

Avaliação da Qualidade Microbiológica das Águas – Matrizes e Metodologias

Versão final após defesa

Bárbara Sofia Patrício Marcos Afonso

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Dr.^a Maria Paula Tenreiro da Cruz Matoso Martinho Lourenço

Coorientador: Professor Doutor Ângelo Filipe Santos Luís

Março 2023

Declaração de Integridade

Eu, Bárbara Sofia Patrício Marcos Afonso, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10822 de Biotecnologia da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Covilhã e Ubi em 21/03 /2023



Bárbara Sofia Patrício Marcos Afonso

Agradecimentos

Nem posso acreditar que está a acabar esta grande etapa da minha vida.

Ao terminar este trabalho não posso deixar de agradecer a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a sua elaboração e sobretudo para a minha formação, pois sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas, este não teria sido possível.

Quero agradecer ao Laboratório de Saúde Pública da Unidade Local de Saúde da Guarda, que me acolheu e permitiu a realização deste trabalho. Especialmente à Dra. Paula Lourenço e à Dra. Marília Dionísio que foram incansáveis ao longo de todos estes meses de estágio e que me ajudaram sempre, obrigada pela vossa disponibilidade, dedicação e profissionalismo. Agradeço também a todas as técnicas do laboratório pela paciência e pela ajuda constante, quer a nível profissional, quer a nível pessoal.

Um especial agradecimento aos meus pais que sempre me apoiaram, ajudaram e nunca me deixaram desistir nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor, incentivo e pelo apoio incondicional.

À Universidade da Beira Interior, e a todos os professores, que me acompanharam, por me proporcionarem o conhecimento, inspiração e conselhos ao longo da minha formação académica e profissional. Ao meu orientador interno, Prof. Doutor Ângelo Luís, pelo apoio e confiança, pelo seu empenho e dedicação a este trabalho e por estar sempre disponível.

E a todos os que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a concretização deste trabalho, e que não estão aqui referidos.

Muito obrigada.

Resumo

A água é a base da vida, é por isso primordial garantir a sua qualidade. Existem inúmeros microrganismos que podem ser transmitidos pela água e que podem causar danos graves na saúde humana e conseqüentemente na Saúde Pública. A qualidade da água deve ser garantida privilegiando a prevenção através de controlos periódicos. A análise microbiológica das águas é uma forma eficaz, eficiente que permite detetar microrganismos patogénicos que podem pôr em causa a Saúde Pública.

Ao longo deste estágio realizaram-se análises microbiológicas de diversos tipos de matrizes, através de diferentes métodos culturais. A pesquisa dos microrganismos foi feita de acordo com a legislação adequada a cada tipo de matriz.

Constatou-se que as águas que chegam ao Laboratório de Saúde Pública da Unidade Local de Saúde da Guarda não apresentam uma carga microbiana muito elevada e que os métodos usados no laboratório são fiáveis e efetivos para a prevenção e promoção da saúde.

Palavras-chave

Água; Saúde Pública; Microbiologia; Microrganismos; Qualidade; Controlo; Prevenção; Legislação.

Abstract

Water is the basis of life, therefore ensuring its quality is essential. There are numerous microorganisms that can be transmitted by water and that can cause serious damage to the human health. The water quality must be guaranteed out by prioritizing prevention through periodic controls. The microbiological analysis of water is an effective and efficient way to detect pathogenic microorganisms that can jeopardize Public Health.

During this internship, microbiological analyzes of different types of matrices were carried out, through different cultural methods. The search of microorganisms was carried out in accordance with the legislation appropriate to each type of matrix.

It was found that the water that reaches the Laboratório de Saúde Pública da Unidade Local de Saúde Pública da Guarda does not have a very high microbial load and that the methods used in the laboratory are reliable and effective for the prevention and promotion of health.

Keywords

Water; PublicHealth; Microbiology; Microorganisms; Quality; Control; Prevention; Legislation.

Índice

Capítulo 1	1
1. Enquadramento e objetivos do estágio	1
Capítulo 2.....	3
2. Fundamentos teóricos Microbiologia das águas.....	3
2.1 Introdução.....	3
2.2 Importância da Avaliação Microbiológica da Água.....	5
2.3 Legislação aplicável	6
Capítulo 3.....	10
3. Laboratório de Saúde Pública	10
3.1 Caracterização do Laboratório de Saúde Pública	10
3.2 Sistema Integrado de Gestão da Qualidade (SIGQ).....	12
Capítulo 4.....	18
4. Procedimentos de Ensaio.....	18
4.1 Colheita, Transporte e Receção das Amostras de Água.....	18
4.2 Meios de Cultura	20
4.3 Material e Equipamentos	30
4.4 Métodos de Sementeira	31
4.4.1 Incorporação	31
4.4.2 Membrana Filtrante.....	31
4.4.3 Método do Número Mais Provável	32
4.5 Procedimentos de Ensaio	33
4.5.1 Quantificação de microrganismos cultiváveis a 37 °C e a 22 °C segundo a Norma de Ensaio ISO 6222:1999	33
4.5.2 Pesquisa e Quantificação de bactérias coliformes e E.coli	35
4.5.3 Pesquisa e Quantificação de Clostridium perfringens segundo a Norma de Ensaio ISO 14189:2013.....	40

Procedimento	40
4.5.4 Pesquisa e Quantificação de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras segundo a Norma de Ensaio NP EN 26461-2:1994.....	42
4.5.5 Pesquisa e Quantificação de Enterococos fecais	43
4.5.6 Pesquisa e Quantificação de Pseudomonas aeruginosa	47
4.5.7 Pesquisa e Quantificação de Estafilococos totais e Coagulase Positiva segundo a Norma de Ensaio NP 4343:1998	51
4.5.8 Pesquisa e Quantificação de Legionella pneumophila segundo o procedimento de ensaio interno do LSPG.....	54
4.6 Controlo de Qualidade	57
4.6.1-Controlo de Qualidade Interno (CQI).....	57
4.6.2-Controlo de Qualidade Externo (CQE).....	66
Capítulo 5	69
5.1Projeto Aplicado.....	69
5.1.1Objetivos	70
5.1.2 Metodologia.....	70
5.1.3 Resultados e Discussão	72
Capítulo 6	73
6-Análise Estatística	73
Capítulo 7	79
7-Conclusão	79
Capítulo 8	81
8-Referências.....	81

Índice de Figuras

Figura 1- Organigrama da Hierarquia de Responsabilidades do LSPG.....	11
Figura 2- Evolução dos parâmetros acreditados no LSPG.....	11
Figura 3-Ciclo PDCA	14
Figura 4-Colheita em piscina, mala térmica com os respetivos termoacumuladores e amostras e colorímetro de campo.	18
Figura 5-Procedimento de desinfeção da rampa de filtração.	32
Figura 6- Microrganismos cultiváveis a 37°C e 22°C em WPCA.....	34
Figura 7- Colónias de <i>E.coli</i> em meio LSA.....	37
Figura 8-Colónias de <i>E.coli</i> e de <i>Klebsiella varícola</i> em meio CCA	38
Figura 9-Quanti-tray com todos os poços positivos para coliformes totais, Quanti-tray que a luz UV apresenta <i>E.coli</i> (“colilert – Pesquisa Google,” 2022.).....	39
Figura 10-Colónias de <i>Clostridium Perfringens</i> em meio CP	41
Figura 11-Colónias de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras em meio EC	43
Figura 12-Colónias de <i>Enterococcus faecalis</i> em meio SB	45
Figura 13-Quanti-tray com poços verdes, positivos para Enterococos fecais para substrato Enterolert®- DW.....	46
Figura 14-Placas com colónias características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio PS-CN, SM e WPCA.	49
Figura 15-Quanti-tray com poços com fluorescência positivos para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
Figura 16-Colónias de <i>Staphylococcus epidermidis</i> , coagulase negativa e de <i>Staphylococcus Aureus</i> , coagulase positiva	53
Figura 17-Quanti-Tray® (Lado Esq.) – Amostra Positiva (Contém <i>Legionella pneumophila</i>); Quanti-tray® (Lado Dir.) – Amostra Negativa (Não contém <i>Legionella pneumophila</i>)(Rafael & Ferreira, 2017)	56
Figura 18. Processo de Pesquisa e Quantificação de <i>Legionella</i> por PCR.	71
Figura 19- Número total de amostras analisadas	73
Figura 20-Incumprimentos nas amostras analisadas.	74
Figura 21-Incumprimentos em águas de piscina.	74
Figura 22-Bactérias coliformes em piscinas.	75
Figura 23-Incumprimentos nas águas de consumo.....	75

Figura 24-Percentagem de <i>E.coli</i> nas águas de consumo.....	76
Figura 25- Incumprimentos verificados nas amostras de águas termais analisadas.....	76
Figura 26- Incumprimentos verificados nas amostras de águas minerais naturais analisadas.	77
Figura 27-Incumprimentos nas águas balneares.	77
Figura 28-Incumprimentos em águas de hemodiálise.....	78

Índice de Tabelas

Tabela 1- Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para a água de consumo (Decreto-Lei 306/2007 com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei 152/2017)	7
Tabela 2- Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para Águas Balneares (Agência Portuguesa do Ambiente, 2020).....	7
Tabela 3- Parâmetros microbiológicos, expressão dos resultados, valores de referência e métodos analíticos a utilizar para águas recreativas (circular normativo n°14/DA de 21/08/2009).....	9
Tabela 4- Caracterização dos meios usados no LSPG.	20
Tabela 5- Leitura do teste da oxidase.	27
Tabela 6- Período de incubação do meio WPCA de acordo com o tipo de matriz	34
Tabela 7 -Valores paramétricos para a quantificação de microrganismos cultiváveis a 22°C e a 37°C de acordo com cada matriz e com a legislação vigente.	35
Tabela 8- Volumes de amostra a filtrar de acordo com a matriz.....	36
Tabela 9- Volume de amostra a filtrar	37
Tabela 10- Interpretação de resultados para a pesquisa e quantificação de <i>Coliformes</i> e <i>E.coli</i>	40
Tabela 12- Volume de amostra a filtrar de acordo com a matriz.....	44
Tabela 13- Interpretação de resultados Enterolert®-E.....	46
Tabela 14- Interpretação de resultados Enterolert®-DW.....	46
Tabela 14- Volume de amostra a filtrar de acordo com a matriz.....	48
Tabela 16- Interpretação de resultados Pseudalert® (ISO 16266-2).	50
Tabela 16- Volume de amostra a filtrar de acordo com a matriz.....	52
Tabela 17- Dureza das amostras de <i>Legionella</i>	54
Tabela 18- Volume a adicionar às amostras de acordo com a dureza.	55
Tabela 19- Interpretação de resultados Legiolert®.....	55
Tabela 20- Seletividade dos meios a partir de fórmulas desidratadas.....	63
Tabela 21- Seletividade e especificidade dos meios de cultura prontos a usar.	65

Índice de Acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APA	Agência Portuguesa do Ambiente
AVAC	Aquecimento, Ventilação e Ar-condicionado
BE	Bilis esculina
BH	Caldo Brain Heart Infusion
CCA	Chromogenic Coliform Agar
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Coag	Coagulase
Coli	Colilert-18®
CP	Meio Triptose Sulfito Cicloserina
CQE	Controlo de Qualidade Externo
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DGS	Direção Geral da Saúde
dNTPs	desoxinucleótidos
EC	Triptose Sulfito Agar
Entero	Enterolert®
EPI	Equipamento de Proteção Individual
ERSAR	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
FA	Fosfatase Ácida
FAM	Fluoróforo
GS	Gelose Columbia 5% de sangue de carneiro
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IPAC	Instituto Português da Acreditação
IPC	Controlo Interno
ISO	International Organization for Standardization
LD	Limite de Detecção
Legio	Legiolert®
LQ	Limite de Quantificação
LSA	Lauril sulfato Agar
LSPG	Laboratório de Saúde Pública da ULS guarda

MR	Materiais de Referência
MSA	Manitol Salt Agar
MUG	4-methylumbeliferil- β -D-glucuronideo
N	Unidades formadoras de colónias
N/A	Não Aplicável
NMP	Número Mais Provável
NP	Norma portuguesa
NP EN	Norma europeia
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCQA	Plano de Controlo da Qualidade da Água
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDCA	Plan Do Check Act
PE	Polietileno
PNAEQ	Programa Nacional da Avaliação Externa da Qualidade
PS-CN	<i>Pseudomonas</i> CN Agar
Pseud	Pseudalert®
RT	Responsável Técnica
RTC	Responsável Técnica Coordenadora
RT-PCR	Real time Polymerase Chain Reaction
s	Desvio padrão
SB	Slanetz & Bartley
SGIQ	Sistema de Gestão Integrado da Qualidade
SIET	Serviço de Instalações Equipamentos e Transportes
SIGQ	Sistema Integrado de Gestão da Qualidade
SM	Skim Milk
TSA	Tryptose Sulfito Agar
TTC	Cloreto de tetrazolium
UBI	Universidade da Beira Interior
UE	União Europeia
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UG	Unidades Genómicas
UKHSA	<i>United Kingdom Health Security Agency</i>

ULS	Unidade Local de Saúde
ULSG	Unidade Local de Saúde da Guarda
USP	Unidade de Saúde Pública
UV	Ultravioleta
V	Volume
VL	Valor Limite
VP	Valor Paramétrico
VR	Valor de Referência
WPCA	Water Plate Count Agar
Z	Z score

Capítulo 1

1. Enquadramento e objetivos do estágio

Desde o início da licenciatura em Biotecnologia tive um grande interesse na área da microbiologia e uma enorme vontade de aprender mais sobre esta área tão vasta. Quando decidi realizar um estágio no segundo ano de mestrado optei por um laboratório de análise de águas, devido à sua grande importância para a vida e ao seu interesse do ponto de vista microbiológico. Como o meu objetivo principal era alargar os meus conhecimentos, inserir-me no mercado de trabalho e fixar-me na minha área de residência, apresentei de imediato a minha candidatura espontânea ao Laboratório de Saúde Pública da Guarda (LSPG) inserido na Unidade Local de Saúde da Guarda (ULSG). O LSPG é um laboratório acreditado e certificado, constituído por uma equipa jovem, dinâmica e muito qualificada e por isso considerei que os meus objetivos iriam ser facilmente alcançados.

