, não há casos relatados de transmissão de SARS-CoV-2 pelas vias fecal-oral,

sexual ou sanguínea (Meyerowitz et al., 2021). Segundo a Direção-Geral de Saúde (DGS), o SARS-CoV-2 transmite-se através de duas formas: i) contacto direto – mediante a disseminação de gotículas respiratórias produzidas quando por exemplo, uma pessoa infetada tosse, espirra ou fala, e podem ser inaladas ou pousar na boca, nariz ou olhos de pessoas que estão próximas (< 2 metros); ii) contacto indireto – mediante o contacto das mãos com uma superfície ou objeto contaminado com o vírus e que, em seguida, contactam com a boca, nariz ou olhos ou através de inalação de aerossóis contendo o vírus (Direção-Geral de Saúde, 2022).

A literatura disponível sobre as vias de disseminação e infecciosidade do SARS-CoV-2 em águas de recreio e efluentes urbanos investigada até o momento indica uma ampla disponibilidade de documentação sobre a disseminação, mas muito poucos estudos sobre a infecciosidade do SARS-CoV-2 em amostras de esgoto e águas residuais (Ryu et al., 1999; Kundu et al., 2013). Os estudos mostraram que o vírus consegue persistir nas águas, talvez por várias semanas. Devido à sua presença nas fezes, a via fecal-oral também pode ser um meio de transmissão (Vanchiere et al., 2005). A carga viral de SARS-CoV-2 nas fezes de indivíduos testados positivos foi relatada na faixa de 104-108 cópias/L, dependendo dos estados da infecção. Nas águas residuárias, a diluição das fezes resulta na diminuição da carga viral na faixa de 102-106,5 cópias/L (Saawarn & Hait, 2021). A Figura 9 apresenta uma imagem das possíveis rotas de transmissão oral-fecal do SARS-CoV-2.

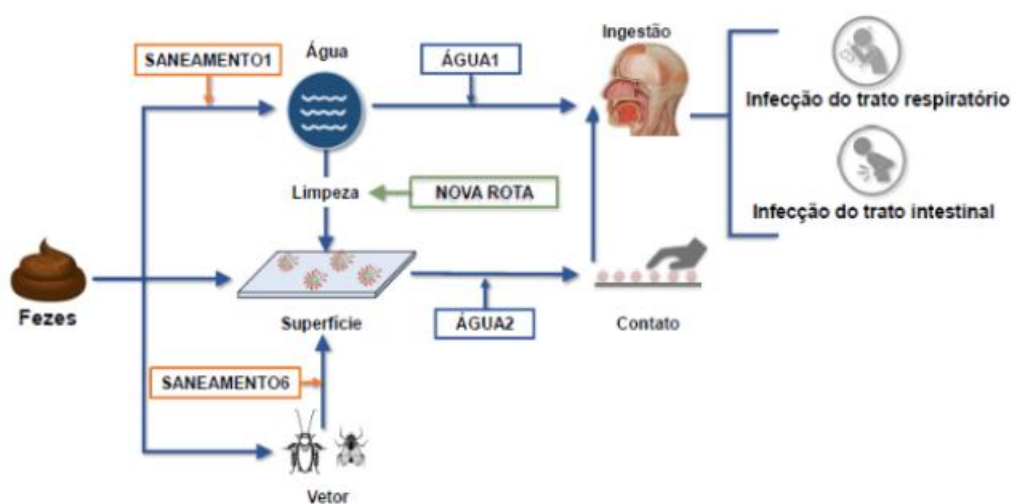


Figura 9: Possíveis rotas de transmissão oral-fecal do SARS-CoV-2. Das fezes, existem três rotas primordiais para o vírus: para a água, para superfícies ou para locais onde estão presentes insetos vetores.

A partir desses ambientes, por vias distintas, os vírus podem chegar à boca e infectar o sistema intestinal e o sistema respiratório de um hospedeiro suscetível. Retirado de (Heller et al., 2020)

Existem vários fatores que devem ser levados em consideração em relação à sobrevivência do SARS-CoV-2 na água como temperatura, exposição à radiação UV, matéria orgânica como bem como microorganismos (Veerababu et al., 2021). Estudos mostraram que o vírus pode sobreviver em águas residuais hospitalares, águas residuais domésticas e água da torneira por até 14 dias a 4 °C, mas a uma temperatura de 20 °C, sobrevive apenas 3 dias (Kitajima et al., 2020). Foi reportado que a sobrevivência do SARS-CoV-2 está dependente da temperatura, pelo que o risco nas águas residuais aumenta nos meses de inverno, uma vez que a temperatura, sendo mais baixa, permite uma sobrevivência viral mais longa (García-Ávila et al., 2020).

No estudo de Herazo et al. (2022), os resultados mostraram evidências suficientes de que o SARS-CoV-2 permanece vivo em águas residuais no México, tendo sido identificada uma associação, ainda que fraca, entre a percentagem de água tratada e a casos positivos de coronavírus. Os autores concluíram que, muito embora a probabilidade de contágio seja relativamente baixa, este fator pode constituir um risco para os trabalhadores das estações de tratamento de águas residuais, assim como para as pessoas que estão próximas a eles (Herazo et al., 2022). Também no estudo de Iglesias et al. (2021), foi observada uma elevada concentração de RNA do SARS-CoV-2 em águas contaminadas na Argentina, que foi associada ao aumento de casos positivos na região. À medida que os casos foram diminuindo, a concentração de RNA do vírus, também.

O estudo de Haramoto et al. (2020) foi o primeiro estudo que detetou o RNA do SARS-CoV-2 em águas residuais do Japão. Contudo, esse estudo não detetou a presença do vírus em águas fluviais (Haramoto et al., 2020). No estudo de Rimoldi et al. (2020), o SARS-CoV-2 foi detetado em águas residuais não tratadas, mas não em águas residuais de 3 rios na área metropolitana de Milão, Itália. O genoma do vírus isolado foi sequenciado e pertencia à cepa mais difundida na Europa e semelhante a outra encontrada na mesma região. A presença de RNA nas amostras de esgoto bruto diminuiu após oito dias, provavelmente seguindo a tendência epidemiológica estimada para a área. A infecciosidade do vírus foi sempre nula (Rimoldi et al., 2020a) Na pesquisa de Serra-Compte et al. (2021), por sua vez, o RNA do SARS-CoV-2 foi encontrado em 50,5% das 101 amostras de águas residuais influentes analisadas. Os resultados positivos foram detetados com mais frequência nas regiões com incidência de COVID-19 superior a 100 casos por 100.000 habitantes. O lodo não tratado apresentou maior ocorrência de RNA

do SARS-CoV-2 do que as amostras de água correspondentes, demonstrando a afinidade das partículas virais por sólidos (Serra-Compte et al., 2021). No estudo de Tandukar et al. (2022), o RNA do SARS-CoV-2 foi detectado em 50%, 54% e 100% das amostras de água de ETARs, hospitais fluviais e linhas de esgoto de um distrito no Nepal. Contudo, as concentrações de RNA SARS-CoV-2 não mostraram nenhuma associação significativa com o número de novos casos de COVID-19 em todo o distrito (Tandukar et al., 2022).

Numa revisão efetuada por Veerababu et al. (2021), são apresentadas várias pesquisas relativas aos anos sobre a transmissão de vírus por fontes secundárias em diferentes partes do mundo (Tabela 6). (Veerababu et al., 2021)

Tabela 6. Pesquisas sobre a transmissão do vírus por fontes secundárias em diferentes partes do mundo

Vírus	País	Exposição	Ano
<i>SARS</i>	Hong Kong	Cano de esgoto	2003
<i>Enterovírus</i>	Austrália	Esgotos não tratados	2008
<i>Cryptosporidium</i>	-	Água da tempestade	2009
<i>Rotavírus</i>	-	Água da tempestade	2009
<i>HCoV</i>	E.U.A.	Água da torneira	2009
<i>Vírus bovino</i>	Austrália	Rio	2010
<i>Adenovírus</i>	Japão	Águas residuais	2013
<i>Mastadenovírus</i>	-	Água da tempestade	2017
<i>SARS CoV-2</i>	Holanda	Águas residuais	2020
<i>SARS CoV-2</i>	E.U.A.	Águas residuais	2020
<i>SARS CoV-2</i>	Austrália	Águas residuais	2020

Fonte: Veerababu et al. (2021).

Não obstante, no relatório publicado pela *World Health Organization* “Vigilância de águas residuais de SARS-CoV-2”, é mencionado que o SARS-CoV-2, por ser um coronavírus, não é conhecido por ter uma rota de transmissão por água. Apesar de

fragmentos de SARS-CoV-2 terem sido encontrados em águas residuais, isso não diz nada sobre a infecciosidade dos resíduos. Ainda segundo os achados do relatório, existem duas vias principais de transmissão do SARS-CoV-2: gotículas no ar e partículas de aerossol e contacto físico. Apesar de as pessoas infectadas com SARS-CoV-2 expelirem fragmentos do vírus em seus resíduos corporais (como fezes, urina, saliva e escarro), não houve relatos de transmissão fecal-oral do vírus e, com base nas evidências disponíveis, não há indicação de que o SARS-CoV-2 seja transmissível em águas residuais. O SARS-CoV-2 é rapidamente inativado no fluido do trato gastrointestinal e é excretado principalmente num estado não infeccioso. Ademais, o SARSCoV-2 perde a infectividade quando exposto a condições ambientais, tornando-o menos viável em águas residuais (World Health Organization, n.d.).

Num estudo realizado por Cruz-Cruz et al. (2021) foi verificado que o vírus infeccioso do SARS-CoV-2 não é encontrado em águas residuais brutas ou tratadas, ou em águas de rios, por conseguinte, essa via de exposição não é significativa para a transmissão do novo coronavírus. (Cruz-Cruz et al., 2020).

Numa revisão recente efetuada por Sobsey (2022), não foram encontradas evidências de que as partículas de SARS-CoV-2 presentes nos resíduos fecais fossem infecciosas ou capazes de se espalhar. Sobsey relata que não apenas não há evidências documentadas da presença de partículas infecciosas de SARS-CoV-2 em águas e resíduos fecais ambientais, mas também não há evidências epidemiológicas de que água e águas residuais já contribuíram para casos humanos, grupos ou surtos de infecção, doença ou morte por COVID-19 (Sobsey, 2022). Os principais resultados do seu estudo foram os seguintes:

- Nenhum coronavírus do tipo 2 foi encontrado em resíduos fecais ou águas;
- Não existem evidências epidemiológicas de infecção, doença ou morte por COVID-19 por exposição a resíduos fecais ou águas ambientais;
- As avaliações de risco à saúde para COVID-19 por avaliação quantitativa de risco microbiano não são possíveis;
- Não há evidências de SARS-CoV-2 infeccioso em resíduos fecais e águas ou infecção, doença e morte por COVID-19 atribuíveis a esses meios de exposição.

Não obstante, e conforme referido por Langone et al. (2021), é necessário avançar ou continuar com algumas medidas para se avançar no conhecimento relacionado ao SARS-CoV-2, nomeadamente: o melhoramento e garantia de acesso à água potável e aos serviços de saneamento, sobretudo para as comunidades vulneráveis; a otimização dos

sistemas de distribuição de água e das infraestruturas de águas residuais, minimizando fugas nas condutas e descargas ilícitas; o melhoramento e otimização de métodos de detecção de SARS-CoV-2 (concentração, extração e purificação) de matrizes de amostras complexas, como águas residuais, biossólidos residuais e águas superficiais; gerir as estações de tratamento de água e esgoto para evitar possíveis riscos; continuar com as atividades de pesquisa sobre a viabilidade, infectividade e persistência do SARS-CoV-2 em fezes, urina, águas residuais não tratadas e lodo (Langone et al., 2021b).

