



_Deteção de vírus entéricos por real-time RT-qPCR em águas superficiais, subterrâneas, de consumo e águas residuais

Real-time RT-qPCR detection of enteric viruses in superficial, underground, drinking waters and wastewater sources

Pedro Teixeira, Filipa Costa Ferreira, Raquel Rodrigues, Elisabete Valério

elisabete.valerio@insa.min-saude.pt

Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A água é essencial à vida, e por isso torna-se absolutamente necessário protegê-la e assegurar a sua disponibilidade e qualidade para os diversos fins a que se destina. De uma perspetiva microbiológica, a avaliação e monitorização da qualidade da água são usualmente efetuadas recorrendo a bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) como *Escherichia coli* ou *Enterococcus* spp., atuando como potenciais indicadores da presença de agentes patogénicos. No entanto, a ocorrência destes indicadores nem sempre se correlaciona com a presença de agentes patogénicos. Por esta razão, e considerando a importância do uso sustentável dos recursos hídricos, as atuais normas e legislação necessitam de uma revisão que garanta a salvaguarda da saúde pública, em particular no contexto de utilização de água residual tratada. Neste estudo foi desenvolvida uma metodologia para a preparação de amostras e extração de RNA para a pesquisa e quantificação de vírus entéricos - norovírus (NoV) genogrupos I (GI) e II (GII) e vírus da Hepatite A, através de RT-PCR quantitativo em tempo real, além de terem sido avaliados alguns dos tradicionais indicadores microbiológicos. Foram colhidas e analisadas amostras de água naturais (superficiais e subterrâneas) e de consumo; e águas residuais em três fases distintas de tratamento – afluente bruto não tratado, efluente com tratamento secundário por lamas ativadas e efluente sujeito a tratamento terciário por filtração com areias e exposição a radiação ultravioleta (UV). O trabalho desenvolvido permitiu detetar e quantificar os vírus entéricos em estudo e ainda demonstrar que a ausência de FIB não implica a ausência de microrganismos patogénicos, nomeadamente NoV GI e GII em águas residuais sujeitas a tratamento terciário nas ETAR. Os resultados obtidos indicam assim que podem persistir riscos para a saúde pública na utilização de águas residuais tratadas, mesmo com tratamento terciário como a utilização de UV.

_Abstract

*Water is essential for life. It is therefore mandatory to protect it and to ensure its availability and quality for its different purposes. From a microbiological perspective, water quality assessment and monitoring are usually carried out using fecal contamination indicator bacteria (FIB) such as *Escherichia coli* or *Enterococcus* spp., acting as indicators for pathogen presence. However, the occurrence of these indicators is not always correlated with the presence of pathogens. For this reason and considering the importance of the sustainable use of water resources, current norms and legislation need to be revised to ensure*

the safeguard of public health, particularly in the context of the use of treated wastewater. In this study, a methodology was developed for sample preparation and RNA extraction for the search and quantification of enteric viruses – Norovirus (NoV) genogroups I (GI) and II (GII) and Hepatitis A virus, using real-time quantitative RT-PCR, in addition to evaluating some of the traditional microbiological indicators. Samples of natural and drinking waters were collected and analyzed; and also, wastewater at three different treatment stages – raw untreated influent, effluent with secondary treatment by activated sludge and effluent subjected to tertiary treatment by sand filtration and ultraviolet radiation (UV) exposure. The work developed allowed to detect and quantify the enteric viruses under study and to demonstrate that the absence of FIB does not imply the absence of pathogenic microorganisms, namely NoV GI and GII in wastewater subjected to tertiary treatment in the WWTP. The results obtained thus indicate that risks to public health may persist with the use of treated wastewater, even with tertiary treatment such as the use of UV.

_Introdução

A presença de microrganismos patogénicos nas águas ambientais pode ter origem, por exemplo, em esgotos sem qualquer tipo de tratamento ou resultar de um tratamento ineficiente das águas residuais antes da sua libertação no ambiente, o que pode condicionar a qualidade da água e afetar a saúde pública.

Hoje em dia, a disponibilidade de água, quer em quantidade quer em qualidade, encontra-se ameaçada. Existe atualmente uma preocupação crescente com a necessidade de utilizar águas residuais tratadas para usos não potáveis, como parte da solução para a crise global de escassez de água. Uma gestão eficiente e sustentável dos recursos hídricos permite, portanto, que seja utilizada água residual tratada (ART) para usos não potáveis, tais como rega de jardins, assim como



artigos breves_ n. 3

lavagem de ruas ou contentores do lixo, os quais representam uma parte significativa do consumo de água nas cidades. Neste contexto, as atuais normas e legislação requerem uma revisão urgente para garantir a segurança desta água tratada a ser reutilizada. Contudo, para que as normas e legislação possam ser alteradas, é necessário criar evidências de quais as alterações que necessitam de ser incluídas, nomeadamente quais os indicadores de qualidade que devem ser contemplados de forma a assegurar a salvaguarda da saúde pública.