Ao longo do estágio realizado desenvolvi o meu espírito crítico, a capacidade de responder aos contratempos e fui também capaz de me integrar na equipa multidisciplinar com sucesso. Para além disso, consegui consolidar os conhecimentos adquiridos ao longo da licenciatura e do mestrado em Biotecnologia. Um dos objetivos do estágio era integrar as aprendizagens adquiridas ao longo do meu percurso académico, de modo a preparar-me para dar resposta às exigências do mercado de trabalho e permitir a minha integração profissional.

Este estágio baseou-se na aplicação de conhecimentos da área da microbiologia para a análise de águas recorrendo a diferentes tipos de métodos de sementeira. Foi realizada sementeira por incorporação, filtração e Número Mais Provável (NMP), para além disso tive ainda oportunidade de assistir à realização da técnica *Real Time - Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Todas as técnicas usadas mostraram-se bastante reproduzíveis e eficazes e permitiram assegurar resultados com uma elevada qualidade, sendo que a técnica de NMP permite obter resultados mais rápidos e consequentemente uma tomada mais rápida de decisões e a implementação de medidas preventivas ou corretivas.

Inicialmente, analisei a literatura referente à análise microbiológica das águas, a legislação aplicável a cada tipo de matriz, consultei diversos artigos científicos, procedi também à leitura de alguns livros e à revisão de alguns documentos da universidade acerca do tema.

Quando iniciei o estágio no LSPG foi-me feita uma apresentação das instalações e de todos os colaboradores. Comecei por ler e estudar os procedimentos internos e as normas aplicáveis. De seguida, iniciei o processo de admissão aos métodos de ensaio de acordo com o procedimento interno do LSPG, tendo sido considerada apta a todas as metodologias definidas no âmbito do estágio, que passei a realizar de forma autónoma.

Em março de 2022 assinei contrato individual de trabalho a tempo incerto para substituição de uma colaboradora em licença de maternidade, o que consolidou a confiança da equipa no meu trabalho e de certa forma foi a validação da minha integração na equipa do LSPG e da minha competência técnica.

No final do estágio já era capaz de realizar as técnicas com competência e de assegurar resultados robustos garantindo a eficácia dada pelo LSPG.

Capítulo 2

2. Fundamentos teóricos Microbiologia das águas

2.1 Introdução

A água é o suporte de toda a atividade biológica sendo um elemento essencial para o equilíbrio natural e geodinâmico do planeta, por este motivo é crucial que seja assegurada a sua qualidade, desde a sua produção até ao consumo (Bandeira, 2018). A distribuição pública de água potável associada ao uso de boas práticas de higiene é considerada essencial para a redução das taxas de morbidade e mortalidade humana.(WHO, 2015) Desde 2010 que a Organização das Nações Unidas (ONU) reconhece o acesso a água segura, sem efeitos e/ou implicações negativas para a saúde como um direito humano. Em 2017, cerca 2,1 mil milhões de pessoas não tinham acesso a serviços de água potável com segurança e 4,5 mil milhões de pessoas careciam de serviços de saneamento com segurança (Water, 2017). Em setembro de 2015 os Estados Membros das Nações Unidas adotaram a Agenda 2030 com 17 objetivos principais. Um deles defende o acesso universal e equitativo a água segura, livre de contaminação e pretende-se também que haja uma diminuição da poluição da mesma, melhorando para isso as condições de saneamento e higiene e a redução substancial do número de pessoas que sofrem com a escassez de água, sendo também um dos propósitos bem definidos na Agenda 2030 (ONU, 2016).

A água potável é caracterizada pela sua capacidade de ser consumida sem causar patologias ao longo de uma vida inteira, independentemente da suscetibilidade do consumidor. Existem documentos legais e normativos que têm por objetivo garantir a qualidade das águas, onde estão estipuladas as características finais que devem ser obedecidas (WHO, 2012).

As características físicas, químicas e biológicas definem em conjunto o conceito de qualidade da água que depende ainda da utilização a que a água se destina, consumo humano, uso industrial, agrícola ou ainda para lazer ou uso ambiental (Mendes,2010).

Anualmente, em Portugal, a Entidade Reguladora de Águas e Resíduos (ERSAR) aprova um Programa de Controlo da Qualidade da Água (PCQA), que permite avaliar periodicamente se a água que chega aos consumidores se enquadra na conformidade legal (ERSAR, 2011).

O abastecimento de água potável às populações constitui um serviço público imprescindível ao bem-estar da população, à Saúde Pública e à segurança coletiva dos cidadãos. É também essencial para as atividades económicas e para a proteção ambiental. Por este motivo, a distribuição de água deve ser

feita com a máxima qualidade possível e deve ser acessível a todos os cidadãos de igual modo (Frazão, 2015).

Também a qualidade da água de piscinas deve ser tida em conta, uma vez que estão associadas a atividades lúdicas e, para além disso, estão também associadas a diversos benefícios para a saúde, entre os quais desenvolvimento de crianças, o aumento de força muscular, aquisição de flexibilidade, o fortalecimento do coração, queima de calorias, melhora da respiração. Os utilizadores das piscinas poderão estar expostos a perigos que podem surgir de diversas fontes, nomeadamente, do número excessivo de banhistas, da qualidade da água de alimentação da piscina, da poluição atmosférica, da falta de desinfecção, da deficiente renovação da água e do ar, da humidade da atmosfera envolvente e das altas temperaturas. Todos estes fatores promovem uma maior proliferação microbiana. (WHO, 2006, Direção-Geral da Saúde, 2009).

A contaminação fecal é a mais comum em piscinas, podendo ser proveniente da libertação de matéria fecal por parte dos banhistas ou dever-se à alimentação da piscina ser feita com água contaminada. Para além da contaminação fecal existem também microrganismos patogénicos não entéricos provenientes da saliva, suor, pele que podem existir em superfícies húmidas, aquecimento e ares condicionados. Todos estes microrganismos põem em causa a saúde dos utilizadores, sendo por isso essencial que se faça uma vigilância e um controlo periódicos das mesmas, promovendo a Saúde Pública (Mansoorian, 2015, Tomaz, 2011).

A qualidade das águas termais deve também ser monitorizada periodicamente, uma vez que são utilizadas para a promoção da saúde, tratamentos e reabilitação. Estes tratamentos são comparticipados pelo Sistema Nacional de Saúde já que estão comprovados os seus efeitos terapêuticos ou favoráveis para a saúde. (*Portaria nº 102-B/2021 de 14 de maio. Diário da República nº 94- I Série.*, 2021). Com o aumento do turismo e com os apoios dados à realização destes tratamentos a sua procura é cada vez maior, o número crescente de atividades realizadas pode pôr em causa a qualidade da água, sendo por isso essencial que se realizem programas de prevenção, monitorização e controlo, com o objetivo de garantir e promover a Saúde Pública (Cachapa, 2022).

As águas balneares são caracterizadas como águas superficiais, quer sejam interiores, costeiras ou de transição, que tenham um grande número de utilizadores e onde a atividade balnear não tenha sido impedida permanentemente. As águas balneares estão geralmente associadas a um grande desenvolvimento turístico e é essencial garantir a sua qualidade microbiológica para assegurar a saúde dos seu utilizadores (Portaria 102-C/2021, 2021).

Assegurar a qualidade da água usada em hemodiálise é essencial para garantir a segurança do doente, uma vez que existem compostos presentes nas águas que podem debilitar e pôr em causa o seu estado de saúde. Vários grupos de investigadores demonstraram que algumas reações pirogénicas em doentes de hemodiálise podem ser causadas por lipopolissacarídeos ou endotoxinas que estão associadas a

bactérias Gram negativas, bactérias que têm capacidade de se replicar em água de diálise, pelo que é essencial o controlo microbiológico deste tipo de águas (Jesus, 2021).

As águas de nascente são de origem subterrânea, não sofrem adição de agentes de desinfecção e tratamento, são ricas em diversos nutrientes o que as torna um ótimo complemento à dieta diária. A análise microbiológica de águas de nascente é essencial uma vez que estas águas de circulação subterrânea se destinam ao consumo humano, tendo, portanto, que cumprir requisitos tanto bacteriológicos como físico-químicos. Considerando a localização geográfica do LSPG, junto ao Parque Nacional da Serra da Estrela, as análises de águas de nascente representam uma parte do trabalho realizado no LSPG (“Águas Minerais e de Nascente de Portugal,” 2016).

2.2 Importância da Avaliação Microbiológica da Água

A contaminação microbiológica das águas está associada a diversas causas, pode ser causada por tratamento insuficiente, falta de manutenção de esgotos, que pode levar a uma contaminação proveniente da matéria fecal humana e/ou animal, ou ainda devido a uma contaminação do solo, nomeadamente nos lençóis freáticos devido o aumento da poluição oriunda de resíduos industriais, lixos, agrotóxicos, entre outros.

A contaminação da água de consumo deve ser evitada e por esse motivo estão implementados planos de controlo e vigilância com o objetivo de se prevenirem os riscos inerentes, de modo a garantir o acesso a água segura. A adoção de medidas preventivas e a implementação de procedimentos de desinfecção são imprescindíveis para garantir a boa qualidade da água distribuída. Dentro das medidas preventivas a que mais se destaca é a análise microbiológica periódica, uma vez que permite a deteção de microrganismos patogénicos, contribuindo assim para a promoção da Saúde Pública da população. A fonte mais frequente de contaminação microbiológica é de origem fecal e usam-se microrganismos indicadores para monitorização do controlo microbiológico (ONU, 2016).

A avaliação da qualidade microbiológica da água tem um grande impacto na Saúde Pública, uma vez que a água pode ser um vetor de disseminação de doenças infecciosas. A inalação de gotículas de água contaminada, é uma importante via de disseminação da *Legionella* (Vital, 2019).

A nível mundial, os sistemas de saneamento deficientes, nos dias de hoje, são ainda responsáveis pela morte de três milhões de pessoas por ano, na sua maioria crianças. Alguns ciclos de vida de insetos (vetores) desenvolvem-se na água, nomeadamente, o mosquito *Anopheles* responsável pela disseminação da malária, *Culex* responsável pela disseminação do vírus responsável pelo dengue, *Aedes* responsável pela transmissão de dengue, zika e febre amarela, entre outros. O consumo de águas contaminadas por matéria fecal provoca, a nível mundial, cerca de dois milhões de mortes por diarreias.

Na União Europeia e em Portugal existem entidades produtoras, gestoras e unidades de Saúde Pública que têm programas de controlo e de vigilância, respetivamente, de qualidade das águas que têm como objetivo monitorizar periodicamente a qualidade da água.

2.3 Legislação aplicável

Águas de Consumo

A água de consumo é definida como toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à higiene pessoal e doméstica, independentemente da sua origem e de ser fornecida através de uma rede de distribuição, de um camião ou navio cisterna, em garrafas ou em outros recipientes com ou sem fins comerciais. Também assim é considerada toda a água usada na indústria alimentar seja para transformação, consumo ou comercialização ou ainda água que entre em contacto com alimentos (ERSAR, 2018).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem tido um papel ativo e fundamental na garantia da qualidade da água, tendo como base uma avaliação de risco. As diretrizes da OMS juntamente com a norma EN15975-2 relativa à água de abastecimento usada para consumo humano são princípios reconhecidos internacionalmente e que por isso devem ser respeitados (Cunha, 2016).