4 Qualidade microbiológica da água

4.1. Técnicas de avaliação da qualidade da água

4.1.1. Análises Físico-química

As características físico-químicas da água têm grande influência na qualidade da água. As análises físico-químicas realizadas mais frequentemente na água são as seguintes: pH, condutividade elétrica e oxidabilidade (de Villiers et al., 2004; Vinjé, 2015).

O pH das águas superficiais varia entre 6,5 e 8,5 ao passo que o pH das águas subterrâneas varia, normalmente, entre 4,5 e 8,5, devido à variabilidade dos estratos rochosos (Boonham et al., 2014; Jiang, 2006). O pH pode ser considerado como uma das variáveis ambientais mais relevantes, sendo, igualmente, uma das mais difíceis de interpretar, devido a diversos fatores tais como aqueles associados a fontes de poluição difusa ou pontual (Akysana & Bueno, 2019).

A condutividade elétrica que depende da concentração de substâncias dissolvidas ionizadas, é definida como a capacidade que uma solução tem de conduzir a corrente elétrica (Villiers, 2004; Vinjé, 2015).

A oxidabilidade permite avaliar o teor de substâncias facilmente oxidáveis presentes na água. Este parâmetro representa o consumo de oxigénio gasto na oxidação da matéria orgânica e inorgânica na forma reduzida (Villiers, 2004; Vinjé, 2015).

4.1.2. Análises microbiológicas

A análise microbiológica da água é um método de análise da água para identificar o número de bactérias presentes e permitir a recuperação de microrganismos de modo a identificá-los (Sandle, 2016). Trata-se de um procedimento analítico microbiológico que usa amostras de água e, a partir das mesmas, determina a concentração de bactérias. Mediante essa concentração é possível efetuar inferências acerca da adequação da água. A análise microbiológica da água é realizada, por exemplo, para confirmar rotineiramente se a água é segura para consumo humano ou se as águas recreativas e balneares são seguras para uso (Hassan, 2018).

As descargas de águas residuais domésticas e industriais em águas balneares costeiras e interiores necessitam da monitorização de marcadores microbiológicos de contaminação fecal de forma a manter a qualidade destas águas para uso recreativo. Estas estratégias de monitorização baseiam-se, sobretudo, na interpretação de dados numéricos de análises periódicas da qualidade microbiológica das águas balneares, nem sempre fáceis de prever ou actuar a tempo de evitar que os banhistas entrem em contacto com águas contaminadas (Inal, 2003).

A presença de bactérias nas fezes, como coliformes fecais e *Enterococcus*, tem sido utilizada para detectar degradação microbiológica e prever a presença de germes patogênicos. Essas bactérias são encontradas em animais superiores e pássaros, e sua presença na água pode implicar em poluição fecal e associações de patógenos associados. Marcadores microbiológicos são frequentemente aplicados para mostrar se os patógenos estão presentes ou não (Abedon, 2008).

Apesar de crucial para o desenvolvimento e saúde humanos, a qualidade microbiológica da água é difícil de controlar, devido, sobretudo, à variedade de patogêneos presentes na água, à falta de métodos eficazes e aos custos analíticos e logísticos requeridos na identificação elevada de patogêneos (parasitas, bactérias e vírus). No entanto, a definição de microrganismos indicadores, índices e modelos, há mais de um século, permitiu que tais limitações fossem superadas ao garantir um controlo suficientemente adequado da qualidade da água (Toribio-Avedillo et al., 2021).

As descargas de efluentes da indústria doméstica nas águas balneares, tanto costeiras como interiores, obrigaram à monitorização de marcadores microbiológicos de contaminação fecal de forma a manter a qualidade destas mesmas águas para fins

recreativos. De acordo com o Decreto-Lei n.º 135/2009, de 3 de Junho, está agora a ser investigada e medida a presença de *enterococos intestinais* e *E. coli*. Os programas de monitorização são utilizados para avaliar anualmente a qualidade das águas balneares (Skurnik et al., 2007).

4.1.3. Análises virológicas

A análise virológica da água é necessária e justificada por várias razões, incluindo a) o estudo da incidência e comportamento viral em ambientes aquáticos, b) a avaliação da presença e risco de infeção, c) a avaliação da eficácia do tratamento viral e processos de desinfecção, e d) o monitoramento de parâmetros de rotina especificados em diretrizes e especificações legais (Skurnik & Strauch, 2006). Muitos vírus patogénicos são excretados em fezes humanas e urina, sendo a água um dos potenciais meios de transmissão destes agentes, constituindo riscos para a saúde pública (Silva et al., 2011). A análise virológica da água é igualmente importante para estudar o impacto na saúde pública de infeções virais transmitidas pela água e para a identificação de cepas isoladas da água como uma ferramenta para investigar a epidemiologia dessas infeções. Contudo, muitas vezes a identificação e a quantificação dos níveis de patogénicos virais na água passa por grandes desafios técnicos, sendo um desses desafios a dificuldade na deteção de vírus em fontes de água e à ocorrência do baixo número de partículas virais na água – o que acaba por tornar este processo mais complexo e caro que a identificação de bactérias (Ruhanya, 2016).

A deteção de vírus baseia-se principalmente em dois princípios: a deteção de vírus infecciosos por propagação em cultura de células ou a deteção do material genético por técnicas de biologia molecular, como PCR ou RT-PCR. A deteção por cultura de células mantém as células vivas e em multiplicação fora de seu tecido original sob condições controladas, e a quantificação dos vírus é realizada por ensaio de formação de placas (Skurnik & Strauch, 2006). No entanto, sistemas de cultura de células eficientes não estão disponíveis para todos os vírus e outros crescem lentamente ou não produzem um efeito citopático (Boonham et al., 2014). Atualmente, a identificação de vírus pode ser feita por sequenciamento de alto desempenho (Mathieu, 2019).

Na última década, os ensaios de PCR em tempo real revolucionaram a detecção de ácido nucleico pela rapidez, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e minimização de contaminação. Estes métodos são amplamente usados no campo da virologia alimentar e ambiental e estão em constante evolução (Ji et al., 2021).

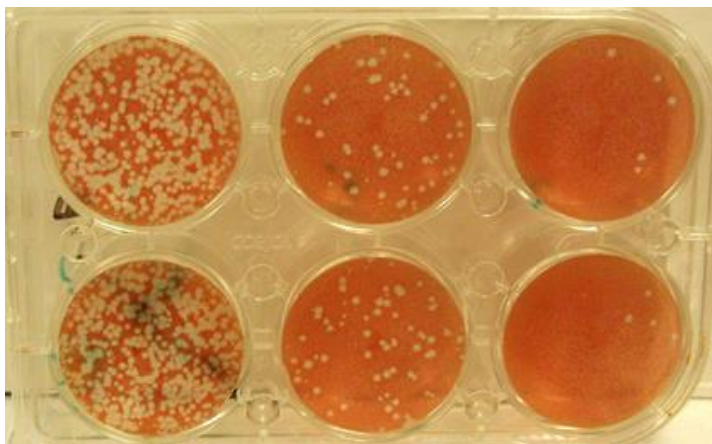


Figura 10: Exemplo de um teste de plaqueamento. Diluições seriadas de um vírus foram plaqueadas em culturas de células em unicamadas confluentes. As células são coradas por um período de tempo no qual um único vírus infecta a célula, produz partículas virais e infecta as células ao redor. As áreas brancas mostram áreas da cultura nas quais as células foram mortas. Cada “placa” é o resultado da presença de uma partícula viral original. Retirado de Ji et al. (2021).

O PCR permite a amplificação exponencial de um alvo a partir de um número muito reduzido do alvo, gerando milhares de cópias da sequência. Para esta técnica, são necessários *primers* (sequência de 18-25 nucleótidos de ADN que tem como função emparelhar o ADN), *Taq* polimerase (enzima que constrói a cadeia de ADN), tampão, nucleotídeos e ácido nucleico de interesse (Jofre et al., 2011).

A técnica consiste em três fases (Jończyk et al., 2011):

- **Desnaturação** – geralmente ocorre a 94/95 °C para separação da dupla cadeia de ADN;
- **Annealing** – Entre 50 a 65°C. Os *primers* marcam as extremidades da sequência alvo. Numa reacção de PCR são incluídos dois *primers*, um para cada cadeia simples de ADN que foi produzida durante o passo de desnaturação. O início da sequência de ADN alvo é marcada pelos *primers* que se hibridam com a sequência complementar.
- **Alongamento** - Após o *annealing*, a temperatura eleva-se a cerca de 72 °C e a enzima *Taq* polimerase estende a cadeia de ADN. A extensão inicia-

se sempre no extremo 3' do primer, criando uma cadeia dupla a partir de a partir de cada uma das cadeias simples. A Taq polimerase sintetiza exclusivamente na direcção 5' para 3'.

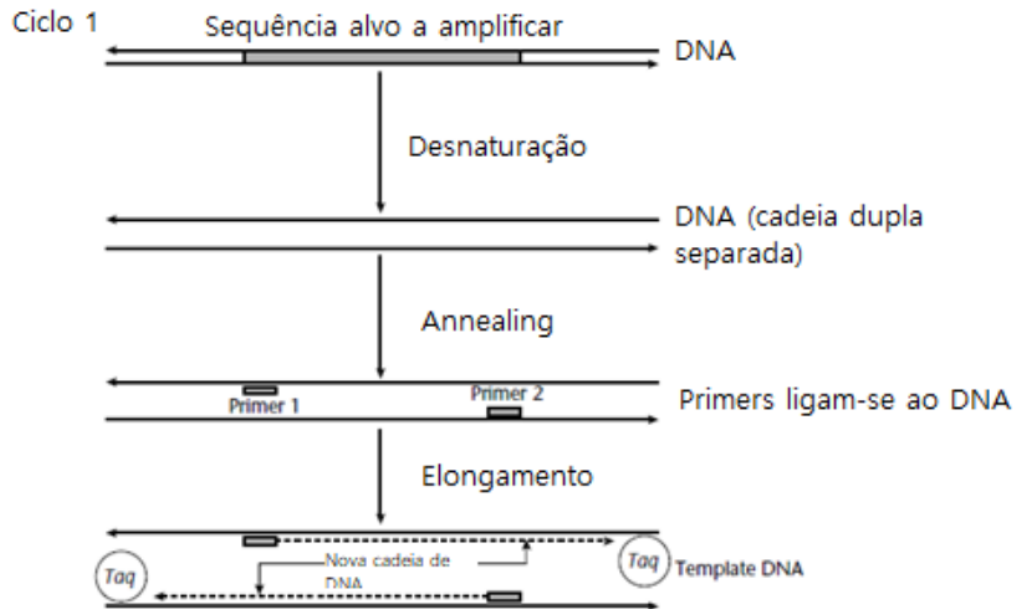


Figura 11: Fases do PCR. Adaptado de Jończyk et al. (2011).