As estações de tratamento de águas residuais (ETAR) reduzem a concentração dos microrganismos, mas podem não os eliminar completamente. Considerando que a concentração remanescente de microrganismos depende do nível de tratamento do efluente ⁽¹⁾, uma seleção apropriada do processo de desinfecção para um sistema de irrigação específico deve, portanto, ser tida em consideração.

No entanto, deve-se ter em mente que monitorizar todos os agentes patogénicos possivelmente presentes na água não é uma opção tecnologicamente viável para além de ser muito dispendiosa ⁽²⁾. Dado que não é exequível analisar todos os possíveis contaminantes das águas, recorre-se à utilização

de organismos indicadores como substitutos de agentes patogénicos em testes de rotina de águas de consumo, de recreio e ambientais, para a proteção da saúde pública. As bactérias indicadoras habitualmente usadas para estes fins são a *Escherichia coli* e *Enterococcus*, mas que nem sempre se correlacionam com a presença de agentes patogénicos (ver referências em ⁽²⁾), em particular de vírus entéricos ⁽³⁾ uma vez que estes são mais resistentes à desinfecção (<http://www.cdc.gov/safewater/effectiveness-on-pathogens.html>) e, portanto, mais persistentes no meio ambiente.

Os vírus entéricos são excretados na urina e nas fezes dos hospedeiros. Estes são encontrados com frequência no ambiente, sendo responsáveis por um elevado número de gastroenterites em todo o mundo. Nas águas, os vírus mais comuns são: norovírus (NoV), enterovírus, rotavírus, vírus da hepatite A (HepA), vírus da hepatite E (HepE), adenovírus e poliomavírus.

As ETAR são importantes para reduzir a transmissão de NoV, HepA, HepE e outros vírus entéricos no ambiente fora do hospedeiro e para prevenir novos ciclos de infeção humana (figura 1). Uma vez que muitos desses vírus têm uma alta resistência aos processos de tratamento ⁽⁴⁾, é de extrema im-

Figura 1: ⚡ Esquema representativo das várias fases de tratamento das águas residuais para a produção de água residual tratada (ART).



Nota: O tratamento terciário não é, em muitos casos, usado para fazer a desinfecção para descarregar em meio receptor.



artigos breves_ n. 3

portância avaliar a eficácia dos tratamentos de águas residuais na sua remoção, principalmente para fins de utilização de ART. Até o momento, não existem muitos estudos sobre as concentrações dos vírus NoV, HepA e HepE em todo o sistema de águas residuais após cada tratamento, particularmente em águas residuais tratadas com tratamento terciário (2).

_Objetivo

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a presença de vírus entéricos (NoV GI e GII e vírus da HepA), em várias matrizes de águas naturais, águas de consumo e ao longo das várias fases de tratamento numa ETAR, usando a metodologia de *real-time reverse transcription quantitative PCR* (RT-qPCR), de modo a detetar e quantificar estes vírus entéricos.

_Métodos

Foi estruturado um plano de trabalho que incluiu a colheita e análise de amostras de água de consumo, superficiais e subterrâneas; e águas residuais em três fases diferentes de tratamento – afluente bruto não tratado, efluente com tratamento secundário por lamas ativadas e efluente sujeito a tratamento terciário por filtração com areias e exposição a radiação ultravioleta (UV). Foi desenvolvida uma metodologia para a preparação de amostras e extração de RNA para a pesquisa e quantificação de vírus entéricos – NoV GI e GII e vírus da HepA, através de RT-PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), baseado na Norma ISO 15216-2:2019 – *Método horizontal para a deteção de Vírus da Hepatite A e Norovírus em alimentos pela técnica de RT-PCR em tempo real* (5). Esta metodologia indica se estes vírus se encontram ou não presentes na água e se os tratamentos atualmente utilizados nas ETAR são eficientes, garantindo assim que as águas residuais tratadas se encontram isentas destes agentes patogénicos.

As águas são muitas vezes matrizes complexas em que os vírus pesquisados podem estar presentes em baixas concentrações, pelo que a deteção dos vírus entéricos em amostras de águas requer a prévia concentração dos vírus presen-

tes nas amostras. O método desenvolvido é também aplicável a outras matrizes de água, nomeadamente minerais, de nascente engarrafadas, águas balneares salinas ou águas de processo.

Adicionalmente, foram ainda determinados diversos parâmetros microbiológicos – coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli* e enterococos.

_Resultados

Os resultados obtidos demonstraram que o vírus da HepA foi detetado apenas numa amostra de afluente bruto (não tratado) de águas residuais domésticas, ao contrário dos NoV (GI/GII) que foram detetados em afluente bruto (100/100%), efluente com tratamento secundário (47/73%) e terciário (33/20%), apesar das concentrações significativamente reduzidas, ou até ausência aparente de bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) detetadas nas águas residuais com tratamento terciário (tabela 1).

Foram ainda analisadas as correlações entre os parâmetros microbiológicos em cada fase de tratamento, sendo que a única correlação positiva entre FIB e vírus entéricos foi identificada no afluente bruto, não tratado, entre NoV GI e coliformes fecais.