Em Portugal, as águas de consumo humano são regidas pelo Decreto-Lei 306/2007 de 27 de agosto, com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei 152/2017 de 7 de dezembro. Passados 10 anos da implementação do Decreto-Lei 306/2007 foram notórias as consequências positivas para o setor, que contribuíram para uma qualidade muito superior da água e também para a sua segurança (Decreto-Lei nº306/2007, 2007, Decreto-Lei 152/2017, 2017).

Estes documentos legais indicam as obrigações a serem cumpridas de modo a garantir a qualidade da água disponibilizada aos consumidores. As alterações introduzidas pelo Decreto-Lei 152/2017 reforçam a importância da existência de um PCQA suportado por uma avaliação de risco ao longo do sistema de abastecimento, desde a área envolvente até à torneira do consumidor. No Decreto-lei estão também definidas as sanções em caso de incumprimento, os métodos de ensaio bem como os valores paramétricos.

De modo a garantir a máxima segurança da água que chega ao consumidor estão definidos parâmetros microbiológicos e físico-químicos que devem ser analisados e os respetivos valores paramétricos que devem ser cumpridos, apresentados na Tabela 1. Existem também documentos emitidos pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC) que tem como objetivo definir requisitos específicos para a acreditação de laboratórios de ensaio no âmbito da análise de águas (Instituto Português da Acreditação, 2017).

Tabela 1- Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para a água de consumo (Decreto-Lei 306/2007 com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei 152/2017).

Parâmetro	Valor Paramétrico	Unidade
<i>Escherichia Coli</i>	0	Número/100 mL
Enterococos fecais	0	Número/100 mL
<i>Clostridium Perfringens</i>	0	Número/100 mL
Coliformes Totais	0	Número/100 mL
Número de colónias a 22°C	100	Número/ mL
Número de colónias a 37°C	20	Número/ mL

Águas Balneares

A legislação referente às águas balneares é regida pela diretiva 2006/71CE e pelo Decreto-Lei n.º113/2012. Nas águas balneares os parâmetros indicadores da qualidade da água são os enterococos intestinais e a *Escherichia coli* (“Decreto-Lei n.º 113/2012,” 2012, Direcção-Geral da Saúde, 2017).

A Agência Portuguesa do Ambiente (APA) é a entidade responsável pela implementação das políticas de ambiente em Portugal. A APA tem como objetivo contribuir para um elevado nível de proteção e valorização do ambiente através da prestação de serviços de qualidade aos cidadãos e tem como missão a gestão integrada das políticas ambientais e de sustentabilidade. É também responsável pela definição e implementação do programa de monitorização e pela classificação das águas balneares (Agência Portuguesa do Ambiente, 2020).

Tabela 2- Parâmetros microbiológicos e valores paramétricos para Águas Balneares (Agência Portuguesa do Ambiente, 2020).

Água balnear/Parâmetro	Enterococos intestinais (UFC/100mL ou NMP/100mL)	<i>Escherichia Coli</i> (NMP/100mL)
Interior	500	1500
Costeira ou de transição	300	1000

Hemodiálise

De acordo com o Manual de Boas Práticas, as análises microbiológicas da água devem ser realizadas uma vez por mês e em caso de contaminação do sistema, este deve ser submetido a um processo de desinfecção e posteriormente devem ser repetidas as análises bacteriológicas pelo menos 3 vezes em dias alternados até que a situação seja normalizada. As análises microbiológicas a serem realizadas em água de hemodiálise devem incluir a pesquisa de crescimento bacteriano a 22 °C e a 37 °C e a

pesquisa de endotoxinas e a pesquisa de micobactérias deve ser feita semestralmente (*Manual Boas Práticas Hemodiálise Nº11 482, 2001*).

Águas Minerais Naturais de Nascente e Termas

As águas minerais naturais podem ser usadas na indústria de engarrafamento, assim como para fins termas. O Decreto-Lei 142/2003 de 11 de junho regula o “licenciamento, funcionamento, fiscalização de estabelecimentos termas”, estes estabelecimentos são definidos como unidades prestadoras de cuidados de saúde que usam as propriedades terapêuticas de uma água mineral natural com o objetivo de prevenir, tratar, reabilitar, manter a saúde, podendo também ser usada para atividades complementares.

O programa de vigilância das águas minerais naturais e de nascente nos estabelecimentos termas é baseado no Decreto-Lei nº82/2009 de 2 de abril com as alterações impostas pelo Decreto-Lei nº135/2013, sendo que ambos têm como ponto de partida o Decreto-Lei 142/2004 de junho.

De acordo com a legislação aplicável às águas termas, a Portaria nº1220/2000 de 29 de dezembro, baseada nos termos no nº2 do artigo 3º do Decreto-Lei 86/90 de 16 de março e do Decreto-Lei 156/98 de 16 de junho definiu-se que para que estas águas sejam consideradas bacteriologicamente próprias devem estar livres de:

- Parasitas e microrganismos patogénicos;
- *Escherichia coli*, outros coliformes e estreptococos fecais em 250 mL de amostra analisada;
- *Pseudomonas aeruginosa* em 250 mL de amostra analisada.
- Anaeróbios esporolados sulfitorreduzidores em 50 mL de amostra analisada;
- *Legionella pneumophila* e um limite de 100 UFC/ mL para *Legionella não pneumophila*.

Para além disso o teor de microrganismos viáveis deve corresponder ao microbismo natural e não deve ultrapassar 20 UFC/mL a 22 °C durante 72 horas e 5 UFC/mL a 37 °C durante 24 horas, para água em contacto com a mucosas, e 100 UFC/mL a 22 °C durante 72 horas e 20 UFC/mL a 37 °C durante 24 horas.

Piscinas

A legislação em vigor no que diz respeito à água de piscinas está descrita na circular normativa da Direção Geral da Saúde (DGS) 14/DA de 21/08/2009 que define os procedimentos a seguir relativamente à vigilância sanitária, as medidas que devem ser adotadas pelos serviços de Saúde Pública e indica os parâmetros físico-químicos e microbiológicos a analisar, bem como os valores paramétricos, como descrito na tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros microbiológicos, expressão dos resultados, valores de referência e métodos analíticos a utilizar para águas recreativas (circular normativo nº14/DA de 21/08/2009).

Parâmetros microbiológicos	Expressão dos resultados	Valores de Referência (VR)	Valores Limite (VL)	Métodos Analíticos
Microrganismos Cultiváveis a 36 °C	UFC/1 mL	≤100 *	-	ISO 6222
Bactérias Coliformes	UFC/100 mL	-	10	ISO 9308-1 modificada
<i>Escherichia coli</i>	UFC/100 mL	-	0	ISO 9308-1 modificada
Enterococos	UFC/100 mL	-	0	ISO 7899-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UFC/100 mL	-	0	ISO 12780 modificada
Estafilococos produtores de coagulase	UFC/100 mL	-	0**	NP-4343
Nº total de Estafilococos	UFC/100 mL	≤20*	-	NP-4343
<i>Legionella</i> ***	Nº/ 1000 mL	<10 ²	>10 ³	ISO 11731:1998

VR- Valor Recomendado; VL- Valor Limite

*o valor recomendado poderá ser ultrapassado uma vez por época de abertura ao público ou por ano civil;

**0/100 ml em 90% das amostras, sendo da responsabilidade dos serviços de saúde locais efetuar a avaliação no final da época o ano civil;

***em tanque de hidromassagem

O Programa de Vigilância Sanitária de Piscinas tem como principais objetivos a promoção da saúde e segurança para os utilizadores e trabalhadores, para isso é essencial que se faça uma avaliação dos perigos e fatores de risco de modo a fazer uma boa gestão, aplicando medidas corretivas adaptadas a cada situação.

Capítulo 3

3. Laboratório de Saúde Pública

3.1 Caracterização do Laboratório de Saúde Pública

O LSPG desenvolve a sua atividade no âmbito da avaliação da qualidade das águas, alimentos e produtos agroalimentares, de acordo com as exigências da legislação nacional e comunitária, com as recomendações da OMS e com as expectativas e necessidades dos seus clientes, de forma a dar cumprimento não só aos requisitos das normas NP EN ISO/IEC 17025 e NP EN ISO 9001, mas também aos requisitos regulamentares aplicáveis (Dionísio, 2022).

Inicialmente, o LSPG era um pequeno laboratório que surgiu para dar resposta às necessidades da Unidade de Saúde Pública (USP) no programa de vigilância de águas. No entanto, atualmente, é um laboratório acreditado e certificado, que alargou a sua área de abrangência para os distritos de Castelo Branco e de Viseu em prestação remunerada de serviços.

O LSPG é constituído por uma equipa dinâmica, jovem e bastante qualificada, o que permite assegurar que os resultados dados aos clientes são obtidos com rigor. É composta por uma farmacêutica especialista em análises clínicas, uma técnica superior de saúde, duas técnicas superiores, seis técnicas superiores de diagnóstico e terapêutica da área de na análises clínicas e saúde publica, um técnico superior de diagnóstico e terapêutica da área de saúde ambiental e três assistentes operacionais. Todos os membros da equipa do LSPG estão efetivos na ULSG o que garante o empenho e dedicação de toda a equipa (Dionísio, 2022).

A Coordenadora do laboratório assume também funções de Responsável Técnica Coordenadora (RTC) e existem ainda duas Responsáveis Técnicas (RT) uma para as áreas técnicas de microbiologia e colheitas de amostras da área de microbiologia, e outra para a área físico-química e colheitas da área físico química, sendo que em caso de ausência são substituídas pelas RTC conforme evidenciado no organigrama da figura 1.

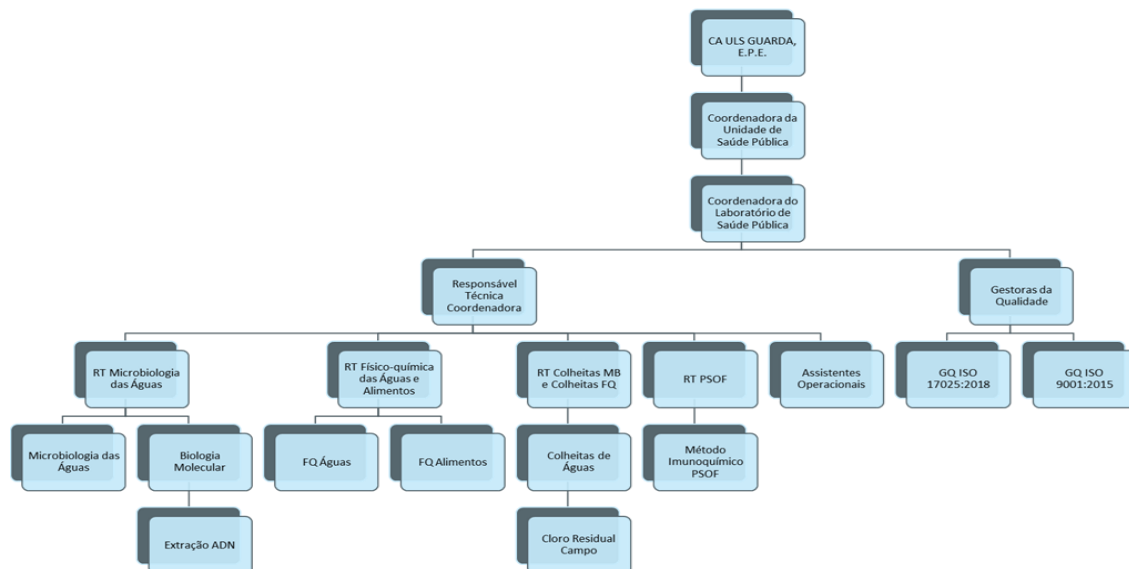


Figura 1- Organograma da Hierarquia de Responsabilidades do LSPG.

Fonte: (Dionísio, 2022)

Em 2011 o laboratório iniciou o processo de acreditação com 12 ensaios e atualmente já são 52 os parâmetros acreditados, conforme evidenciado na Figura 2.

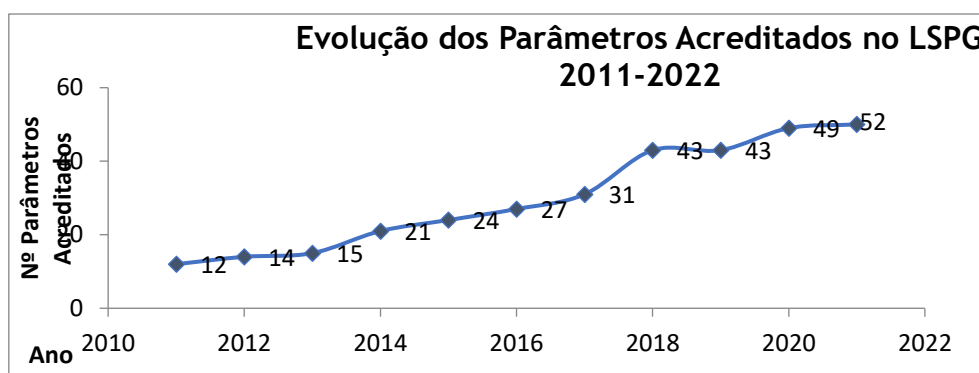


Figura 2- Evolução dos parâmetros acreditados no LSPG.