Podemos destacar três características que podem ser utilizadas para avaliar a qualidade das sequências resultantes de uma reação de PCR: especificidade, eficiência e fidelidade. A especificidade é uma métrica para determinar se uma reação amplifica apenas a área alvo e não outras partes da molécula, o que pode resultar na amplificação de trechos indesejáveis. O primer empregado na reação, principalmente no concerne ao tamanho, tem um grande impacto. A eficiência trata do volume do produto em proporção ao tempo da reação do PCR. Se o produto amplificado for pequeno e os ciclos de PCR forem adequadamente regulados, a eficiência pode ser alta (Duran et al., 2002).

A PCR tem uma variedade de aplicações em Biotecnologia e Ciências Forenses, incluindo sequenciamento de genes e diagnóstico de doenças, bem como a identificação de material genético presente em quantidades pequenas em amostras sob investigação. É viável detectar e identificar material genético de vírus como HIV ou hepatite, por exemplo (Duran et al., 2002; Jończyk et al., 2011).

Uma das técnicas que evoluiu do PCR convencional foi RT-qPCR, transcrição reversa seguida de PCR quantitativo. Nesta técnica, o material de partida usado é o RNA. RNA é primeiro transcrito em DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa. O cDNA é então usado como modelo para a reação qPCR (BMJ Best Practise, 2020).

Uma das principais limitações da RT-qPCR, é sua incapacidade de diferenciar entre vírus infecciosos e não infecciosos. Várias abordagens para superar essa limitação foram avaliadas. Destes, os sistemas integrados baseados na detecção molecular de vírus após a infecção em cultura de células são as técnicas mais promissoras ICC-PCR (*integrated cell culture-PCR*) (Li et al., 2020). Outras alternativas, como um pré-tratamento com protease e RNase, foram usadas com sucesso para diferenciar entre vírus infecciosos e não infecciosos (Chu et al., 2020).

5 METODOLOGIA

5.2 Amostragem e processamento de colheitas

As amostragem foram realizadas entre 22 de setembro de 2021 a 8 de março de 2022; mais especificamente 22/09, 21/10, 23/11, 14/12 no ano 2020 e 08/03 do 2021. O programa de amostragem incluiu três estações ambientais na Ria Formosa (Ilha de Faro, Cais comercial de Faro e Cais de Olhão) bem como afluentes e efluentes de três Estações de Tratamento de Águas Residuais (Faro-Aeroporto, Olhão e Vilamoura); onde foram recolhidos 2L nas entradas e 5L nas saídas em todas as ETAR`s. Nas três amostras ambientais da Ria Formosa, Cais de Olhão e Cais de Faro, foram recolhidos um volume de 5L. As colheitas foram efectuadas sempre no mesmo ponto de recolha, tendo sido idealizadas para detectar a presença de SARS, nas amostras recolhidas, durante o surto pandémico na região do Algarve (Figura 12). As amostras depois de colhidas foram transportadas até 24h, devidamente refrigeradas, para o Laboratório (IST) onde foram processadas.

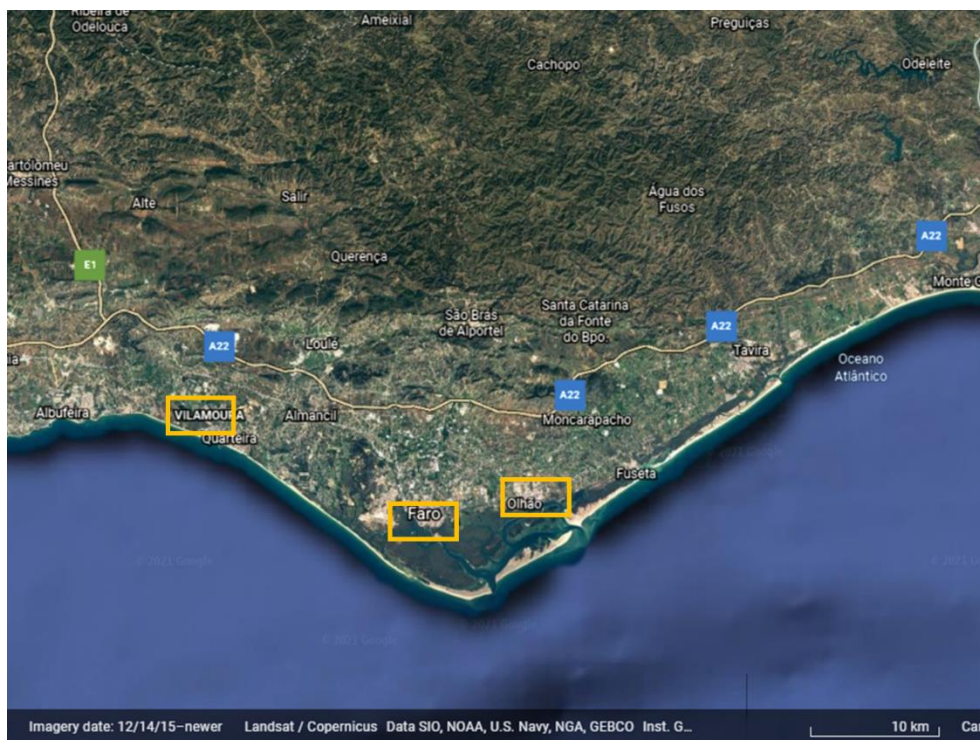


Figura 12. Ponto das colheitas nas estações ambientais ao longo da Ria Formosa.

5.3 Quantificação do número de bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) em amostras de água

Para a quantificação de FIB foi utilizado foi utilizado a técnica do Número Mais Provável (NMP; Colilert-18 e Enterolert) kits comerciais, validados para utilização em águas. Estes testes consistem na técnica do substrato definido, onde o substrato definido é utilizado como a única fonte de nutriente e apenas as bactérias com capacidade de degradarem o mesmo é que se desenvolvem. O grupo dos coliformes possuem a enzima β -D-galactosidase, que degrada o composto o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) presente no meio, dando origem a dois compostos diferentes, o β -D-galactopiranosídeo e o onitrofenol, que altera a cor do meio de incolor para amarelo (Novel e Novel 1976). *E. coli* tem a capacidade de clivar o composto metilumbeliferil- β -glucuronídeo (MUG), através da ação da enzima β -glucuronidase, resultando na formação do produto fluorescente 4-metilumbeliferona, que é detetado por luz U.V após incubação. Finalmente, o número de poços que apresentaram mudança para cor amarela e fluorescência sob luz UV foram considerados positivos para *E. coli* enquanto que para *Enterococos intestinais*, os poços fluorescentes sob luz UV foram considerados positivos.

No substrato indicado para a bactérias, foi adicionado 100mL de amostra directa ou diluída (neste caso foi usado o Collilert-18 para a detecção de *E. coli* e o Enterolert para IE). A amostra foi agitada até total dissolução do suplemento, colocada no Quanti - Tray e selada. As amostras *E. coli* foram incubadas durante 18-22 h a 37.0 (\pm 1.0) °C e Enterococos intestinais a 41.0 (\pm 0.5) °C.

Os poços positivos são contados e cruzados com a tabela de NMP (Número mais provável).



Figura 13. Quanti-Tray- Selado e pós incubação. Imagem do autor.

5.4 Detecção de Colifagos Somáticos

O método utilizado para a segue a ISO 10705-2:2000. Este método consiste no método de camada dupla. Baseia-se numa cultura do hospedeiro (*E. coli*) em meio de cultura líquido Modified Scholtens's Broth (MSB). Após o seu crescimento, o mesmo foi adicionado à amostra de água, filtrada através de membranas com baixa afinidade por proteínas. A esta suspensão foi adicionado meio Modified Scholtens' semi-sólido que foi vertido sobre uma placa de Petri já com meio Modified Scholtens' sólido. Após incubação a 36 (\pm 2) °C durante 18 (\pm 2) h, os halos de lise são contados.



Figura 14. Método de camada dupla para detecção de colifagos somáticos. Imagem do autor.

5.5 Determinação de SARS-CoV-2

A quantificação e detecção de SARS-CoV-2 foi efectuada em três fases:

- 1 – concentração da amostra (5.51.);
- 2 – extracção de RNA das amostras concentradas;
- 3 – quantificação por RT-qPCR.

5.5.1 Concentração de SARS-CoV-2 em águas residuais e águas ambientais

A concentração de SARS-CoV-2 a partir de águas foi efectuada utilizando o procedimento descrito por Calgua *et al.*, 2008. Sucintamente, as amostras de águas são acidificadas a pH 3.5, após o qual se adiciona leite em pó magro numa concentração final de 0.01%, previamente acidificado a pH 3.5. As amostras foram lentamente agitadas durante 8h, ficando de repouso durante a noite. Após este período, o sobrenadante foi retirado lentamente até a um volume final de 500 mL, seguido de centrifugação a 7000 xg durante 30 min a 12 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 0.2M de tampão fosfato (pH 7.5). As amostras foram conservadas a -80 (\pm 10) °C até subsequente processamento.

5.5.2 Extracção de RNA das amostras concentradas

RNA foi extraído recorrendo a um kit comercial, *Quick-RNA Fecal/Soil Microbe* Microprep kit (Zymo) de acordo com o procedimento do fabricante. Resumidamente, as

células foram lisadas através de um sistema de esferas, seguida da eliminação DNA, lavagem e eluição de RNA tudo efectuado através de um sistema de colunas. O volume inicial utilizado foi de 220 uL com concentração do extraído num volume final de 50 uL. As amostras extraídas foram conservadas a -80 (\pm 10) °C até subseqüente processamento.

5.5.3 RT-qPCR

A detecção e quantificação de SARS-CoV-2 foi efectuada recorrendo à técnica RT-qPCR, utilizando um *set* de três pares de *primers* e sondas descritas inicialmente por Corman *et al.*, 2020 (Tabela 1). A reacção de RT-qPCR foi efectuada utilizando o kit AgPath-ID One-Step RT-PCR num volume reacional final de 25 uL, composto por 12.5 uL de RT-PCR buffer, 1 uL de 25X RT-PCR Enzyme Mix, 800 nM de cada *primer*, 200 nM de sonda, 5 uL de amostra (e suas diluições) e o volume foi complementado a 25 uL utilizando água sem RNase e DNase. A reacção de RT-qPCR foi realizada num termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System com os seguintes passos: 45 °C durante 10 min, 95 °C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 s e 58 °C durante 1 min. Diluições de 1/4 e de 1/10 foram analisadas em paralelo com a respetiva amostra. Todas as reacções de RT-qPCR contém uma recta de calibração para cada gene e foi também acompanhada por um *non-template control* (NTC).

6 RESULTADOS

Todas as análises microbianas foram realizadas no LAIST em Lisboa no prazo de 24-48 horas após a colheita da amostra.