Relativamente a águas de consumo, subterrânea e superficial, não foi detetada a presença de vírus entéricos em nenhuma das amostras, apesar de, em alguns casos, ter sido detetada a presença de outros indicadores microbiológicos de contaminação. A relação entre a presença de FIB e os vírus entéricos em estudo não demonstra, deste modo, resultados coerentes em águas residuais, por oposição aos resultados para águas “limpas”, *i.e.*, de consumo subterrâneas e superficiais, em que a ausência de FIB coincide com a ausência de vírus entéricos.



Tabela 1: Resultados microbiológicos (mediana) obtidos para afluente bruto não tratado (WW1), efluente com tratamento secundário (WW2) e com tratamento terciário por filtração com areias e UV (WW3).

	WW1 (n=15)	WW2 (n=15)	WW3 (n=15)	P^*	Comparações interpare **
Coliformes totais (NMP /100 mL)	7.70E+07	9.80E+04	<LD	<0.001	a,b,c
<i>E. coli</i> (NMP /100 mL)	1.66E+07	2.14E+04	<LD	<0.001	a,b,c
Coliformes fecais (NMP /100 mL)	1.19E+07	1.58E+04	<LD	<0.001	a,b,c
Enterococos (NMP/100 mL)	3.99E+06	8.80E+03	<LD	<0.001	a,b,c
NoV GI (CG /100 mL)	6.67E+07	8.34E+06	8.81E+05	<0.001	a,b,c
NoV GII (CG /100 mL)	4.86E+07	2.29E+06	9.69E+05	<0.001	a,b
HepA (CG /100 mL)	3.99E+06	ND	ND	NA	NA

* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; ** Comparações múltiplas com correção de Bonferroni.

a = diferença estatisticamente significativa entre WW1 e WW2; b = diferença estatisticamente significativa entre WW1 e WW3; c = diferença estatisticamente significativa entre WW2 e WW3; NMP = número mais provável; CG = cópias genómicas; ND = não detetado; N = número total de amostras analisadas; LD (limite de deteção) = 1 MPN/mL; NA = não aplicável.

Adaptado de Teixeira *et al.*, 2020 (3).

Conclusões

O trabalho desenvolvido permitiu demonstrar que a ausência de bactérias indicadoras de contaminação fecal (FIB) não implica a ausência de microrganismos patogénicos, nomeadamente NoV GI e GII em águas residuais sujeitas a tratamento terciário nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR).

Os resultados obtidos indicam, assim, que podem persistir riscos para a saúde pública na utilização de águas residuais tratadas, mesmo com tratamento terciário como a utilização de radiação ultravioleta (UV).

Além disso, foi constatado que a relação entre a presença de FIB e vírus entéricos não demonstra resultados coerentes em águas residuais por comparação a águas “limpas”, *i.e.*, de consumo, subterrâneas e superficiais. Estudos adicionais são necessários, que incluam um maior número de

amostras, outras ETAR e, sobretudo, que confirmem se os vírus encontrados se mantêm infecciosos após os tratamentos a que estas águas são sujeitas nas ETAR, de modo a adaptar as atuais normas e legislação aplicáveis à utilização de água residual tratada (ART).

Perspetivas futuras

A demanda de água para usos não potáveis como rega de jardins ou agricultura, assim como lavagem de ruas ou contentores do lixo tem aumentado cada vez mais. Uma vez que um dos efeitos das alterações climáticas são períodos de seca mais alargados, existe atualmente uma preocupação crescente com a necessidade de utilizar águas residuais tratadas para dar resposta a estas necessidades. Como tal, e considerando os resultados do presente estudo, a pesquisa de vírus entéricos – particularmente os mais infecciosos e ambientalmente resistentes como os NoV – deve



ser incluída na monitorização e avaliação da qualidade da água, em particular no contexto de utilização de ART.

O Laboratório de Microbiologia de Águas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) contribui para a qualidade da água de várias formas, através de investigação aplicada e prestação de serviços acreditados de monitorização da qualidade da água nas suas diversas utilizações. A pesquisa dos vírus entéricos aqui abordados (vírus da hepatite A, norovirus GI e GII) fazem já parte dos serviços disponíveis à comunidade.

Referências bibliográficas:

- (1) ISO 16075-1:2015. Guidelines for treated wastewater use for irrigation projects - Part 1: The basis of a reuse project for irrigation
- (2) Teixeira P, Salvador D, Brandão J, et al. Environmental and Adaptive Changes Necessitate a Paradigm Shift for Indicators of Fecal Contamination. *Microbiol Spectrum*. 2020 Mar 27;8(2):ERV-0001-2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ERV0001-2019>
- (3) Teixeira P, Costa S, Brown B, et al. Quantitative PCR Detection of Enteric Viruses in Wastewater and Environmental Water Sources by the Lisbon Municipality: A Case Study; *Water*. 2020;12(2):544. <https://doi.org/10.3390/w12020544>
- (4) Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, Guerrero-Barrera AL. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens*. 2015 May 21;4(2):307-34. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020307>
- (5) ISO 15216-2:2019. Microbiology of the food chain - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR - Part 2: Method for detection