Fonte: Autoria própria

O LSPG encontra-se dividido em três setores, um deles dedicado a análises físico-químicas, outro a análises microbiológicas e o terceiro dedicado a análises de produtos biológicos no âmbito de rastreios de Saúde Pública, sendo que todos os setores estão sujeitos a rigorosos controlos de qualidade internos e externos, com o objetivo de obter resultados de excelência.

3.2 Sistema Integrado de Gestão da Qualidade (SIGQ)

O SIGQ é um conjunto de elementos interligados e integrados na organização do LSPG, que funcionam como uma engrenagem para atender à política da qualidade e aos seus objetivos.

Desta forma, a qualidade é assegurada com processos e procedimentos específicos definidos, sendo assegurada da melhor forma, atendendo à legislação aplicável e às expectativas e necessidades dos clientes.

O SIGQ é uma ferramenta que permite o controlo e a padronização dos processos, tornando possível a avaliação da eficácia das ações tomadas, com foco na satisfação do cliente e na procura da melhoria contínua.

Existem diversas vantagens para a implementação e manutenção de um SIGQ, entre as quais:

- Organização e melhoria da eficiência organizacional;
- Melhoria da execução, coordenação e da produtividade;
- Maior concentração nos objetivos e nas expectativas dos clientes.
- Obtenção e manutenção da qualidade dos serviços, a fim de satisfazer as necessidades dos clientes;
- Consciencialização dos colaboradores;
- Comunicação interna e externa;
- Harmonização de procedimentos;
- Avaliação e melhoria constante das competências dos colaboradores;
- Demonstração aos clientes e potenciais clientes da capacidade do LSPG;
- Abertura de novas oportunidades no mercado;
- Acreditação e Certificação com visibilidade externa e reconhecimento interno e externo.

No início de 2021, o LPSG decidiu iniciar o processo de certificação pela NP EN ISO 9001:2015, o que levou à necessidade de integração dos dois sistemas de gestão. A implementação desta norma no LSPG visou aumentar a satisfação do cliente através da aplicação eficaz do SIGQ, incluindo processos para a melhoria e para a garantia da conformidade, tanto com os requisitos do cliente como com as exigências legais aplicáveis (*NP EN ISO 9001:2015, 2015*).

A acreditação não é uma certificação, como muitas vezes é considerado. Existem, no entanto, requisitos em comum entre a norma de referência da acreditação de laboratórios, a norma ISO/IEC 17025 e a norma ISO 9001 que servem de base para o desenvolvimento dos sistemas de gestão da qualidade.

O sistema informático usado no LSPG é o LabWay-LIMS® que é uma mais-valia na implementação e manutenção dos processos de acreditação e certificação e na resposta às crescentes exigências dos clientes, permitindo informatizar todas as áreas do laboratório desde a programação de atividades, gestão das amostras, distribuição de trabalho, introdução de resultados, emissão de relatórios de ensaio, controlo da qualidade, publicação de resultados na Web, entre outras opções (Ambidata, 2022b).

Para além do LabWay-LIMS® o LSPG dispõe também de um programa de gestão documental com controlo de versões, o InnovWay® onde todos os procedimentos, normas, informações de recursos humanos dos colaboradores, calibrações e certificados são carregados e estão disponíveis para consulta de todos os colaboradores. Este *software* permite informatizar todas as áreas de gestão do LSPG (Ambidata, 2022a).

Acreditação NP EN ISO/IEC 17025

A entidade responsável em Portugal pela avaliação de laboratórios é o IPAC e as avaliações são executadas no momento da acreditação e periodicamente por uma equipa de auditores experientes. As exigências da acreditação são verificadas nas visitas periódicas dos auditores, todos os incumprimentos ou falhas podem mesmo resultar na suspensão ou anulação da acreditação. Por sua vez, o IPAC é avaliado por outras entidades internacionais, acreditadas e certificadas, isto só é possível devido a Acordos de Reconhecimento (Dionísio, 2022).

O processo de acreditação confere aos laboratórios uma maior credibilidade, que permite aos clientes obterem uma maior qualidade de serviços e também uma maior confiança no que diz respeito a todo o processo de análise e ao resultado obtido.

As maiores exigências na implementação da norma NP EN ISO/IEC 17025, estão associadas à capacidade dos laboratórios em cumprirem os requisitos das normas específicas à realização de cada tipo de ensaio ou calibração (métodos de ensaio ou calibração, estimativas da incerteza de medição, etc.). Para obter a acreditação, não é suficiente que o laboratório atue de acordo com os procedimentos descritos, é imperativo que os mesmos estejam corretos do ponto de vista científico e sejam rastreáveis.

A grande diferença entre a acreditação e a certificação é que a primeira não exige apenas um sistema de gestão da qualidade, mas também competência técnica para garantir a confiança nos resultados.

A acreditação permite ao laboratório demonstrar que é uma instituição respeitada, independente, imparcial e com competência reconhecida para a realização de determinados ensaios, uma vez que o laboratório é auditado periodicamente por um organismo de acreditação, o que transmite segurança e tranquilidade aos clientes. A acreditação permite também apoiar a cooperação e a parceria entre laboratórios e outras instituições, com o objetivo de trocar informações, promover a harmonização e padronização de procedimentos e normas (NP EN ISO/IEC 17025:2017, 2017).

Certificação NP EN ISO 9001

A certificação está associada à implementação de um conjunto de princípios e procedimentos de gestão e apesar de ser uma opção voluntária das organizações, é tida como uma mais-valia (Dionísio, 2022).

O objetivo da implementação da norma ISO 9001, é estabelecer um compromisso com a qualidade, executar atividades e disponibilizar os recursos necessários para melhorar a prestação dos serviços aos clientes, superando expectativas e destacando-se da concorrência. A norma ISO 9001 tem como principal objetivo melhorar continuamente a satisfação dos clientes a custos progressivamente menores. Para isto é necessário efetividade, eficácia e eficiência e também uma boa avaliação do risco. O foco no cliente, liderança, comprometimento das pessoas envolvidas, abordagem por processos, melhoria e a tomada de decisões baseadas em evidências são essenciais para que se atinja um elevado nível de qualidade e sucesso. O ciclo da qualidade de Deming PDCA (*Plan, Do, Check, Act*), representado na figura 3, a primeira fase do Ciclo (*Plan*) pressupõe a identificação dos problemas, a análise das causas e a definição de um plano de ação. São estabelecidos os objetivos e as metodologias a utilizar. Na fase seguinte implementam-se (*Do*) as ações previstas. Após a implementação são monitorizados (*Check*) e avaliados continuamente os resultados obtidos. Se for necessário, implementam-se medidas corretivas (*Act*), no sentido da melhoria contínua, recomeçando o ciclo (Calado, 2018).

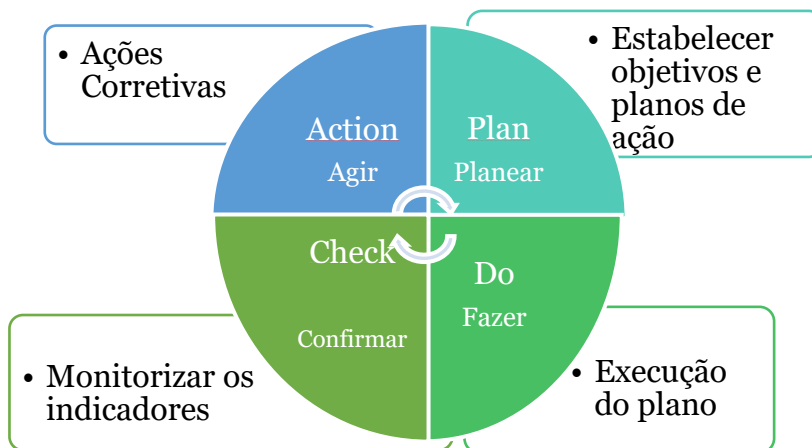


Figura 3-Ciclo PDCA

Fonte: Própria

Política Integrada da Qualidade

Os principais objetivos do LSPG são a prestação de serviços analíticos e de consultoria à população da sua área de influência, com o objetivo de aumentar os níveis de saúde e bem-estar da comunidade, com recurso a análises executadas com qualidade e rigor, para assegurar o maior profissionalismo cumprindo sempre os requisitos legais e normativos, garantindo assim uma prestação de serviços dentro dos mais elevados padrões da prática laboratorial. A política integrada da qualidade do LSPG assegura a melhoria contínua do sistema de gestão, promovendo formações e investigação, de modo a assegurar a qualidade dos serviços prestados que vão de encontro às necessidades dos clientes, para isso é essencial a implementação de um sistema de qualidade simples, mas eficiente. O LSPG assegura apoio qualificado e personalizado às necessidades de cada cliente

Na base da sua visão o LSPG tem como objetivo ser reconhecido por clientes como um laboratório de referência na zona centro do país pelos clientes, colaboradores e todas as outras entidades, que garante uma resposta com elevada qualidade, eficiência face as necessidades dos seus clientes pautando-se por rigorosos princípios de eficiência e responsabilidade económica, ambiental e social.

Os objetivos do LSPG são:

- Manutenção dos sistemas de gestão da qualidade implementados de acordo com o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025:2018 e também segundo o referencial normativo NP EN ISO 9001:2015;
- Garantir um sistema de gestão que vise o bom funcionamento do laboratório;
- Garantir imparcialidade e confidencialidade de toda a informação obtida antes e após a chegada das amostras ao laboratório;
- Garantir a competência técnica no âmbito de todas as atividades realizadas no laboratório;
- Garantir uma política de comunicação interna eficaz e uma boa divulgação do sistema de gestão da qualidade implementado, de modo a garantir que todos os colaboradores o conhecem, compreendem e implementam na execução das tarefas laboratoriais e garantem a melhoria contínua do mesmo;
- Garantir a satisfação máxima dos clientes, superando as suas expectativas e aumentando assim o número de clientes;
- Garantir um bom ambiente de trabalho e máxima motivação, proporcionando o total envolvimento e participação de todos os colaboradores afetos à organização;
- Fomentar a formação contínua e atualização profissional contínua e promovendo o envolvimento de toda a equipa;
- Garantir a melhoria contínua do sistema de qualidade e dos serviços prestados pelo LSPG;
- Aumentar o número de clientes;
- Selecionar e trabalhar os melhores fornecedores externos de modo a garantir a máxima qualidade dos seus produtos e serviços;

- Determinar os fatores suscetíveis de provocar desvios nos processos e no sistema de gestão da qualidade e implementar controlos preventivos e medidas corretivas para reduzir os aspetos negativos e maximizar as oportunidades que possam surgir, recorrendo ao pensamento baseado no risco.

A gestão de topo compromete-se a garantir as boas práticas profissionais e a qualidade dos seus serviços.

Capítulo 4

4. Procedimentos de Ensaio

4.1 Colheita, Transporte e Receção das Amostras de Água

A correta execução do procedimento de colheita de amostras de água é essencial para os programas de vigilância e controlo da qualidade da água, uma vez que uma colheita pouco rigorosa pode pôr em causa a amostra de água em análise, podendo levar até a resultados falsos positivos.

O controlo analítico inicia-se com a preparação da colheita da amostra, utilizando os frascos adequados e nas condições de conservação e transporte definidas em procedimento interno de modo que a integridade da amostra até à chegada ao laboratório não seja comprometida. Vários aspetos têm de ser tidos em conta ao longo deste processo, dependendo do tipo de amostra, do local de colheita e dos parâmetros a analisar. Na figura 4 está representado algumas das fases a ter em conta durante o processo de colheita e transporte das amostras (LSPG, 2021b).



Figura 4-Colheita em piscina, mala térmica com os respetivos termoacumuladores e amostras e colorímetro de campo.

Existem 2 tipos de frascos para colheitas para análises microbiológicas no LSPG de acordo com o tipo de matriz e com os parâmetros a analisar:

- Frascos estéreis de 500 mL, com 60 mg/L de tiosulfato de sódio, embalados individualmente.

- Frascos estéreis de 1000 mL, 120 mg/L com tiosulfato de sódio, embalados individualmente.

O tiosulfato de sódio é utilizado nos frascos de colheita com objetivo de inativar a ação do cloro presente nas amostras.