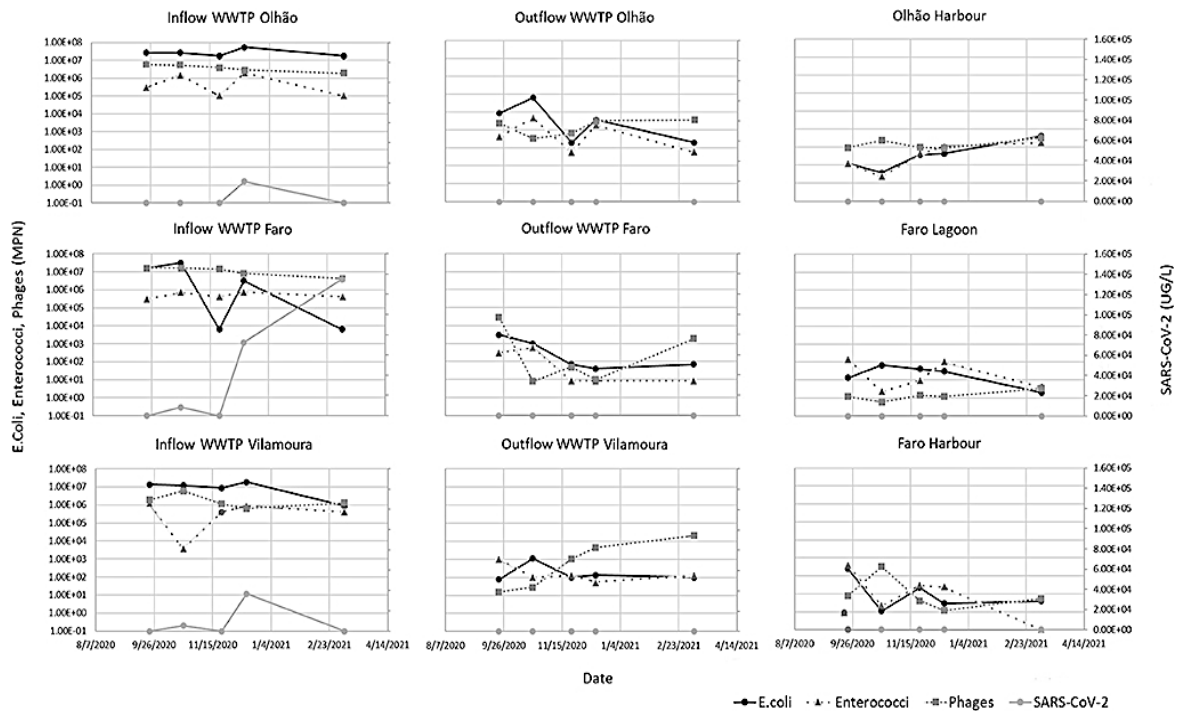


Figura 15- *Escheria coli*, *Enterococcus* (MPN por 100 mL), abundância de colifagos somáticos (Unidades Formadoras de Placas por 100 mL) e cópias genômicas SARS-CoV-2 ($\mu\text{g. L}^{-1}$) em 5 datas de amostragem (22/09, 21/10, 23/11 e 14/12 em 2020; 08/03 em 2021) em 3 estações da Ria Formosa (lagoa de Faro, porto/cais de Faro e porto/cais de Olhão) e 3 ETAR (entrada e saída) em Vilamoura, aeroporto de Faro e Olhão . Retirado de (Galvão et al., 2022).

Apesar da contaminação fecal relativamente elevada, determinada por indicadores como *E. coli*, *Enterococcus* e colifagos somáticos, o SARS-CoV-2 não foi detetado em águas superficiais nas três estações ambientais da Ria Formosa em todos os 5 datas de amostragem. Em águas ambientais, não houve correlação entre *E. coli* e *Enterococcus* (Pearson $r > 0,7$, $p > 0,1$) ou entre *E. coli* e colifagos (Pearson $r < 0,5$, $p > 0,05$). Enquanto em águas residuais não tratadas, *E. coli* e *Enterococcus* foram fracamente correlacionados ($r = 0,6$, $p < 0,001$), mas nenhuma correlação foi observada entre bactérias fecais e colifagos.

O SARS-CoV-2 foi detetado em águas residuais não tratadas, em várias datas, nomeadamente ETAR Faro-Aeroporto 21/10/2020, 14/12/2020, 08/03/2021; ETAR de Vilamoura 21/10/2020, 14/12/2020; e ETAR de Olhão 14/12/2020. No entanto, o efluente tratado (saída) permaneceu negativo. As concentrações virais mais altas foram observadas nas águas residuais não tratadas da ETA de Faro-Aeroporto em 8 de março

de 2021 (1,35 x 10⁵ unidades genômicas L⁻¹), coincidindo com o pico de casos positivos cumulativos de SARS-CoV-2 no Algarve (DGS, 2021, Galvão et al., 2022).

O fato de as contagens de carga viral terem aumentado e diminuído em pontos diferentes, sugere que acompanhar a pandemia por meio de análise das águas de recreio pode fornecer-nos informações mais detalhadas do que o número total de casos.

Todas as águas residuais tratadas foram negativas para SARS-CoV-2, assim como as amostras nas três estações ambientais na Ria Formosa. Isso mostra que os procedimentos de tratamento de águas residuais empregados em Algarve são eficazes na eliminação de RNA de SARS-CoV-2.

Embora este estudo tenha sido limitado a 5 campanhas de amostragem com um total de 15 amostras ambientais e 90 amostras de águas residuais (tanto brutas quanto tratadas), pode-se concluir que o potencial de contaminação do SARS-CoV-2 permaneceu muito baixo e talvez inexistente durante os picos de pandemia no sul de Portugal.

7 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objectivo avaliar os níveis de contaminação fecal das águas residuais com indicadores de contaminação fecal clássicos (*Escherichia coli* [*E. coli*] e *Enterococos intestinais* [IE]) e a eficiência de remoção nas estações de tratamento das ETAR's menos convencional (colifagos somáticos); bem como a possível detecção ou não de SARS-CoV-2.

A Ria Formosa é um sistema lagunar que apresenta uma grande diversidade e complexidade a nível estrutural, fornecendo serviços e benefícios significativos para toda a região. Não obstante, a presença de substâncias perigosas tem constituído um motivo de preocupação, dado que pode colocar em risco este sistema. Devido às atividades económicas envolvidas na área, registou-se um aumento da produção de resíduos que provocou pressões recorrentes no interior deste sistema lagunar. Estes resíduos chegam através de diferentes vias: transporte atmosférico, descarga fluvial, escoamento agrícola e ferroviário, efluentes domésticos e industriais, efluentes de criação animal e aquicultura, lixo marinho, etc. De referir que o sistema lagunar da Ria Formosa recebe a descarga de efluentes de 28 estações de tratamento de águas residuais domésticas e industriais

(ETAR), das quais doze são libertados diretamente para o interior deste sistema (Aníbal et al., 2021).

A Ria Formosa é uma lagoa mesotidal, e devido ao clima mediterrânico árido e à ausência de entradas de água doce significativas, a lagoa permanece hipersalina em relação às águas costeiras abertas ao longo do ano (> 37 ppt). Geralmente, coliformes fecais e outras bactérias alóctones derivadas da terra não sobrevivem por muito tempo na água do mar devido ao choque osmótico, regime oligotrófico e competição com bactérias marinhas autóctones (Cheng et al., 2020). No entanto, a sobrevivência de vírus patogénicos humanos em águas naturais tem sido menos estudada e permanece relativamente desconhecida.

Desde o seu aparecimento, a vigilância da pandemia de COVID-19 tem sido essencialmente realizada com base na epidemiologia clínica, dado que foi verificado que indivíduos saudáveis podem ser infetados diretamente pela inalação e contacto com a mucosa respiratória/aerossóis emitidos por indivíduos portadores do vírus. Não obstante, as matrizes contaminadas, incluindo superfícies, estruturas fixas, aparelhos médicos, alimentos, bebidas, etc, também têm sido apontados como tendo um papel fundamental nas rotas de transmissão indireta do SARS-CoV-2. Ademais, a deteção de SARS-CoV-2 em águas residuais como esgotos, por exemplo, tem levantado preocupações acerca da transmissão fecal-oral e da infeção através do sistema de ciclo urbano da água, sobretudo onde as águas residuais tratadas são utilizadas para consumo/utilização própria (Jmii et al., 2021).

A *E. coli*, por sua vez, faz parte das bactérias coliformes, um grupo de bactérias que podem ser encontrados no solo, nas águas naturais e residuais domésticas e no intestino do homem e de outros animais de sangue quente. De ressaltar que estas bactérias têm capacidade de sobreviver e se multiplicar na água, apesar de serem facilmente eliminadas da água por tratamento através da maioria dos processos de desinfecção química (e.g.: cloro, dióxido de carbono, ozono, etc.) e física (UV, ultrafiltração e filtração rápida). (APDA - Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas, 2012). De acordo com Candeias (2014), a pesquisa de bactérias coliformes constituem um indicador global de higiene, uma vez que inclui bactérias que vivem no solo e em águas superficiais, as quais não são exclusivamente de origem fecal. Não obstante, a presença destas bactérias, apesar de não constituírem prova de contaminação fecal, normalmente indicam deficiência no tratamento ou no manuseamento (Candeias, 2014).

A transmissão de infeções provocadas por a bactéria *E. coli* ocorre, principalmente, através do contacto direto com animais, com humanos e do consumo de alimentos contaminados. Por outra parte, a água de rega contaminada com esgotos humanos e os animais e os operadores infetados podem igualmente representar vias de contaminação de alimentos com *E. coli* (ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).

Os *Enterococos* são cocos gram-positivos onipresentes encontrados na água, solo e alimentos, fazendo parte da microbiota normal de humanos e de outros animais, onde geralmente residem nos tratos digestivo e genital.(González, 2010). Devido à sua onipresença nas fezes humanas e persistência no meio ambiente, os *Enterococos* foram adotados como indicadores de poluição fecal humana na água (Waideman et al., 2020).

Os colifagos são indicadores de contaminação da água com resíduos e, devido à sua maior persistência em relação às bactérias, são também indicadores da eficiência do tratamento de sistemas de água. (Veras, 2004).

O controlo da qualidade microbiológica da água implica análises destinadas a determinar a presença de microorganismos patogénicos. A alternativa para realizar um controlo confiável, económico e rápido da qualidade microbiológica da água é o uso de indicadores de contaminação fecal. Entre os indicadores de contaminação fecal mais utilizados estão a *E. coli* e os *Enterococos*. As bactérias indicadoras permitem a classificação sanitária da água para diferentes usos, a determinação de critérios para padrões de qualidade, a identificação de contaminantes, o controlo dos processos de tratamento de água e estudos epidemiológicos, etc.(Larrea-Murrell et al., 2013).

Os dados do presente mostraram contaminação fecal relativamente elevada, determinada por indicadores como *E. coli*, *Enterococos* e colifagos somáticos, nas três estações ambientais da Ria Formosa em todas as 5 datas de amostragem. Em águas ambientais, não houve correlação entre *E. coli* e *Enterococos* ou entre *E. coli* e colifagos. Enquanto em águas residuais não tratadas, *E. Coli* e *Enterococi* foram fracamente correlacionados, mas nenhuma correlação foi observada entre bactérias fecais e colifagos.

Estes dados vão de encontro aos de outros estudos semelhantes. Por exemplo, no estudo de Freire (2015) foi detetada a presença de 4 *E. coli* em dois fontanários, poços e minas do Norte de Portugal. Foi, assim, verificado que todos apresentavam elevada carga microbiana, especialmente um dos fontanários, dado que apresentaram quantidade de não coliformes >300 UFC/100 ml, sugestivo de contaminação ambiental (Freire, 2015). Também no estudo de dos Santos (2010), que teve como objetivo analisar a qualidade

microbiológica de sete linhas de água existentes no concelho de Vila Franca de Xira, que por sua vez afluem ao Rio Tejo e identificar fontes de contaminação fecal, os dados mostraram que existia uma elevada variabilidade de *E. coli* no concelho apesar de não se conseguir detectar as fontes de poluição orgânica (dos Santos, 2010). De igual forma, no estudo de Colet et al. (2021), 85% das amostras de 40 poços analisados apresentaram resultados positivos para coliformes totais e 22,5% foram identificadas como *E. coli*. Os dados desse estudo mostraram, ainda, que dos 8 antibióticos testados, apenas amoxicilina, ampicilina e nitrofurantoína apresentaram 100% de inibição do crescimento bacteriano (Colet et al., 2021).