A identificação das amostras é imprescindível e deve ser feita diretamente no frasco de colheita e no impresso Registo de Colheita de Amostras de Água de forma inequívoca e indelével. Os registos têm de ter a seguinte informação:

- Identificação do Requisitante / Cliente;
- Identificação e descrição do local e do ponto de colheita;
- Data e hora da colheita;
- Registo da temperatura da primeira amostra de cada mala de transporte no local de colheita;
- Registo da temperatura da primeira amostra de cada mala de transporte no LSPG;
- Registo dos resultados dos ensaios de campo (determinação do teor de cloro residual livre, pH e temperatura) e no caso da colheita para *Legionella* registar a temperatura de colheita e a temperatura máxima que o sistema atinge;
- Registo do duplicado do cloro residual livre e a respetiva aceitação;
- Identificação do equipamento de medição de cloro (colorímetro);
- Identificação do tipo de amostra de água;
- Identificação dos parâmetros ou grupo de parâmetros a analisar na amostra;
- Verificação das condições adequadas nos pontos de colheita;
- Identificação do técnico responsável pela colheita da amostra;
- Outros aspetos considerados relevantes como por exemplo: alteração do ponto de colheita e/ou todas as situações tidas como anormais.

Quando as amostras chegam ao laboratório inicia-se o processo de receção, onde se verifica se os frascos são adequados e se as condições de transporte foram asseguradas. As amostras são recebidas por um técnico que, de acordo com o procedimento interno verifica se as condições estão garantidas e regista:

- A hora de chegada;
- A hora da primeira e da última colheita de cada mala térmica;
- A temperatura medida no laboratório.

A temperatura de chegada das amostras ao laboratório deve ser igual ou inferior à temperatura no momento da colheita para que não ocorra proliferação de microrganismos.

4.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura permitem aos microrganismos obter os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Uma vez que os microrganismos têm necessidades nutricionais bastante diferentes entre si, é essencial que existam diversos meios de cultura capazes de cumprir as exigências de cada um deles. As concentrações dos componentes do meio devem ser adequadas para não pôr em causa a viabilidade dos microrganismos e permitirem o seu estudo e identificação, tais como as condições de incubação favoráveis, o pH, indicador e condições de incubação.

No que diz respeito ao estado físico os meios podem dividir-se em líquidos, sólidos ou semi-sólidos. Um meio é considerado sólido se na sua composição estiver presente um agente solidificante tal como o agar, que ao contrário da gelatina, também ela um agente solidificante, não é biodegradado pelos microrganismos, conferindo assim uma grande solidez ao meio. Os meios sólidos proporcionam uma superfície firme o que permite um crescimento dos microrganismos em colónias. Os meios de cultura líquidos, que não possuem agentes solidificantes, são também conhecidos como caldos o seu armazenamento é feito em tubos.

Os meios de cultura podem também ser classificados em meios de enriquecimento, meios seletivos e meios diferenciais. Os meios de enriquecimento fornecem nutrientes necessários ao crescimento de microrganismos que possam estar presentes em número reduzido ou que tenham um crescimento sendo adequados para microrganismos fastidiosos e/ou exigentes do ponto de vista nutricional. Os meios de cultura seletivos promovem o crescimento do microrganismo alvo inibindo o crescimento de outros microrganismos. Por último, nos meios diferenciais pode ocorrer o crescimento de diferentes tipos de microrganismos, no entanto é possível distinguirem-se os diferentes tipos de colónias, pelo seu tamanho, cor da colónia ou pela cor do próprio meio, na tabela 4 estão identificados os meios usados no LSPG de acordo com as suas características (Martins, 2013, LSPG, 2021a, *ISO 11133:2015-Microbiologia de alimentos, ração animal e água – Preparação, produção, armazenamento e testes de desempenho de meios de cultura.*, 2014).

Tabela 4-Caracterização dos meios usados no LSPG.

Meios não seletivos	WPCA
Meios de Enriquecimento	Caldo Brain Heart, GS
Meios Seletivos	LSA, SB, CP, MAS, PSCN, SKIM-MILK, CCA, EC, TSA, BE, MSA
Meios Diferenciais	Citrato de Simmons, PSCN, MSA, MEVAG, CCA, LSA, Fluorocult

No LSPG a maioria dos meios de cultura são adquiridos prontos a usar, recorrendo a fornecedores certificados de acordo com a norma ISO 9001 e que emitam certificados de qualidade de acordo com a norma ISO/TS 11133 (LSPG, 2022a). No entanto, alguns meios são preparados no laboratório, semanalmente, dependendo das necessidades, determinadas consoante o mapa de amostras (LSPG, 2021a).

Os meios preparados mais frequentemente no LSPG são: Water Plate Count Agar (WPCA), Fluorocult-Dev (Fl), Meio Triptose Sulfito Cicloserina (CP), Gelose de Bilis Esculina (BE) e Água Peptonada a 1% (PE) (LSPG, 2022a).

Características dos Meios de Cultura e Reagentes

Membrana Lauril Agar (LSA)

O LSA é um meio seletivo e diferencial que tem capacidade de inibir bactérias diferentes de coliformes incluindo bactérias esporuladas.

A peptona fornece azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais ao crescimento. O extrato de levedura é uma fonte de vitaminas, principalmente do grupo B. Os hidratos de carbono são fornecidos pela fermentação da lactose. O Lauril Sulfato de Sódio é o agente seletivo capaz de inibir outras espécies não coliformes, as bactérias aeróbias esporuladas são completamente inibidas. As bactérias coliformes e *E.coli* têm capacidade de fermentar a lactose presente no meio LSA e a fermentação promove a acidificação do meio o que vai por sua vez alterar a estrutura do indicador de pH (vermelho de fenol) levando à alteração da cor do meio de vermelho para amarelo, cor das colónias típicas destas bactérias (amarelas com halo) e atípicas (amarelas sem halo ou alaranjadas). O grupo de coliformes é aeróbio e anaeróbio facultativo, Gram-negativo, não forma esporos, fermenta a lactose com a produção de ácido e gás a 36 °C em 48 horas.

Fluorocult-DEV

O meio Fluorocult-DEV é um caldo lactosado, neste meio verifica-se a fermentação da lactose pela acidificação do meio, este meio é incubado a (36±2) °C e também a (44±0,5) °C durante (21±3) horas para permitir distinguir coliformes totais, fecais e *E.coli*, apenas os coliformes fecais e *E.coli* são capazes de fermentar a lactose a (44±0,5) °C, em caso positivo a (44±0,5) °C observa-se a fluorescência sob luz ultravioleta, para distinguir os coliformes fecais de *E.coli* salvo algumas exceções. Se a fluorescência for negativa após 24h de incubação, voltar a incubar os tubos Fluorocult-DEV por mais (21±3) horas. A observação da fluorescência sob luz UV indica que o composto MUG

existente no meio foi degradado pela ação da enzima β -glucuronidase e podemos presumir-se que se está perante uma *E.coli*. Para efeitos de controlo de qualidade é efetuado em paralelo com as amostras um teste de controlo em que como controlo positivo usa-se uma estirpe lactose positiva *E.coli* e como controlo negativo uma estirpe lactose negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

Citrato Simmons

Meio comercializado em tubo recomendado para a diferenciação de *Enterobacteriaceae* (bacilos Gram-negativos entéricos) com base na utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono e de sal inorgânico de amónio como fonte de azoto. Se a bactéria usa o citrato como única fonte de carbono, o citrato é removido do meio e vai correr libertação de dióxido de carbono e de sódio, esta libertação provoca aumento do pH e alteração da cor do meio de verde para azul. Este meio é incubado apenas a (36 ± 2) °C durante (44 ± 4) horas. A *E.coli* não é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono, este teste permite retirar algumas dúvidas acerca de estirpes de *E.coli* que não são capazes de degradar o MUG e também distinguir *E.coli* de uma estirpe de *Klebsiella* que se comporta de forma semelhante à *E.coli* mas que por sua vez é capaz de usar o citrato como única fonte de carbono. Em paralelo com as amostras para efeitos de controlo de qualidade é efetuado, um teste a uma enteobacteriácea citrato negativa (*E.coli*) e a outra citrato positiva (*Klebsiella spp*).

Chromogenic Coliform Agar (CCA)

O meio CCA é um meio cromogénico seletivo e diferencial para a pesquisa e quantificação de *Escherichia coli* e bactérias coliformes totais segundo a Norma de Ensaio ISO 9308-1. Este meio pode ser usado para amostras de água com uma carga microbiológica baixa, por isso, é usado para águas de processo (hemodiálise).

A digestão enzimática da caseína fornece aminoácidos, nitrogénio, carbono, vitaminas e minerais necessários para o crescimento bacteriano. O extrato de levedura é uma fonte de vitaminas, sobretudo do grupo B. O cloreto de sódio mantém o balanço osmótico do meio de cultura e os fosfatos atuam como soluções-tampão. O piruvato de sódio facilita a recuperação de microrganismos danificados. O sorbitol é o hidrato de carbono presente no meio que será fermentado pelos microrganismos. O triptofano foi incorporado no meio de cultura para permitir testes de confirmação (teste do indol) de espécies de *Escherichia coli*. O Tergitol®7 inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas. O Salmon® - GAL é o substrato da β -D-galactosidase, enzima expressa por todas as bactérias coliformes. O X-Glucuronídeo é um substrato cromogénico da enzima característica da *Escherichia coli*, a β -D-glucuronidase. A combinação destes dois substratos cromogénicos permite diferenciar espécies de *Escherichia coli* de outras bactérias coliformes com base na cor das colónias. A *E.coli* vai adquirir uma cor azul pois expressam as enzimas β -D-galactosidase e β -D-glucuronidase, nas colónias

que adquirem logo a cor azul, os resultados para *E.coli* são dados imediatamente. No caso das colónias de coloração rosa-avermelhada, estas são consideradas colónias presuntivas de bactérias coliformes não *E.coli* uma vez que apenas tiveram com reação positiva para a presença da enzima β -D-galactosidase O IPTG é um indutor da expressão de β -D-galactosidase.

Triptose Sulfito Cicloserina (CP)

É um meio seletivo utilizado para a pesquisa e quantificação de *Clostridium perfringens* segundo a norma ISO 14189. A peptona de soja e a triptose fornecem azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais ao crescimento. O extrato de levedura é uma fonte de vitaminas principalmente do grupo B. O metabissulfito de sódio e o citrato de ferro amoniacal são os indicadores da redução do sulfito pelas espécies de *Clostridium*. A cicloserina é um antibiótico, agente inibidor de bactérias Gram-negativas, de bactérias do género *Bacillus* e de outros anaeróbios facultativos. As colónias que produzem sulfureto de hidrogénio são caracterizadas por um escurecimento devido à reação com o sal férrico. Após 24 horas de incubação, todas as colónias pretas, são consideradas como *C. perfringens* presumíveis. Em meio de cultura CP este microorganismo produz colónias negras, devido à redução sulfitos a sulfuretos. Estas bactérias são imóveis, reduzem os nitratos a nitritos, produzem ácido e gás a partir da lactose e liquefazem a gelatina.(Martins, 2018)

Gelose Columbia 5% S. Carneiro (GS)

Gelose nutritiva para crescimento de uma grande variedade de microrganismos, enriquecido, utilizado para pesquisa de estirpes bacterianas fastidiosas. A adição de sangue de carneiro permite observar a produção de zonas de hemólise, característica de algumas espécies de bactérias. Este meio é utilizado como um dos testes confirmatórios para a Pesquisa e quantificação de *Clostridium perfringens* uma vez que as colónias características têm capacidade de realizar β -hemólise na gelose de sangue.

Triptose Sulfito Agar Base (EC)

Meio seletivo utilizado para pesquisa e quantificação de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-reductoras segundo a EN 26461-2. A peptona de soja e a triptose fornecem azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais ao crescimento. O extrato de levedura é uma fonte de vitaminas principalmente do grupo B. O metabissulfito de sódio e o citrato de ferro amoniacal

são os indicadores da produção de H₂S. As colónias que produzem sulfureto de hidrogénio são caracterizadas por um escurecimento devido à reação com o sal férrico. Após 24 horas de incubação, todas as colónias pretas, são consideradas como esporos de *Clostridium* sulfito-redutores.

Slanetz & Bartley Agar (SB)

Meio seletivo para pesquisa e quantificação de Enterococos fecais. A triptose fornece azoto, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais ao crescimento. O extrato de levedura é uma fonte de vitaminas principalmente do grupo B. Os hidratos de carbono são fornecidos pela fermentação da glucose. O fosfato de hidrogénio disódico é o tampão. A azida de sódio é o agente inibidor de bactérias Gram-negativas. O cloreto 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) incolor é reduzido a formazona pelos *Enterococcus* dando origem a colónias vermelhas.

Bílis- esculina (BE)

O meio BE é usado para o teste confirmatório na pesquisa de Enterococos fecais uma vez que estes têm capacidade de hidrolisar a esculina presente no meio em 2 horas. O produto final, 6,7-dihidroxicumarina, combinada com os iões de ferro III do meio, formam uma cor negra difusa no meio. Neste teste confirmatório o meio deve ser pré-aquecido a 44°C durante 15 minutos, as placas devem ser lidas 2 horas após a transferência, as amostras em análise são acompanhadas por um controlo positivo (*Enterococcus faecalis*) e um controlo negativo (*Escherichia coli*).

Pseudomonas CN Agar (PS-CN)

Meio seletivo e diferencial usado para a pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*. A produção de piocianina é uma característica da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. A produção deste pigmento é favorecida pelo cloreto de magnésio e sulfato de potássio, presente no meio. A cetrimida funciona como inibidor de outras espécies bacterianas. As colónias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam uma cor verde com fluorescência sob luz ultravioleta, existem ainda colónias atípicas produtoras de pigmento sem fluorescência e colónias atípicas sem pigmento, com ou sem fluorescência (UV).

Skim Milk (SM)

Meio de cultura que permite pesquisar a presença da enzima casease no procedimento de pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*. A espécie *Pseudomonas aeruginosa* possui a enzima casease. O meio de Skim Milk é constituído por cetrimida e leite e permite detetar a produção desta enzima, pela coagulação ou digestão da caseína do leite, acompanhado por vezes de um pigmento esverdeado difusível no meio. Para efeitos de controlo de qualidade faz-se em paralelo com as amostras controlos para assegurar a qualidade dos meios, como controlo positivo usa-se uma estirpe casease positiva da *Pseudomonas aeruginosa* e como controlo negativo uma estirpe casease negativa da *Pseudomonas fluorescens*.

Manitol Salt Agar (MSA)

Meio seletivo e diferencial usado para a pesquisa e quantificação de estafilococos em amostras de água. É um meio seletivo uma vez que tem elevadas concentrações de cloreto de sódio, que permite obter um meio altamente salino, altamente seletivo que inibe a maioria das outras bactérias, com exceção de poucas espécies halófilas. Os estafilococos fermentam o manitol, provocando uma acidificação do meio o que vai levar a uma alteração da estrutura do indicador de pH vermelho de fenol e provoca a alteração da cor do meio de vermelho para amarelo. As colónias características têm a cor amarela ou branca.

M.E.V.A.G.

Meio utilizado para diferenciar o género de *Staphylococcus* do género *Micrococcus*. Este meio tem glucose na sua constituição, este açúcar é fermentado pelos estafilococos ao longo de todo o tubo de MEVAG tanto em aerobiose como em anaerobiose, uma vez que os estafilococos são aeróbios e anaeróbios facultativos. A fermentação da glucose leva à acidificação do meio, alteração da estrutura do indicador de pH púrpura de bromocresol e alteração da cor do meio de púrpura para amarelo. Os *Staphylococcus* fermentam a glucose enquanto os *Micrococcus* a oxidam, reação que requer oxigénio e provoca acidificação do meio apenas à superfície. Neste teste respiratório como controlos utilizamos o *Micrococcus luteus* como controlo negativo e como controlo positivo o *Staphylococcus aureus*.

Brain Heart Infusion (BH)

Meio líquido altamente nutritivo recomendado para cultura de diversos microrganismos fastidiosos. Meio usado no LSPG no procedimento de pesquisa e quantificação de estafilococos coagulase positiva. Meio de pré-enriquecimento usado no âmbito das especificações do reagente da coagulase usado no LSPG. Neste teste confirmatório como controlos utiliza-se o *Staphylococcus epidermidis* como controlo positivo que posteriormente vai ser o controlo negativo no teste da coagulase uma vez

que este é um estafilococo coagulase negativa e como controlo positivo o microrganismo alvo o *Staphylococcus aureus*, coagulase positiva.

Colilert-18®

Usado para a pesquisa e quantificação de coliformes totais, *Escherichia coli* e coliformes fecais. Quando os coliformes metabolizam o nutriente indicador do Colilert-18®, orto-nitrofenil- β -Dgalactopiranosídeo (ONPG), a amostra fica amarela. Quando a *Escherichia coli* metaboliza o 4-metilumbeliferil- β -D-glicurónico (MUG) a amostra emite fluorescência sob luz ultravioleta (365nm). São os realizados procedimentos de controlo de qualidade mensais não só dos meios de cultura, mas também para controlo analítico, para isso, como controlo positivo é usada uma estirpe de *Escherichia coli* e como controlo negativo uma estirpe *Pseudomonas aeruginosa*.

Enterolert-E® (E)

Usado para a pesquisa e quantificação de enterococos fecais em amostras de água com maior grau de contaminação. Os Enterococos fecais têm a enzima β -D-glucosidase, esta enzima tem capacidade de metabolizar o nutriente indicador do Enterolert-E, 4-metil-umbeliferil β -Dglucosídeo, o que faz com que a amostra emita fluorescência sob luz ultravioleta (365nm). Para garantir que os substratos estão viáveis e que permitem detetar o microrganismo alvo são feitos mensalmente produtividades e controlos de cada lote de substrato que é utilizado, como controlo positivo é usada uma estirpe de *Enterococcus faecalis* e como controlo negativo *Serratia marescens* e *Aerococcus viridas*.

Enterolert-DW® (DW)

Usado para a pesquisa e quantificação de enterococos fecais em amostras de águas mais limpidas. Os *Enterococos fecais* têm a enzima β -D-glucosidase, esta enzima tem capacidade de metabolizar o nutriente indicador do Enterolert-DW®, Orto-Nitrofenil- β -Dglucosídeo, a cor da amostra é alterada de azul para verde. Qualquer alteração de cor é considerada como um resultado positivo. Para garantir que os substratos estão viáveis e que permitem detetar o microrganismo alvo são feitos mensalmente produtividades e controlos de cada lote de substrato que é utilizado, como controlo positivo é usada uma estirpe de *Enterococcus faecalis* e como controlo negativo *Serratia marescens*.

Pseudalert® (Pseud)

Usado para a pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* (ISO 16266-2) em amostras de água. Quando as *Pseudomonas aeruginosa* metabolizam o nutriente indicador do Pseudalert® a amostra emite fluorescência azul sob luz ultravioleta (365nm). A *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo com capacidade de crescer em meio de cultura líquido seletivo. A *P.aeruginosa* expressa a enzima a 7-amino-4-metilcumarina aminopeptidase, que tem capacidade de hidrolisar o substrato 7-amino-4-metilcumarina presente no Pseudalert®. O resultado desta reação de hidrólise é a emissão de fluorescência sob luz ultravioleta (UV), este método não carece da realização de testes confirmatórios. Para garantir que os substratos estão viáveis e que permitem detetar o microrganismo alvo são feitos mensalmente produtividades e controlos de cada lote de substrato que é utilizado, como controlo positivo é usada uma estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* e como controlo negativo *Pseudomonas fluorescens*.

Legiolert® (Legio)

Usado para a pesquisa e quantificação de *Legionella pneumophila* em amostras de água. A tecnologia do Legiolert é baseada na deteção de enzimas bacterianas que sinalizam a presença da *Legionella pneumophila* através da utilização de um substrato rico em aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes. As estirpes da *Legionella pneumophila* em crescimento ativo usam o substrato para produzir um indicador castanho ou para provocar a turvação do meio. Todos os lotes de Legiolert® usados nesta metodologia são rastreados.

Reagente da Oxidase

O reagente da oxidase contém na sua composição N,N,N,N-Tetrametil-p-fenilenediamina dihidroclorido, que na presença da enzima citocromo oxidase leva à formação de um composto de cor azul. Este teste permite detetar a presença ou ausência da enzima citocromo oxidase em alguns microrganismos, o resultado do teste deve ser lido de acordo com a tabela 5. As bactérias coliformes e *E.coli* não possuem a enzima citocromo oxidase e por isso são oxidase negativas. Todas as bactérias da família das *Enterobacteriaceae* são oxidase negativa, por outro lado as bactérias da família das *Pseudomoneaceae* são oxidase positivas. Para efeitos de controlo de qualidade é efetuado um teste confirmatório por cada sessão de trabalho em paralelo com as amostras, usando uma estirpe oxidase negativa (*E.coli*) e outra oxidase positiva (*Pseudomonas aeruginosa*).

Tabela 5- Leitura do teste da oxidase.

Reação Positiva	coloração azul-escuro a púrpura no espaço de 30 segundos.
------------------------	---

Reação Negativa	não aparece nenhuma coloração ou a coloração aparece após os 30 segundos.
------------------------	---

Reagente Kovac's

Este reagente é usado como teste confirmatório para a pesquisa de *E.coli* uma vez que permite pesquisar microrganismos produtores de indol. Devem adicionar-se ao meio 0,2 a 0,3mL de reagente de Kovac's a um caldo de triptofano (meio Fluorocult-DEV) previamente inoculado com colónias em estudo, seguidamente observa-se o aparecimento de um anel vermelho (teste positivo) ou de um anel incolor (teste negativo). Este revelador liga-se ao indol presente no meio, produto final da degradação do triptofano em ácido pirúvico pela *E.coli*, originando um anel vermelho. No caso da avaliação da produção de indol e de β -glucuronidase é utilizado como controlo negativo o *Citrobacter freundii* e como controlo positivo a *E.coli*.

Reagente da Fosfatase Ácida

Este reagente permite detetar a presença ou ausência da enzima fosfatase ácida, permitindo identificar o *Clostridium perfringens* a partir de colónias isoladas a partir de de meio CP. A enzima fosfatase ácida produzida por *C. perfringens* catalisa a hidrólise do α -naftilfosfato, ocorrendo a liberação de α - naftol e fosfato que forma um corante com diazónio o-dianisidina, o teste é efetuado de acordo com as instruções do fabricante. Uma cor púrpura desenvolvida dentro de 3-4 minutos é considerada uma reação positiva. Também neste teste confirmatório são realizados controlos para assegurar que o reagente está a fornecer o resultado esperado quando em contacto com o controlo positivo e com o negativo, de modo a não fornecer falsos positivos nem falsos negativos, neste caso como controlo positivo usa-se a estirpe *Clostridium perfringens*, como controlo negativo utiliza-se o *Clostridium bifermentans*.

Reagentes da Coloração de Gram

Coloração que permite classificar quanto ao tipo de morfologia e estrutura da parede celular bacteriana dois grandes grupos de bactérias: Gram positivas (roxas) e Gram-negativas (vermelhas). É usada no LSPG na pesquisa e quantificação de estafilococos totais e coagulase.

Composição:

- a) Solução cristal violeta – Corante primário;

- b) Solutio de Lugol – Mordente;
- c) Solução Álcool-acetona – Agente Descolorante;
- d) Solução Safranina – Contrastante.

As bactérias Gram-positivas têm a parede celular composta por mureína (peptídeoglicano - peptídeo de ácido n-acetil murâmico) e durante o processo de descoloração com álcool etílico retêm o corante primário, permanecendo com a coloração conferida pelo mesmo (roxo). Já as bactérias Gram-negativas, com parede celular composta predominantemente por ácidos gordos (lipopolissacarídeos e lipoproteínas) perdem o complexo formado pelo mordente e são incapazes de reter o Cristal violeta, assumindo a cor da corante safranina (vermelha).

Reagente da Catalase

Reagente para a deteção da enzima catalase, que diferencia o género *Staphylococcus* do género *Streptococcus*. O peróxido de hidrogénio é um produto decorrente do metabolismo celular em organismos expostos ao oxigénio atmosférico. Sendo tóxico para as células, o peróxido tem de ser rapidamente convertido numa espécie química que seja inócua. A catalase cliva o peróxido de hidrogénio, tóxico para a célula, em água e oxigénio.

Procedimento:

1. Colocar uma gota do reagente numa lâmina limpa e adicionar 1-2 colónias suspeitas.
2. Observar a formação ou não de bolhas de gás (oxigénio).

Reagente da Coagulase (Coag)

Reagente contendo plasma de coelho para a deteção da enzima coagulase, característica de espécies de *Staphylococcus aureus*. A coagulase é uma enzima capaz de coagular o plasma sanguíneo. Para efeitos de controlo de qualidade fazem-se controlos em paralelo com as amostras, usa-se para isso uma espécie coagulase positiva *Staphylococcus aureus* como controlo positivo e uma espécie coagulase negativa *Staphylococcus epidermidis* como controlo negativo.

Preparação e inoculação do reagente:

1. Dissolver o conteúdo do frasco R1 em 10 ml de diluente R2.
2. Dividir em frações de 500µL em tubos de vidro esterilizados devidamente rotulados com o número de lote e a validade do mesmo.