A presença do SARS-CoV-2 nas águas residuais foi investigada, e os resultados revelam alta prevalência de contaminação viral na entrada das ETARs da Ria Formosa. Este sistema lagunar é constantemente afetado por pressões antrópicas, o que leva à degradação do estado ambiental e ecológico (Barcelo, 2020).

A prevalência de SARS-CoV-2 em amostras de afluentes de águas residuais é descrita em diversos trabalhos (Gregersen, 1978; Boehm & Soller, 2011; Mulani et al., 2019; Bivins et al., 2020; Cabral, 2010; Sousa et al., 2015; Hunt, 2021). Desde o aparecimento da pandemia de COVID-19, as águas residuais têm sido investigados como um meio de identificar a presença de vírus na comunidade, tanto na União Europeia como fora dela. A vigilância de águas residuais constitui uma ferramenta acessível e confiável para rastrear a presença do vírus, devendo ser utilizada em conjunto com as informações recolhidas sobre a prevalência do vírus de outras fontes, tais como testes de *swab* e exames de sangue. (Martins et al., 2022). O SARS-CoV-2 foi detetado em vários países, sendo o primeiro a Holanda. Também foi encontrado na Austrália, Estados Unidos, França e Itália em águas residuais brutas, tanto em áreas de alta circulação do vírus como em áreas de baixa circulação. Contudo, foi verificado que a concentração detetada foi superior nas águas não tratadas (brutas) em comparação com a águas residuais tratadas (Torrella, 2020).

Por outro lado, outros estudos não encontram a presença do vírus nestes locais. Analise-se o estudo de Galvão (2022) que teve como objetivo estimar a contaminação potencial por águas residuais e a persistência no ambiente marinho na Ria Formosa. Como tal, foram realizadas cinco campanhas de amostragem (45 amostras na totalidade), concluídas em 2020 e 2021 em três estações da lagoa, bem como em entradas e saídas de três estações de tratamento de águas residuais. Os resultados mostraram que, apesar da

contaminação fecal ser relativamente elevada na lagoa, não foi detetado o SARS-CoV-2 nas águas superficiais. (Galvão et al., 2022).

As concentrações virais mais elevadas observadas nas águas residuais não tratadas refletem o pico de prevalência de COVID-19 em Portugal, sobretudo em Faro no mês de março. A curva demonstra a detecção de SARS-CoV-2 antes do início do crescimento exponencial da epidemia, o que corrobora com outros estudos realizados (Monteiro et al. 2022) e Wurtzer et al. 2020 em águas residuais em Paris (Metzker & Caskey, 2009; Monteiro et al., 2022). Esse aspecto também foi confirmado por Randazzo et al. (2020) que observaram em estudo a circulação do SARS-CoV-2 em águas residuais antes mesmo que os primeiros casos fossem relatados pelas autoridades.

Em amostras de águas tratadas, os resultados revelaram nenhuma detecção de SARS-CoV-2, mostrando que os tratamentos de águas residuais podem remover o SARS-CoV-2 antes do lançamento em águas ambientais, diminuindo assim o risco potencial para a saúde humana. De facto, a literatura indica que os processos de tratamento padronizados são eficazes contra vírus encapsulados, incluindo o SARS-CoV-2. Cada etapa de tratamento no qual se combinam processos físicos, biológicos e químicos (e.g.: diluição, luz solar, oxidação, aumento dos níveis de pH e atividade biológica), resulta numa redução adicional do risco potencial de exposição e acelera a diminuição da carga de patógenos nas águas (Organización Mundial de la Salud, 2020). Não obstante, alguns estudos, como o de Souza et al. (2022) mostraram que o SARS-CoV-2 não é totalmente eliminado após o tratamento das águas (de Sousa et al., 2022).

Os dados obtidos no presente estudo são congruentes com os de Hasan et al., 2020 em que não foi detectado nestas águas a presença de SARS-CoV-2 (Sousa et al., 2015). Também no estudo de Rimoldi et al. (2020), os dados não mostraram nenhuma detecção do vírus em águas residuais tratadas. Contudo, as amostras de rios receptores (três locais, amostrados nas mesmas datas das águas residuais) mostraram em alguns casos uma positividade ao RT-PCR em tempo real, provavelmente devido a descargas não tratadas, ou tratadas de forma ineficiente, ou aos transbordamentos de esgoto combinados. Não obstante, também para os rios a infecciosidade foi nula (Rimoldi et al., 2020). De referir, ainda, o estudo de Nasser et al. (2021), que teve como objetivo de identificar a presença de RNA do SARS-CoV-2 em águas residuais brutas e tratadas durante o surto de COVID-19. Os dados não mostraram nenhuma detecção de SARS-CoV-2 em nenhuma das amostras – águas tratadas e águas não tratadas (Nasser et al., 2021).

Embora a sobrevivência de vírus patogênicos humanos tenha sido documentada em zonas costeiras de baixa salinidade no passado (Winter, 2005), o SARS-CoV-2 parece não ter capacidade de sobreviver (ou persistir) em áreas costeiras, bem como em estações de tratamento de água.

A detecção e a quantificação de SARS-CoV-2 em afluentes de águas residuais tem o potencial de tentar prever em antecipação como está a evoluir a situação da disseminação do vírus na população. Este estudo corrobora com os estudos elucidados até então na qual previram que o aumento considerável no número de casos diagnosticados de SARS-CoV-2 pode ser precedido por uma elevação da concentração de SARS-CoV-2 em águas residuais (Metzker & Caskey, 2009).

8 CONCLUSÕES

A presença de microorganismos patogênicos (bactérias, vírus, etc.) presentes nas águas residuais têm impacto nos humanos, animais e plantas. Nos humanos podem provocar uma série de consequências negativas para a saúde tais como gastroenterites, fadiga, pneumonia, entre muitas outras. Assim, a epidemiologia baseada em águas residuais constitui uma ferramenta que pode contribuir grandemente para a detecção de patogênicos, ajudando na tomada de decisões, precedentemente aos surtos epidemiológicos. Perante o exposto, e de acordo com o mencionado por Duarte (2022), é possível aferir que as águas residuais são extremamente importantes na criação de um sistema de alerta prévio que permita antever um surto, ainda antes de este ser comunicado.

Da análise da literatura foi possível perceber que as espécies de bactérias normalmente encontradas em águas contaminadas são *Enterococcus*, *Escherichia coli* e *Enterobacter*. Neste estudo, foram detetadas as duas primeiras. A bactéria *E. coli* faz parte do grupo de bactérias coliformes fecais e é um importante indicador microbiológico usado em estudos da qualidade da água. Os sintomas da infeção por *E. coli* no ser humano podem ir de leves (e.g.: cólica abdominal, diarreia, vômitos, perda de apetite) até graves (e.g.: infeção abdominal, pneumonia, bacteremia, etc.). Os *Enterococcus* são, igualmente, indicadores importante de contaminação fecal, sendo as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* as mais comuns e virulentas para o ser humano. Os *Enterococcus* são capazes de sobreviver a uma grande variedade de condições e ambientes e têm-se tornado bastante resistentes aos antibióticos. Além disso, a literatura mostrou que são mais resistentes às

práticas de tratamento de águas residuais. Os efeitos da contaminação por esta bactéria no humano inclui doenças de pele, ouvidos, olhos e sistema respiratório.

Tal como acontece com as bactérias, a presença de vírus na água representa um risco à saúde pública, sobretudo a presença de vírus entéricos, sendo estes considerados patogéneos transmitidos pela água. Assim, este tipo de vírus encontram-se entre os mais comuns e perigosos associados a infeções originadas na água. Os seus efeitos na saúde humana incluem patologias digestivas, hepatites, conjuntivites, doenças crónicas, entre outras. Cabe ressaltar que os vírus entéricos possuem cápsides robustas o que faz com que se mantenham infecciosos durante um período de tempo maior, ainda que em condições adversas.

Os colifagos somáticos constituem os melhores indicadores de poluição fecal. Por conseguinte, são utilizados em sistemas aquáticos para avaliação de risco para vírus entéricos humanos.

No presente estudo, os dados mostraram concentrações elevadas de contaminação fecal determinada por indicadores como *E. coli*, *Enterococos* e colifagos somáticos.

No caso do SARS-COV-2, a presença deste vírus nas águas constitui uma preocupação. O seu estudo permite serve para entender melhor a sua propagação e qual o papel que o ciclo urbano da água pode ter na transmissão deste vírus. Apesar de não haver consenso a nível empírico sobre transmissão fecal-oral do vírus entre humanos, acredita-se que esse tipo de transmissão possa ocorrer, já que vários estudos revelaram a deteção do SARS-COV-2 em efluentes domésticos e em fezes de pacientes.

O SARS-CoV-2 foi detectado em vários pontos de amostragem. Estes dados podem trazer informações importantes para um maior levantamento da circulação de SARS-CoV-2 na região do Algarve.

Embora a contaminação fecal tenha sido detectada em todos os pontos de amostragem, conforme determinado pelos três indicadores testados neste estudo, o SARS-CoV-2 não foi detectado em águas residuais tratadas e águas marinhas, mostrando que os tratamentos de águas residuais podem remover o SARS-CoV-2 antes do lançamento em águas ambientais, diminuindo assim o risco potencial para a saúde humana.

As concentrações virais mais altas foram observados nas águas residuais não tratadas de Faro-Aeroporto em 8 de março de 2021 ($1,35 \times 10^5$ unidades genômicas L⁻¹), coincidindo com o pico de casos positivos cumulativos de SARS-CoV-2 no Algarve.

Não havia dados suficientes neste estudo para verificar correlações significativas entre as variáveis.

No geral, este estudo mostrou o potencial de detectar o SARS-CoV-2 em águas residuais como uma ferramenta de alerta precoce e previsão para a propagação da doença; de acordo com os resultados de outras monitorizações nacionais de águas residuais (Monteiro et al., 2022). Tal como referido por Girón-Navarro et al. (2021), a monitorização desse vírus através da água é de extrema importância, uma vez que pode fornecer informação sobre a prevalência e a distribuição da pandemia de COVID-19 em diferentes comunidades, assim como potenciais dinâmicas de infeção para prevenir futuros surtos da doença.

Conclui-se, assim, que a avaliação microbiológica da água, uma vez que a qualidade da mesma é uma questão de saúde pública e de segurança para as pessoas, a qual deve ser garantida.