3. A partir do caldo de enriquecimento (Caldo Brain-Heart) inoculado com a colônia suspeita, homogeneizar e pipetar 500µL para o tubo que contém o reagente da coagulase.
4. Incubar a 37°C durante 24 horas, fazendo uma leitura ao fim de 4 horas de incubação.

4.3 Material e Equipamentos

- Autoclaves;
- Estufas de esterilização;
- Banhos calibrados a (75±5) °C e a (45±1) °C;
- Estufas de incubação calibradas às temperaturas definidas para cada ensaio;
- Câmara com lâmpada ultravioleta com comprimento de onda 365nm;
- Campânulas de anaerobiose;
- Geradores de anaerobiose;
- Indicadores de anaerobiose;
- Equipamento para filtração por membrana;
- Membranas de celulose, de 22 mm e poro de 0,45 µm e de 47 mm e poro de 0,45 µm;
- Frascos estéreis anti espuma (para 100 mL) para as metodologias de NMP;
- Kit de suplemento da dureza da água (Legiolert®);
- Máscaras de proteção pessoal tipo PFR P2;
- Medidor de pH;
- Micropipetas calibradas;
- Pinças estéreis;
- Pipetas calibradas;
- Placas de Petri estéreis com 90mm de diâmetro;
- Pontas estéreis;
- Quanti-Tray® comparador;
- Quanti-Tray®;
- Selador Quanti-Tray®;
- Termômetros calibrados a (75±5) °C e a (45±1) °C;
- Tiras para medição da dureza da água;
- Tubos estéreis.

4.4 Métodos de Sementeira

4.4.1 Incorporação

O método de incorporação consiste na inoculação de amostras por incorporação com um meio não seletivo, em placas de Petri. Este método permite realizar uma quantificação de microrganismos fornecendo uma informação útil para assegurar e vigiar a qualidade da água, este método pode ser aplicado a todos os tipos de matrizes de água. A contagem de colónias é importante para assegurar a integridade das fontes de água e assegurar a eficácia dos processos de tratamento, fornece um indicador da qualidade de limpeza e integridade dos sistemas de distribuição. O valor médio das colónias é usado para monitorizar alterações, qualquer aumento acentuado da contagem é um aviso precoce de poluição séria.

4.4.2 Membrana Filtrante

O procedimento de filtração é aplicável à pesquisa e quantificação de várias bactérias em matrizes como águas de piscinas, águas minerais naturais de nascente e termais, águas naturais doces superficiais e subterrâneas e águas de processo como é o caso das hemodiálises, tendo sempre em conta que a flora e a matéria em suspensão não devem interferir com a filtração, cultura e contagem.

Esta sementeira é baseada na filtração através de uma membrana de celulose fazendo seguidamente a incubação em meio de cultura adequado. Posteriormente serão realizados os testes confirmatórios, sempre que necessário.

O método de sementeira por membrana filtrante requer um conjunto de procedimentos para garantir uma desinfeção eficaz dos pontos de filtração e assim evitar que ocorram contaminações. Antes de iniciar a sessão de trabalho é necessário desinfetar a rampa de acordo com o procedimento:

1. Ligar o Bico de Bunsen de modo a proporcionar um ambiente estéril.
2. Pulverizar os pontos de filtração da rampa com álcool a 70% e flamejar com o maçarico.
3. Queimar à chama os discos e colocá-los nos pontos de filtração, flamejando-os de novo após serem colocados nos pontos.
4. Retirar os copos do dispensador e colocá-los nos pontos de filtração (ter sempre cuidado ao manipular o copo de filtração para evitar uma possível contaminação do mesmo).

5. Ligar a Bomba.
6. Filtrar 100 mL de hipoclorito de sódio (lixívia) a 10% e de seguida filtrar 100 mL de água destilada estéril.
7. Descartar os copos.
8. Voltar a colocar álcool sobre os pontos e voltar a flamejar.

É essencial fazer-se a desinfeção da pinça, uma vez que é necessária para manipular as membranas de celulose usadas para as amostras. Entre cada amostra é necessário desinfetar o ponto de filtração seguindo o procedimento anteriormente descrito e ilustrado na figura 5.(LSPG, 2021f)



Figura 5-Procedimento de desinfeção da rampa de filtração.

4.4.3 Método do Número Mais Provável

O NMP é um método enzimático baseado no crescimento de microrganismos alvo em meio líquido e no cálculo de NMP de organismos tendo como referência tabelas estatísticas. Os métodos de NMP são baseados no uso de substratos enzimáticos ligados a compostos cromogénicos e fluorogénicos para deteção de atividades enzimáticas específicas. Este método não necessita de testes confirmatórios e é aplicável a todos os tipos de água, incluindo aquelas que contêm uma quantidade apreciável de matéria em suspensão. As técnicas de NMP para a contagem de microrganismos, são rápidas e permitem avaliar estatisticamente o número dos microrganismos presentes numa amostra. O método de NMP é uma técnica de simples execução e que permite dar resultados num curto período, em 24 horas é possível fazê-lo, exceto para a metodologia de Legiolert® em que os resultados demoram cerca de 7 dias a ser obtidos. A rapidez deste método permite responder de forma célere aos clientes e maximizar os recursos humanos devido à não necessidade de realizar testes confirmatórios.

4.5 Procedimentos de Ensaio

4.5.1 Quantificação de microrganismos cultiváveis a 37 °C e a 22 °C segundo a Norma de Ensaio ISO 6222:1999

Os microrganismos presentes nas águas são provenientes de diversas fontes entre as quais o solo e a vegetação. A quantificação de microrganismos fornece informação essencial para garantir e vigiar a qualidade da água. Existem microrganismos capazes de formar colónias a 36 °C e a 22 °C em aerobiose e por esse motivo as contagens são feitas separadamente a estas temperaturas. A contagem dos microrganismos cultiváveis é vantajosa pois estes funcionam como indicadores da qualidade da limpeza e a integridade do sistema de distribuição de água.

O meio usado na Técnica de Sementeira por Incorporação é o meio WPCA, um meio não seletivo para todos os microrganismos cultiváveis na água tal como definido na norma ISO 6222:1999 - Enumeração de microrganismos cultiváveis. Todas as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, leveduras e fungos com capacidade de formar colónias em meio WPCA nas condições descritas são consideradas Microrganismos Cultiváveis (*ISO 6222:1999- Qualidade da água Enumeração de Microrganismos cultiváveis-Contagem de colónias em meio nutritivo de agar.*, 1999).

Procedimento

1. Pipetar 1 mL da amostra para uma placa de Petri estéril e faz-se a incorporação da mesma usando entre 15 a 20 mL de WPCA. O tempo entre a pipetagem da amostra e a incorporação da mesma não deve exceder os 15 minutos.
2. Realizar movimentos circulares de modo a permitir uma melhor homogeneização. A incorporação de cada uma das amostras é feita em duplicado para cada uma das temperaturas.
3. As placas devem incubar invertidas em condições de aerobiose. O tempo de incubação depende do tipo de matriz a analisar e está descrito na tabela 6 (*ISO 6222:1999- Qualidade da água Enumeração de Microrganismos cultiváveis-Contagem de colónias em meio nutritivo de agar.*, 1999, LSPG, 2018c).

Tabela 6- Período de incubação do meio WPCA de acordo com o tipo de matriz

Matriz	36 ± 2°C	22 ± 2°C
Águas de Piscinas	24 horas	-----
Águas Minerais Naturais, de Nascente e Termais	24 horas	68 ± 4 horas
Águas de consumo e águas de processo (para uso industrial e hemodiálise)	44 ± 4 horas	68 ± 4 horas

4. Proceder à contagem das colónias nas placas assim que sejam retiradas das estufas, tal como apresentado na figura 6. Caso não seja possível, manter as placas a (5± 3) °C, sem ultrapassar as 48 horas. O resultado apresentado é o da média das duas placas, sempre que o valor dos duplicados seja aceite pelo critério de precisão calculado para o parâmetro em questão. Resultados inferiores a 10 N são aceites pela tabela de Lightfoot. Quando os resultados estiverem fora dos critérios de aceitação, o LSPG dá como resultado o valor do duplicado mais elevado.

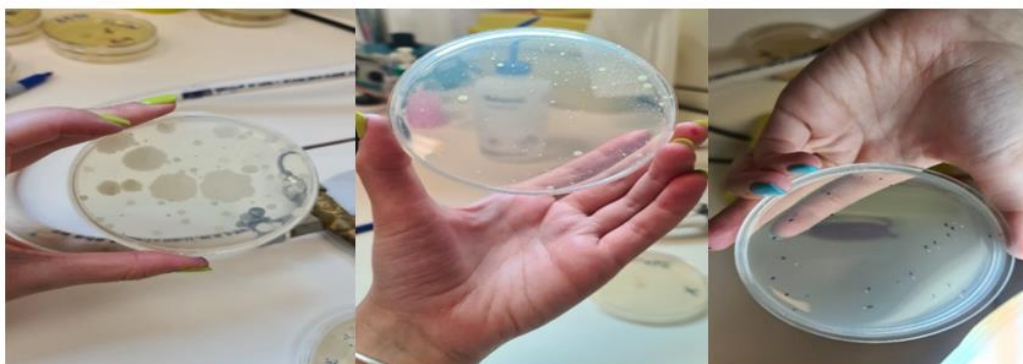


Figura 6- Microrganismos cultiváveis a 37°C e 22°C em WPCA

Os resultados são expressos por mL de amostra para cada temperatura de incubação.

- Se não houver contagem de colónias nas placas inoculadas, expressa-se o resultado como 0 N/mL;
- Nas águas de piscinas, se a contagem de colónias nas placas inoculadas for superior a 100, expressa-se o resultado como > 100 N/mL;
- Nas restantes matrizes referidas, se a contagem de colónias nas placas inoculadas for superior a 300, expressa-se o resultado como > 300 N/mL.

No relatório de ensaio os resultados são expressos em N/mL, em que N ⇔ NMP ⇔ UFC, os valores paramétricos definidos de acordo com a legislação vigente estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 -Valores paramétricos para a quantificação de microrganismos cultiváveis a 22°C e a 37°C de acordo com cada matriz e com a legislação vigente.

Matriz	Número de colónias a 22°C (VP)	Número de colónias a 37°C (VP)
Águas de Piscinas	----	≤20 UFC/100mL
Águas Minerais Naturais, de Nascente e Termiais	20 UFC/100mL	5 UFC/100mL
Águas de consumo e águas de processo (para uso industrial e hemodiálise)	100 UFC/100mL	20 UFC/100mL

4.5.2 Pesquisa e Quantificação de bactérias coliformes e *E.coli*

O grupo dos coliformes totais abrange mais de 20 espécies, algumas delas têm origem no trato gastrointestinal do homem e de animais de sangue quente. (Mendes, 2010) Os coliformes pertencem à família das *Enterobacteriaceae* e dentro deste grupo destacam-se a *E.coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e a *Serratia*, bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos e oxidase negativa, são também capazes de fermentar a lactose com produção de gás e ácido em cerca de (21±3 a 44±4) horas de incubação a (36 ± 2) °C (Clesceri, 2012). Os coliformes são um indicador da contaminação de águas, sendo que a sua presença na água indica que está imprópria para consumo (Mendes,2010). São necessários métodos simples e rápidos para detetar a presença destes microrganismos (Nogueira, 2007) .

A *E.coli* é considerada o melhor indicador de contaminação fecal visto que faz parte da flora saprófita intestinal humana em grandes quantidades e por isso, se estiver presente na água estamos perante uma contaminação fecal recente. (Nogueira, 2007). A *E.coli* é um coliforme capaz de fermentar a lactose a (44±0,5)°C, produtora de indol a partir do triptofano e possui a enzima β-glucuronidase a presença desta enzima permite a hidrólise do 4-methylumbeliferil-β-D-glucuronideo (MUG), apresentando fluorescência à luz ultra violeta. Como existem algumas espécies *E.coli* de que não possuem esta enzima e para evitar falsos negativos introduziu-se a prova do citrato que permite confirmar a presença de *E.coli*, uma vez que esta bactéria não é capaz de usar o citrato como única fonte de carbono (Odonkor, 2013, Fernandes, 2014, LSPG, 2022c, ISO 9308-1:2016- Qualidade da água- Enumeração de *Escherichia coli* e bactérias coliformes-Método de membrana filtrante., 2016).

O LSPG tem implementados e acreditados três métodos de ensaio para a pesquisa e quantificação de bactérias coliformes e *E.coli*.