Bibliografia

- Abedon, S. (2008). Phages, ecology, evolution. In *Bacteriophage Ecology Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*. Cambridge University Press.
- Agência Portuguesa do Ambiente. (2012). *Plano de gestão das bacias hidrográficas que integram a região hidrográfica das ribeiras do Algarve (RH8)*. . Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente, e do Ordenamento do Território, Administração da Região Hidrográfica do Algarve.
- Ahmed, S. M., Hall, A. J., Robinson, A. E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U. D., Koopmans, M., & Lopman, B. A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 725–730. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4)
- Akysana, R., & Bueno, S. (2019). Análise físico-química e microbiológica de água potável em diferentes pontos de coleta da cidade de São José do Rio Preto - SP. *Revista Científica* , 1(1). <https://revistas.unilago.edu.br/index.php/revista-cientifica/article/view/176>
- ALS Environmental. (n.d.). *Bacteriophage in Water*. Retrieved December 21, 2022, from https://www.alsenvironmental.co.uk/media-uk/pdf/datasheets/micro-lp/als_micro_bp_v2_2016.pdf
- Anderson, K. F., Lonsway, D. R., Rasheed, J. K., Biddle, J., Jensen, B., McDougal, L. K., Carey, R. B., Thompson, A., Stocker, S., Limbago, B., & Patel, J. B. (2007). Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2723–2725. <https://doi.org/10.1128/JCM.00015-07>
- Angel, J., Franco, M. A., & Greenberg, H. B. (2007). Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nature Reviews Microbiology*, 5(7), 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1692>
- Aníbal, J., Gomes, A., Mendes, I., & Moura, D. (2021). *À descoberta da Ria Formosa* (1ª). Universidade do Algarve Editora . <https://doi.org/https://doi.org/10.34623/nd9p-3s41>
- Aparício, N. (2014). *Importância para a saúde pública da pesquisa de vírus em águas residuais e de consumo* [Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas]. Repositório Científico da UC. <http://hdl.handle.net/10316/79705>

- APDA - Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. (2012). *FT-MB-02 - BACTÉRIAS COLIFORMES*.
https://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041542-ft_mb_02__bacterias_coliformes.pdf
- ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (n.d.). *Escherichia coli*. Retrieved December 1, 2022, from <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/escherichia-coli.aspx>
- Ashbolt, N. J. (2004). Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, *198*(1–3), 229–238.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.01.030>
- Augustin, J.-C., Kooh, P., Mughini-Gras, L., Guillier, L., Thébault, A., Audiat-Perrin, F., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., & Sanaa, M. (2021). Risk factors for sporadic infections caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a systematic review and meta-analysis. *Microbial Risk Analysis*, *17*, 100117.
<https://doi.org/10.1016/j.mran.2020.100117>
- Àvila, L., Estupiñán, M., Caicedo, M., Calderón, M., & Rubiano, L. (2019). Diagnóstico de la calidad bacteriológica del agua del Humedal Córdoba, Bogotá. *NOVA*, *10*(31), 87–95.
- Barcelo, D. (2020). An environmental and health perspective for COVID-19 outbreak: Meteorology and air quality influence, sewage epidemiology indicator, hospitals disinfection, drug therapies and recommendations. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *8*(4), 104006. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104006>
- Barth, O. (2007). Contrastação Negativa . In *Cell Ultrastructure Viral Morphology and Morphogenesis*.
- Bivins, A., Greaves, J., Fischer, R., Yinda, K. C., Ahmed, W., Kitajima, M., Munster, V. J., & Bibby, K. (2020). Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater. *Environmental Science & Technology Letters*, *7*(12), 937–942.
<https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00730>
- BMJ Best Practise. (2020). “*Coronavirus disease 2019 (COVID-19)*.”
<https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000201#:~:text=Summary,China%20on%2031%20December%202019.>
- Boehm, A., & Sassoubre, L. (2014). Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug*

- Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.*
- Boehm, A., & Soller, J. (2011). Risks Associated with Recreational Waters: Pathogens and Fecal Indicators. In *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. Springer.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>
- Bosch, A., Sánchez, G., Abbaszadegan, M., Carducci, A., Guix, S., le Guyader, F. S., Netshikweta, R., Pintó, R. M., van der Poel, W. H. M., Rutjes, S., Sano, D., Taylor, M. B., van Zyl, W. B., Rodríguez-Lázaro, D., Kovač, K., & Sellwood, J. (2011). Analytical Methods for Virus Detection in Water and Food. *Food Analytical Methods*, 4(1), 4–12. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9161-5>
- Brennan, D. (2021, May 11). *What Are Enterococcal Infections?* <https://www.webmd.com/a-to-z-guides/what-are-enterococcal-infections>
- Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Epidemiology of Viral Infections. In *Fenner and White's Medical Virology* (pp. 185–203). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00013-8>
- Bush, L. (2020, September). *Considerações gerais sobre bactérias.* <https://www.msmanuals.com/pt-pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-considera%C3%A7%C3%B5es-gerais/considera%C3%A7%C3%B5es-gerais-sobre-bact%C3%A9rias>
- Bush, L. (2021). *Overview of Gram-Positive Bacteria.* <https://www.msmanuals.com/en-pt/home/infections/bacterial-infections-gram-positive-bacteria/overview-of-gram-positive-bacteria>
- Byappanahalli, M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R., & Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685–706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>
- Cabelli, V. (1983). *Health effects criteria for marine recreational waters*. Research Triangle Park: U.S. Environmental Protection Agency.
- CAC, C. A. C. (2003). *Risk profile for enterohemorrhagic E. coli including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef and*

- pork*. Codex Committee on Food Hygiene. Food and Agriculture Organization of the United Nations e World Health Organization.
- Cahill, N., & Morris, D. (2020). Recreational waters – A potential transmission route for SARS-CoV-2 to humans? *Science of The Total Environment*, 740, 140122. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140122>
- Callaway, E. (2012). E. coli strain linked to cancer in mice. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature.2012.11211>
- Candeias, G. (2014). *Qualidade microbiológica do gelo usado em estabelecimentos de restauração e de bebidas* [Dissertação de mestrado em Segurança Alimentar e Saúde Pública, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz]. Repositório Comum. <http://hdl.handle.net/10400.26/7866>
- Cerrada-Romero, C., Berastegui-Cabrera, J., Camacho-Martínez, P., Goikoetxea-Aguirre, J., Pérez-Palacios, P., Santibáñez, S., José Blanco-Vidal, M., Valiente, A., Alba, J., Rodríguez-Álvarez, R., Pascual, Á., Oteo, J. A., Miguel Cisneros, J., Pachón, J., Casas-Flecha, I., Cordero, E., Pozo, F., & Sánchez-Céspedes, J. (2022). Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19. *Scientific Reports*, 12(1), 7397. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11439-7>
- Chahal, C., van den Akker, B., Young, F., Franco, C., Blackbeard, J., & Monis, P. (2016). *Pathogen and Particle Associations in Wastewater* (pp. 63–119). <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.08.001>
- Chan, A. Y., Kim, H., & Bell, M. L. (2022). Higher incidence of novel coronavirus (COVID-19) cases in areas with combined sewer systems, heavy precipitation, and high percentages of impervious surfaces. *Science of The Total Environment*, 820, 153227. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153227>
- Cheepsattayakorn, A., & Cheepsattayakorn, R. (2020). Surface Viability of COVID-19. *MAR Pulmonology*, 1–3.
- Cheng, M. P., Papenburg, J., Desjardins, M., Kanjilal, S., Quach, C., Libman, M., Dittrich, S., & Yansouni, C. P. (2020). Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus 2. *Annals of Internal Medicine*, 172(11), 726–734. <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
- Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.-L., & Brüßow, H. (2004). Phage-Host Interaction: an Ecological Perspective. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3677–3686. <https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3677-3686.2004>

- Chowdhury, S. N., Rafa, N., Uddin, S. M. N., & Moniruzzaman Mollah, A. K. M. (2021). Investigating the presence of enteric bacteria and their antibiotic resistance in drinking water samples of slum households in port city Chattogram, Bangladesh. *Water Supply*, 21(1), 146–156. <https://doi.org/10.2166/ws.2020.275>
- Chu, D. K., Akl, E. A., Duda, S., Solo, K., Yaacoub, S., Schünemann, H. J., Chu, D. K., Akl, E. A., El-harakeh, A., Bognanni, A., Lotfi, T., Loeb, M., Hajizadeh, A., Bak, A., Izcovich, A., Cuello-Garcia, C. A., Chen, C., Harris, D. J., Borowiack, E., ... Schünemann, H. J. (2020). Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 395(10242), 1973–1987. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31142-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31142-9)
- Cohen, R., Paikin, S., Rokney, A., Rubin-Blum, M., & Astrahan, P. (2020). Multidrug-resistant enterobacteriaceae in coastal water: an emerging threat. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00826-2>
- Colet, C., Pieper, M., Kaufmann, J. V., Schwambach, K., & Pletsch, M. (2021). Qualidade microbiológica e perfil de sensibilidade a antimicrobianos em águas de poços artesianos em um município do noroeste do Rio Grande do Sul. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 26(4), 683–690. <https://doi.org/10.1590/s1413-415220200078>
- Conceição, N., da Silva, L. E. P., da Costa Darini, A. L., Pitondo-Silva, A., & de Oliveira, A. G. (2014). Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: pbp4 gene polymorphism and genetic diversity. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.018>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Cruz-Cruz, C., Rodríguez-Dozal, S., Cortez-Lugo, M., Ovilla-Muñoz, M., Carnalla-Cortés, M., Sánchez-Pájaro, A., & Schilman, A. (2020). Revisión rápida: monitoreo de la presencia e infectividad del virus SARS-CoV-2 y otros coronavirus en aguas residuales. *Salud Pública de México*, 63(1, ene-feb), 109–119. <https://doi.org/10.21149/11783>

- de Sousa, A. R. V., Silva, L. D. C., de Curcio, J. S., Delleon, H., Anunciação, C. E., Furlaneto, S. M. S. I., Neto, O. S., Fongaro, G., & Lacerda, E. de P. S. (2022). DETECÇÃO DE SARS-COV-2 EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS COMO FERRAMENTA DE PREDIÇÃO DE INFECTADOS DE UMA CAPITAL DA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 26, 102024. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.102024>
- de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>
- Deborah Chen, H., & Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* : unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.07.002>
- Denton, M. (2007). Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, S9–S22. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(07\)72174-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(07)72174-X)
- Dimmock, N., Easton, A., & Leppard, K. (2016). *Introduction to Modern Virology*. Wiley- Blackwell.
- Direção-Geral de Saúde. (2022, December 31). COVID-19. Doenças Infeciosas . [https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infeciosas/covid-19/#:~:text=O%20v%C3%ADrus%20que%20provoca%20a,est%C3%A3o%20pr%C3%B3ximas%20\(%3C%20%20metros\)](https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infeciosas/covid-19/#:~:text=O%20v%C3%ADrus%20que%20provoca%20a,est%C3%A3o%20pr%C3%B3ximas%20(%3C%20%20metros))
- dos Santos, A. (2010). *Variabilidade em Escherichia coli de águas poluídas de Vila Franca de Xira* [Dissertação de mestrado, Universidade de Aveiro]. Ria - Repositório Institucional. <http://hdl.handle.net/10773/8742>
- Duarte, R. (2022). *Implementação da metodologia para a deteção do vírus SARS-Cov-2 em amostras de águas residuais, por RT-PCR em tempo real* [Dissertação de mestrado em Bioquímica, Universidade de Évora]. Repositório Universidade de Évora. <http://hdl.handle.net/10174/32508>
- Duran, A. E., Muniesa, M., Mendez, X., Valero, F., Lucena, F., & Jofre, J. (2002). Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 338–347. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x>
- Edwards, P., & Ewing, w. (1972). *Identification of Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Co.,.

- Ericsson, C. D., Steffen, R., & Backer, H. (2002). Water Disinfection for International and Wilderness Travelers. *Clinical Infectious Diseases*, 34(3), 355–364. <https://doi.org/10.1086/324747>
- Falagas, M. E., Tansarli, G. S., Karageorgopoulos, D. E., & Vardakas, K. Z. (2014). Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1170–1175. <https://doi.org/10.3201/eid2007.121004>
- Feng, C., Li, J., Qin, D., Chen, L., Zhao, F., Chen, S., Hu, H., & Yu, C.-P. (2014). Characterization of Exoelectrogenic Bacteria Enterobacter Strains Isolated from a Microbial Fuel Cell Exposed to Copper Shock Load. *PLoS ONE*, 9(11), e113379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113379>
- Ferreira, W., & Sousa, J. (2000). *Microbiologia*,. Lidel.
- Fong, T.-T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 357–371. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005>
- Freire, T. (2015). *Águas não tratadas no Norte de Portugal Qualidade microbiológica e Resistência aos antibióticos* [Dissertação de mestrado em Controlo de Qualidade, FFUP - Faculdade de Farmácia]. Repositório Comum. <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/81111>
- Galvão, H. M., Mendes, P. J., Figueiredo, A., Santos, R., & Monteiro, S. (2022a). SARS-CoV-2 contamination potential in environmental and wastewaters in the Algarve region, Southern Portugal. *Frontiers in Water*, 4. <https://doi.org/10.3389/frwa.2022.1026768>
- Galvão, H. M., Mendes, P. J., Figueiredo, A., Santos, R., & Monteiro, S. (2022b). SARS-CoV-2 contamination potential in environmental and wastewaters in the Algarve region, Southern Portugal. *Frontiers in Water*, 4. <https://doi.org/10.3389/frwa.2022.1026768>
- García-Ávila, F., Valdiviezo-Gonzales, L., Cadme-Galabay, M., Gutiérrez-Ortega, H., Altamirano-Cárdenas, L., Arévalo, C. Z.-, & Flores del Pino, L. (2020). Considerations on water quality and the use of chlorine in times of SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic in the community. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 2, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2020.100049>

- Giacobbo, A., Rodrigues, M. A. S., Zoppas Ferreira, J., Bernardes, A. M., & de Pinho, M. N. (2021). A critical review on SARS-CoV-2 infectivity in water and wastewater. What do we know? *Science of The Total Environment*, 774, 145721. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145721>
- Gilgen, M., Germann, D., Lüthy, J., & Hübner, P. (1997). Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2–3), 189–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00075-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00075-5)
- González, L. (2010). Enterococos: actualización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(4), 507–515. <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v9n4/rhcm10410.pdf>
- Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 123–127. <https://doi.org/10.1007/BF00498806>
- Haramoto, E., Malla, B., Thakali, O., & Kitajima, M. (2020). First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan. *Science of The Total Environment*, 737, 140405. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140405>
- Hassan, B. (2018). *Bacteriological water analysis*. <https://doi.org/https://doi.org/10.13140/RG.2.2.14734.61767>
- Health Canada. (2011). *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document Enteric Viruses*. Minister of Health. https://publications.gc.ca/collections/collection_2012/sc-hc/H129-6-2011-eng.pdf
- Health Canada. (2021). *Guidelines for Canadian Recreational Water Quality: Indicators of Fecal Contamination*. <https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/programs/consultation-guidelines-recreational-water-quality-fecal-contamination/consultation-guidelines-recreational-water-quality-fecal-contamination-eng.pdf>
- Heller, L., Mota, C., & Greco, D. (2020, May 21). *Transmissão fecal-oral da COVID-19: Estamos fazendo as perguntas corretas?* <https://ondasbrasil.org/live-do-ondas-coronavirus-no-esgoto-a-pesquisa-epidemiologica-e-os-riscos-de-transmissao/>
- Herazo, M. S., Nani, G., Zurita, F., Nakase, C., Zamora, S., Herazo, L. C. S., & Betanzo-Torres, E. A. (2022). A Review of the Presence of SARS-CoV-2 in Wastewater: Transmission Risks in Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(14), 8354. <https://doi.org/10.3390/ijerph19148354>

- Hunt, M. (2021). Virologia - Capítulo dois. In *Virologia Básica: Replicação de um Vírus*. University of South Carolina School of Medicine.
- Hurst, C., & Reynolds, K. (2002). *Manual of environmental microbiology*. ASM Press.
- Inal, J. (2003). Phage Therapy: a Reappraisal of Bacteriophages as Antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51, 237–244.
- Ji, M., Liu, Z., Sun, K., Li, Z., Fan, X., & Li, Q. (2021a). Bacteriophages in water pollution control: Advantages and limitations. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 15(5), 84. <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1378-y>
- Ji, M., Liu, Z., Sun, K., Li, Z., Fan, X., & Li, Q. (2021b). Bacteriophages in water pollution control: Advantages and limitations. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 15(5), 84. <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1378-y>
- Jiang, S. (2006). Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A Critical Review. *Environment Science and Technology*, 40, 7132–7140.
- Jmii, H., Gharbi-Khelifi, H., Assaoudi, R., & Aouni, M. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in the sewerage system in Tunisia: a promising tool to confront COVID-19 pandemic. *Future Virology*, 16(11), 751–759. <https://doi.org/10.2217/fvl-2021-0050>
- Jofre, J., Stewart, J., & Grabow, W. (2011). *Phage Methods. Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*. Springer.
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
- Kamar, N. (2014). Hepatitis E virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 116–134.
- Kitajima, M., Ahmed, W., Bibby, K., Carducci, A., Gerba, C. P., Hamilton, K. A., Haramoto, E., & Rose, J. B. (2020). SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Science of The Total Environment*, 739, 139076. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>
- Koch, S., Hufnagel, M., & Huebner, J. (2004). Treatment and prevention of enterococcal infections – alternative and experimental approaches. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(9), 1519–1531. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.9.1519>
- Kovač, K., Gutiérrez-Aguirre, I., Banjac, M., Peterka, M., Poljšak-Prijatelj, M., Ravnikar, M., Mijovski, J. Z., Schultz, A. C., & Raspor, P. (2009). A novel method for concentrating hepatitis A virus and caliciviruses from bottled water. *Journal of*

- Virological Methods*, 162(1–2), 272–275.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.07.013>
- Kundu, A., McBride, G., & Wuertz, S. (2013). Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment. *Water Research*, 47(16), 6309–6325.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.002>
- la Rosa, G., Fratini, M., della Libera, S., Iaconelli, M., & Muscillo, M. (2012). Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanità*, 48(4), 397–406. https://doi.org/10.4415/ANN_12_04_07
- Langone, M., Petta, L., Cellamare, C. M., Ferraris, M., Guzzinati, R., Mattioli, D., & Sabia, G. (2021a). SARS-CoV-2 in water services: Presence and impacts. *Environmental Pollution*, 268, 115806.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115806>
- Langone, M., Petta, L., Cellamare, C. M., Ferraris, M., Guzzinati, R., Mattioli, D., & Sabia, G. (2021b). SARS-CoV-2 in water services: Presence and impacts. *Environmental Pollution*, 268, 115806.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115806>
- Larrea-Murrell, J., Rojas-Badía, M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernández, N., & Heydrich-Pérez, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(3), 24–34.
<https://www.redalyc.org/pdf/1812/181229302004.pdf>
- Laupland, K. B., Gregson, D. B., Church, D. L., Ross, T., & Pitout, J. D. D. (2008). Incidence, risk factors and outcomes of Escherichia coli bloodstream infections in a large Canadian region. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(11), 1041–1047.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02089.x>
- Lavanchy, D. (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(2), 107–115. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03432.x>
- Li, G., Fan, Y., Lai, Y., Han, T., Li, Z., Zhou, P., Pan, P., Wang, W., Hu, D., Liu, X., Zhang, Q., & Wu, J. (2020). Coronavirus infections and immune responses. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 424–432. <https://doi.org/10.1002/jmv.25685>

- Lodder, W., & de Roda Husman, A. M. (2020). SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 5(6), 533–534. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30087-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30087-X)
- Martins, R. M., Carvalho, T., Bittar, C., Quevedo, D. M., Miceli, R. N., Nogueira, M. L., Ferreira, H. L., Costa, P. I., Araújo, J. P., Spilki, F. R., Rahal, P., & Calmon, M. F. (2022). Long-Term Wastewater Surveillance for SARS-CoV-2: One-Year Study in Brazil. *Viruses*, 14(11), 2333. <https://doi.org/10.3390/v14112333>
- Mathieu, J. (2019). Going viral: Emerging opportunities for phage-based bacterial control in water treatment and reuse. *Accounts of Chemical Research*, 52(4), 849–857.
- Meng, J., Doyle, M., & Zhao, T. (2007). Enterohemorrhagic Escherichia coli. In *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 249-269.). American Society for Microbiology,.
- Messacar, K., Modlin, J., & Abzug, M. (2017). Enteroviruses and Parechoviruses. In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Elsevier Saunders.
- Metzker, M., & Caskey, C. (2009). Polymerase chain reaction (PCR). In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*.
- Meyerowitz, E. A., Richterman, A., Gandhi, R. T., & Sax, P. E. (2021). Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Annals of Internal Medicine*, 174(1), 69–79. <https://doi.org/10.7326/M20-5008>
- Mocé-Llivina, L., Lucena, F., & Jofre, J. (2005). Enteroviruses and Bacteriophages in Bathing Waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6838–6844. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6838-6844.2005>
- Monteiro, S., Rente, D., Cunha, M. v., Gomes, M. C., Marques, T. A., Lourenço, A. B., Cardoso, E., Álvaro, P., Silva, M., Coelho, N., Vilaça, J., Meireles, F., Brôco, N., Carvalho, M., & Santos, R. (2022). A wastewater-based epidemiology tool for COVID-19 surveillance in Portugal. *Science of The Total Environment*, 804, 150264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150264>
- Moss, S. F. (2017). The Clinical Evidence Linking Helicobacter pylori to Gastric Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 3(2), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.12.001>
- Mueller, M., & Tainter, C. (2022). *Escherichia Coli*. StatPearls Publishing.
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial

- Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
- Nasseri, S., Yavarian, J., Baghani, A. N., Azad, T. M., Nejati, A., Nabizadeh, R., Hadi, M., Jandaghi, N. Z. S., Vakili, B., Vaghefi, S. K. A., Baghban, M., Yousefi, S., Nazmara, S., & Alimohammadi, M. (2021). The presence of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in 3 cities of Iran: Tehran, Qom and Anzali during coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19(1), 573–584. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00629-6>
- Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Mühldorfer, K., Sauer, S., Grossart, H.-P., & Greenwood, A. D. (2019). Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. *Scientific Reports*, 9(1), 9673. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46015-z>
- Odonkor, S. T., & Ampofo, J. K. (2013). Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.4081/mr.2013.e2>
- Oliveira, J., & Reygaert, W. (2022). *Gram Negative Bacteria*. StatPearls Publishing.
- Oliver, D. M., van Niekerk, M., Kay, D., Heathwaite, A. L., Porter, J., Fleming, L. E., Kinzelman, J. L., Connolly, E., Cummins, A., McPhail, C., Rahman, A., Thairs, T., de Roda Husman, A. M., Hanley, N. D., Dunhill, I., Globevnik, L., Harwood, V. J., Hodgson, C. J., Lees, D. N., ... Quilliam, R. S. (2014). Opportunities and limitations of molecular methods for quantifying microbial compliance parameters in EU bathing waters. *Environment International*, 64, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.016>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Agua, saneamiento, higiene y gestión de desechos en relación con el SARS-CoV-2, el virus causante de la COVID-19: orientaciones provisionales*. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/333807/WHO-2019-nCoV-IPC_WASH-2020.4-spa.pdf
- Pandey, P. K., Kass, P. H., Soupir, M. L., Biswas, S., & Singh, V. P. (2014). Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express*, 4(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0051-x>

- Peláez-Carvajal, D., Guzmán, D., Rodríguez, J., Acero, F., & Nava, G. (2016). Presence of enteric viruses in water samples for consumption in Colombia: Challenges for supply systems. *Biomédica-Revista Del Instituto Nacional de Salud*, *36*(2), 169–178.
- Pietrangelo, A. (2021, December 23). *Everything You Need to Know About E. Coli Infection*. <https://www.healthline.com/health/e-coli-infection>
- Pinon, A., & Vialette, M. (2018). Survival of Viruses in Water. *Intervirolgy*, *61*(5), 214–222. <https://doi.org/10.1159/000484899>
- Rajtar, B., Majek, M., Polanski, L., & Polz-Dacewicz, M. (2009). Enteroviruses in water environment - A potential threat to public health. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, *15*(2), 199–203.
- Ramírez-Castillo, F., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F., Harel, J., & Guerrero-Barrera, A. (2015). Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*, *4*(2), 307–334. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020307>
- Ramos, E., Kelmer, G., & Dias, E. (2022). Colifagos como indicadores virais: Comparação entre métodos padronizados de enumeração. *Principia*, *22*. <https://doi.org/https://doi.org/10.34019/2179-3700.2022.v22.37846>
- Rimoldi, S. G., Stefani, F., Gigantiello, A., Polesello, S., Comandatore, F., Mileto, D., Maresca, M., Longobardi, C., Mancon, A., Romeri, F., Pagani, C., Cappelli, F., Roscioli, C., Moja, L., Gismondo, M. R., & Salerno, F. (2020a). Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *Science of The Total Environment*, *744*, 140911. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140911>
- Rimoldi, S. G., Stefani, F., Gigantiello, A., Polesello, S., Comandatore, F., Mileto, D., Maresca, M., Longobardi, C., Mancon, A., Romeri, F., Pagani, C., Cappelli, F., Roscioli, C., Moja, L., Gismondo, M. R., & Salerno, F. (2020b). Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers. *Science of The Total Environment*, *744*, 140911. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140911>
- Ross, T., Ratkowsky, D. A., Mellefont, L. A., & McMeekin, T. A. (2003). Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of Escherichia coli. *International Journal of Food Microbiology*, *82*(1), 33–43. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00252-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00252-0)
- Roveri, V., & Muniz, C. (2016). Contaminação microbiológica por Escherichia Coli: estudo, preliminar, no canal de drenagem urbana da av. Lourival Verdeiro do Amaral – São Vicente/SP. *Revista Eletrônica de Divulgação Científica Da Faculdade Don*

- Ruhanya, V. (2016). Adsorption-Elution Techniques and Molecular Detection of Enteric Viruses from Water. *Journal of Human Virology & Retrovirology*, 3(6). <https://doi.org/10.15406/jhvr.2016.03.00112>
- Russell, D., & Walling, J. (2007). Waterborne pathogens in urban watersheds. *Journal of Water and Health*, 5(1), 149–162.
- Ryu, J.-H., Deng, Y., & Beuchat, L. R. (1999). Behavior of Acid-Adapted and Unadapted *Escherichia coli* O157:H7 When Exposed to Reduced pH Achieved with Various Organic Acids. *Journal of Food Protection*, 62(5), 451–455. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.5.451>
- Saawarn, B., & Hait, S. (2021). Occurrence, fate and removal of SARS-CoV-2 in wastewater: Current knowledge and future perspectives. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104870. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104870>
- Said, M., & Tirthani, E. (2022). *Enterococcus Infections*. StatPearls Publishing.
- Salvador, D., Caeiro, M. F., Aguilar, J., Benoliel, M. J., & Neto, C. (2020). Detecção de vírus entéricos em amostras de água natural superficial e de água para consumo humano. *Águas e Resíduos*, 7, 5–14. <https://doi.org/10.22181/aer.2020.0701>
- Sandle, T. (2016). Microbiology laboratory techniques. In *Pharmaceutical Microbiology* (pp. 63–80). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100022-9.00006-2>
- Santos, N., & Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*, 15(1), 29–56. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
- Schwab, K. J., de Leon, R., & Sobsey, M. D. (1993). Development of PCR Methods for Enteric Virus Detection in Water. *Water Science and Technology*, 27(3–4), 211–218. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0348>
- Semedo, T., Santos, M. A., Lopes, M. F., Marques, J. J. F., Crespo, M. T., & Tenreiro, R. (2003). Virulence Factors in Food, Clinical and Reference Enterococci: A Common Trait in the Genus? *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), 13–22. <https://doi.org/10.1078/072320203322337263>
- Semedo-Lemsaddek, T., Tenreiro, R., Alves, P., & Barreto-Crespo, M. (2011). Enterococcus. In *Molecular detection of human bacterial pathogens* (pp. 231–248). CRC Press,.

- Serra-Compte, A., González, S., Arnaldos, M., Berlendis, S., Courtois, S., Loret, J. F., Schlosser, O., Yáñez, A. M., Soria-Soria, E., Fittipaldi, M., Saucedo, G., Pinar-Méndez, A., Paraira, M., Galofré, B., Lema, J. M., Balboa, S., Mauricio-Iglesias, M., Bosch, A., Pintó, R. M., ... Litrico, X. (2021). Elimination of SARS-CoV-2 along wastewater and sludge treatment processes. *Water Research*, 202, 117435. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117435>
- Siddiqui, R., Khamis, M., Ibrahim, T., & Khan, N. A. (2020). Irrigation System and COVID-19 Recurrence: A Potential Risk Factor in the Transmission of SARS-CoV-2. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(19), 2903–2905. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00570>
- Silva, H., Anunciação, C., Santos, S., & García-Zapata, M. (2011). Análise virológica da qualidade da água: uma revisão das metodologias de concentração e detecção viral. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(3), 405–415. <https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/17794/5/Artigo%20-%20Hugo%20Delleon%20da%20Silva%20-%20202011.pdf>
- Singh, S., Pitchers, R., & Hassard, F. (2022). Coliphages as viral indicators of sanitary significance for drinking water. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.941532>
- Singhal, T. (2020). A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *The Indian Journal of Pediatrics*, 87(4), 281–286. <https://doi.org/10.1007/s12098-020-03263-6>
- Sizar, O., & Unakal, C. (2022). *Gram Positive Bacteria*. StatPearls Publishing.
- Skurnik, M., Pajunen, M., & Kiljunen, S. (2007). Biotechnological challenges of phage therapy. In *Biotechnol Lett* (Vol. 29, pp. 995–1003).
- Skurnik, M., & Strauch, E. (2006). Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(1), 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.09.002>
- Sobsey, M. D. (2022). Absence of virological and epidemiological evidence that SARS-CoV-2 poses COVID-19 risks from environmental fecal waste, wastewater and water exposures. *Journal of Water and Health*, 20(1), 126–138. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.182>
- Sørensen, T. L., Blom, M., Monnet, D. L., Frimodt-Møller, N., Poulsen, R. L., & Espersen, F. (2001). Transient Intestinal Carriage after Ingestion of Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecium* from Chicken and Pork. *New England Journal of Medicine*, 345(16), 1161–1166. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010692>

- Soule, H., Genoulaz, O., Gratacap-Cavallier, B., Chevallier, P., Liu, J., & Seigneurin, J. (2000). *Water Res* (Vol. 34, Issue 1063).
- Sousa, A., Taveira, M., & Silva, L. (2015). Groundwater from private drinking water wells: Imminent public health issue. *Water Resources*, 42(4), 517–524. <https://doi.org/10.1134/S0097807815040144>
- Stanley, W. (1938). The Reproduction of Virus Proteins. *The American Naturalist*, 72(739), 110–123.
- Stevenson, A. H. (1953). Studies of Bathing Water Quality and Health. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 43(5_Pt_1), 529–538. https://doi.org/10.2105/AJPH.43.5_Pt_1.529
- Su, C. (1995). Escherichia coli O157: H7 Infection in Humans. *Annals of Internal Medicine*, 123(9), 698. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-123-9-199511010-00009>
- Tandukar, S., Sthapit, N., Thakali, O., Malla, B., Sherchan, S. P., Shakya, B. M., Shrestha, L. P., Sherchand, J. B., Joshi, D. R., Lama, B., & Haramoto, E. (2022). Detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater, river water, and hospital wastewater of Nepal. *Science of The Total Environment*, 824, 153816. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153816>
- Toribio-Avedillo, D., Blanch, A. R., Muniesa, M., & Rodríguez-Rubio, L. (2021). Bacteriophages as Fecal Pollution Indicators. *Viruses*, 13(6), 1089. <https://doi.org/10.3390/v13061089>
- Torrella, S. (2020). COVID-19 y aguas residuales. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 72(3), 1–15. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000300013
- Vanchiere, J. A., Nicome, R. K., Greer, J. M., Demmler, G. J., & Butel, J. S. (2005). Frequent Detection of Polyomaviruses in Stool Samples from Hospitalized Children. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(4), 658–664. <https://doi.org/10.1086/432076>
- Veerababu, P., Banajarani, P., & Singh, D. (2021). SARS-CoV-2 Transmission Route in Wastewater and Possible Solutions. *International Journal of Civil, Environmental and Agricultural Engineering*, 1–9.
- Veiga, G. (2006). *Análises físico-químicas e microbiológicas de água de poços de diferentes cidades da região sul de Santa catarina e efluentes líquidos industriais de algumas empresas da grande Florianópolis* [Dissertação de mestrado em Química ,

- Universidade Federal de Santa Catarina]. Repositório Institucional UFSC.
<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/105056>
- Veras, R. (2004). *Desarrollo y validacion de una prueba de facil aplicación para determinación de enterococo en agua de consumo humano* [Dissertação de mestrado em Química, Universidad de San Carlos de Guatemala].
http://www.biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2252.pdf
- Vinje, J. (2015). Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), 373–381.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01535-14>
- Waideman, M. A., Teixeira, V. P., Uemura, E. H., Stamford, T. M., Leal, D. A. G., Stangarlin-Fiori, L., Ferreira, S. M. R., Taconeli, C. A., & Beux, M. R. (2020). Enterococci used as complementary indicator of fecal contamination to assess water quality from public schools in the city of Curitiba, Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 23. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.15519>
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578–6583.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578>
- Winter, P. (2005). Polymerase Chain Reaction (PCR). In *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*.
- Wong, C. S., Mooney, J. C., Brandt, J. R., Staples, A. O., Jelacic, S., Boster, D. R., Watkins, S. L., & Tarr, P. I. (2012). Risk Factors for the Hemolytic Uremic Syndrome in Children Infected With Escherichia coli O157:H7: A Multivariable Analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 55(1), 33–41.
<https://doi.org/10.1093/cid/cis299>
- World Health Organization. (n.d.). *Wastewater surveillance of SARS-CoV-2*. Retrieved November 19, 2022, from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/353058/WHO-EURO-2022-5274-45038-64164-eng.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- World Health Organization. (2017). *Global Hepatitis Report*.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565455>
- World Health Organization. (2018). *E. coli*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., Yin, H., Xiao, Q., Tang, Y., Qu, X., Kuang, L., Fang, X., Mishra, N., Lu, J., Shan, H., Jiang, G., & Huang, X. (2020).

Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 5(5), 434–435. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)

Xie, Y., Qiu, N., & Wang, G. (2017). Toward a better guard of coastal water safety—Microbial distribution in coastal water and their facile detection. *Marine Pollution Bulletin*, 118(1–2), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.029>