Procedimento Interno

1. Filtrar o volume de amostra adequado, de acordo com a tabela 8.

Tabela 8- Volumes de amostra a filtrar de acordo com a matriz

Matriz	Volume a Filtrar (mL)
Águas de Piscinas	100
Águas naturais doces (superficiais, subterrâneas)	100
Águas minerais naturais de nascente e termais	250
Águas de processo (hemodiálise)	250

2. Transferir a membrana de celulose de 0,45 µm para o meio de cultura LSA, garantindo que não fica ar entre a membrana e o meio.
3. Incubar placas é feita a (36±2) °C durante (21±3) horas.
4. Observar as membranas e contar como bactérias presuntivas todas as colónias típicas (amarelas com halo) e atípicas (amarelas sem halo ou alaranjadas).
5. Repicar pelo menos 5 colónias de cada tipo para meio não seletivo (WPCA).
6. Incubar a (36±2) °C durante (21±3) horas.
7. Realizar o teste da oxidase.
8. Inocular o meio Fluorocult-DEV e incubar a (36±2) °C e também a (44±0,5) °C durante (21±3) horas.
9. Realizar a leitura da fluorescência em câmara de UV. Se for negativa, reincubar por mais (21±3) horas. A observação da fluorescência sob luz UV indica que o composto MUG existente no meio foi degradado pela ação da enzima β-glucuronidase.
10. Verificar a produção de indol adicionando ao meio 0,2 a 0,3 mL de reagente de Kovac's. Este revelador liga-se ao indol presente no meio, produto final da degradação do triptofano pela *E.coli*, originando um anel vermelho.
11. Inocular o meio Citrato Simmons.
12. Incubar a 36±2°C durante 44±4 horas. A *E.coli* não utiliza o citrato como fonte de carbono (LSPG, 2022c, ISO 9308-1:2016- Qualidade da água- Enumeração de *Escherichia coli* e bactérias coliformes-Método de membrana filtrante., 2016).

Em suma, contam-se todas as colónias que são oxidase negativa, lactose positiva a 37 °C como coliformes totais. Contam-se as colónias que fermentaram a lactose a 44 °C como Coliformes Fecais. Contam-se as colónias oxidase negativa, lactose positiva a 37 °C e a 44°C, que apresentam fluorescência, indol positivo e citrato negativo como *E. coli*, como ilustrado na figura 7.

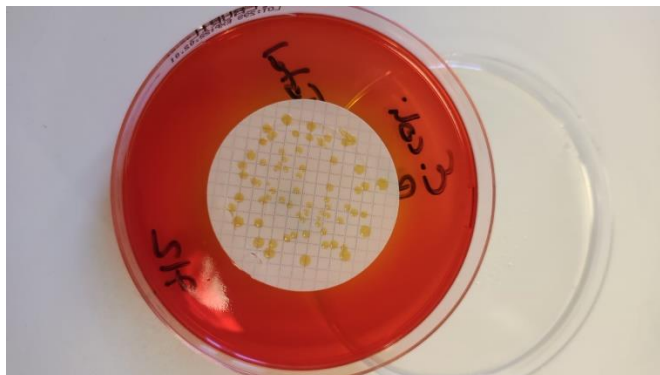


Figura 7- Colónias de *E.coli* em meio LSA

Procedimento segundo a norma ISO 9308-1

1. Filtrar o volume de amostra adequado, tal como apresentado na tabela 9.

Tabela 9- Volume de amostra a filtrar

Matriz	Volume a Filtrar (mL)
Águas de processo (hemodiálise)	250
Águas de Piscinas	100
Águas de consumo	100
Águas minerais naturais de nascente e termais	250

2. Transferir a membrana de celulose de 0,45 µm de porosidade, para o meio de cultura CCA, garantindo que não fica ar entre a membrana e o meio.
3. Incubar as placas a (36±2) °C durante (21±3) horas.
4. Contar colónias de cor purpura como colónias de *E.coli*.
5. Observar a membrana e contar colónias de coloração rosa-avermelhada como colónias presuntivas de bactérias coliformes não *E.coli*.
6. Repicar pelo menos 10 colónias presuntivas da membrana incubada no meio CCA para meio de cultura não seletivo (WPCA).
7. Incubar a (36±2) °C durante (21±3) horas.

8. Realizar o teste confirmatório, teste da oxidase (ISO 9308-2, 2016).

Em suma, contam-se todas as colónias de cor azul no meio CCA como *E.coli* e contam-se todas as colónias de cor rosa-avermelhada no meio CCA, oxidase negativa como coliformes, como representado na figura 8.

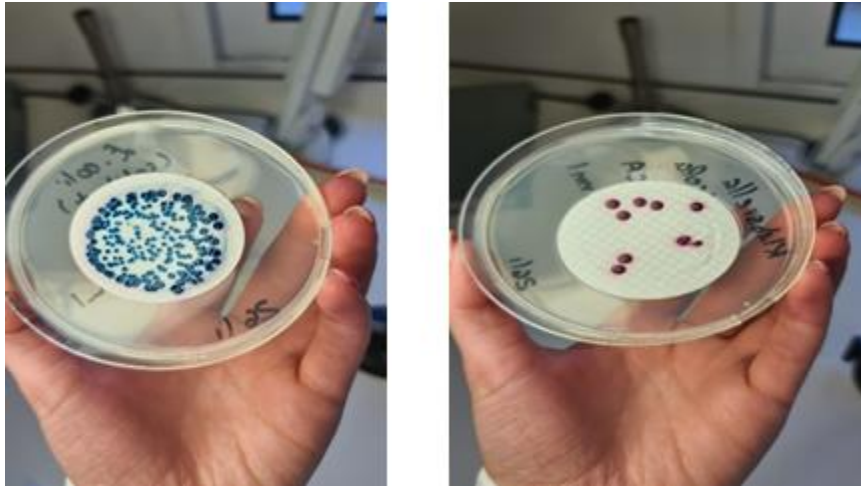


Figura 8-Colónias de *E.coli* e de *Klebsiella varícola* em meio CCA

A partir do número de colónias típicas contadas na membrana e tendo em conta os resultados dos testes de confirmatórios realizados, calcula-se o número de colónias de *E. coli* e de bactérias coliformes presentes em 100 mL ou 250 mL dependendo do tipo de amostra.

$$X = \frac{K}{n} z$$

nº de colónias confirmadas por volume analisado de amostra

K – nº de colónias repicadas e confirmadas n- nº de colónias repicadas

Z – Nº total de colónias contadas na placa

Se a placa semeada apresentar mais de 80 colónias, exprime-se o resultado como > 80 N por 100 mL ou 250 mL.

No relatório de ensaio os resultados são expressos em N/volume de amostra analisada (mL), em que N ⇔ NMP ⇔ UFC (LSPG, 2022c, ISO 9308-1:2016- *Qualidade da água- Enumeração de Escherichia coli e bactérias coliformes-Método de membrana filtrante.*, 2016).

Procedimento segundo a norma ISO 9308-2

1. Ligar o selador Quanti-Tray®, pelo menos 20 minutos antes de iniciar a técnica.

2. Transferir 100mL de amostra de água para dentro dos frascos com reagentes anti espuma.
3. Adicionar de modo asséptico o conteúdo de uma ampola do substrato Colilert-18® a cada 100mL de volume de amostra de água.
4. Homogeneizar suavemente de modo a garantir a dissolução completa do meio.
5. Transferir a solução anterior para o Quanti-Tray®.
6. Selar o o Quanti-Tray®.
7. Incubar a (36±2) °C durante (18 a 22) horas, para detecção de coliformes e *E.coli*. Os Quanti-Tray® devem ser incubados com os poços virados para cima e não se devem sobrepor mais do que 6.
8. Com a ajuda de tabelas estatísticas ou um *software* o número de bactérias coliformes, adquirem uma cor amarela e *E.coli*, cor amarela sob luz UV, pode ser determinado de acordo com a coloração dos poços (*ISO 9308-2:2012-Enumeração de Escherichia coli e bactérias coliformes- Método do Número amis Provável.*, 2012, LSPG, 2018d).

Em suma, poços com cor amarela cuja intensidade seja igual ou superior à do Quanti-tray® comparador são consideradas positivos para bactérias coliformes. Contabilizar os poços amarelos que apresentem fluorescência sob luz ultravioleta (365nm), considerando-os como *E. coli* positivos. Caso existam resultados duvidosos após as 18 horas de incubação, reavaliar ao fim de 22 horas.

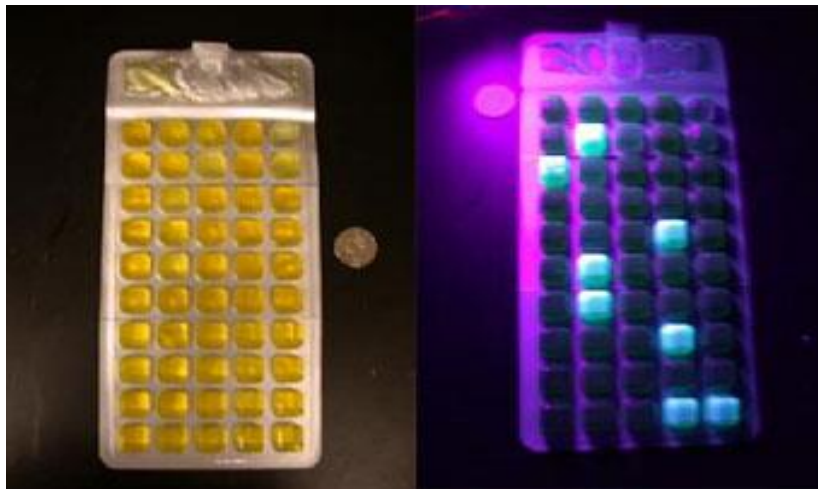


Figura 9-Quanti-tray com todos os poços positivos para coliformes totais, Quanti-tray que a luz UV apresenta *E.coli* (“colilert – Pesquisa Google,” 2022.)

Considerar válidos os resultados positivos para *E.coli* e bacterias coliformes antes das 18 horas de incubação e todos os resultados negativos observados após as 22 horas de incubação, interpretar a figura 9 de acordo com a tabela 10.

Tabela 10-Interpretação de resultados para a pesquisa e quantificação de *Coliformes* e *E.coli*.

Aspetto	Resultado
Menos amarelo que o comparador quando se incuba a (36±2) °C durante 18 a 22 horas	Negativo para coliformes totais e <i>E.coli</i> e negativo para coliformes fecais
Mais amarelo ou igual ao comparador quando se incuba a (36±2) °C	Positivo para coliformes totais
Mais amarelo ou igual ao comparador e com fluorescência quando se incuba a (36±2) °C	Positivo para <i>E.coli</i>

A partir da contagem de número de poços amarelos e amarelos com fluorescência, determina-se o NMP através das tabelas existentes na Norma ou através do *software* específico. No relatório de ensaio os resultados são expressos em N/100 mL, em que N ⇔ NMP ⇔ UFC.

Expressão de resultados:

- Se não forem detetadas bactérias, o resultado deve ser expresso como 0 N/100mL.
- Se forem detetadas bactérias os resultados devem ser arredondados, por excesso, à unidade e expressos em N/100mL.
- Se forem detetadas bactérias em todos os poços do Quanti-Tray®, os resultados são expressos como “> 201 N/100 mL (ISO 9308-2:2012-Enumeração de *Escherichia coli* e bactérias coliformes- Método do Número amis Provável., 2012, LSPG, 2018d).

4.5.3 Pesquisa e Quantificação de *Clostridium perfringens* segundo a Norma de Ensaio ISO 14189:2013

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia estrita, capaz de formar esporos, que pode ser encontrada no ambiente (solo, dejetos sólidos, esgotos) além do intestino de diversos animais. Apesar de não ser capaz de invadir células, esta bactéria produz toxinas e enzimas que podem causar doenças tanto intestinais (relacionadas com alimentos) como musculares (relacionadas com a infecção de feridas). Esta espécie de *Clostridium* habita no intestino de homens e animais, por isso está muito associada a fezes de animais de sangue quente (Paradigmas, 2007, SOUZA, 2017).

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria capaz de sobreviver na água durante meses e a sua presença pode indicar uma contaminação antiga ou intermitente sendo a sua pesquisa útil para a avaliação da eficácia do tratamento das águas ao longo de todas as fases (A. Martins, 2018, LSPG, 2018b).

Procedimento

1. Filtrar 100 mL da amostra de água de consumo.
2. Transferir a membrana de 0,45 µm de porosidade de celulose para o meio CP.
3. Fazer uma dupla camada sobre a membrana com meio nutritivo (WPCA ou CP agar base) de modo a promover as condições de anaerobiose e a cor negra das colónias.

4. Incubar as placas em anaerobiose a (44 ± 1) °C durante (21 ± 3) horas, as placas devem ser incubadas invertidas (para evitar interferências da água de condensação).
5. Observar a membrana e contar colónias presuntivas de *Clostridium perfringens*.
6. Repicar pelo menos 10 colónias, se possível, para gelose de sangue que incuba em anaerobiose numa estufa a (36 ± 2) °C durante (21 ± 3) horas.
7. Realizar a prova da fosfatase ácida. Uma cor púrpura desenvolvida dentro de 3-4 minutos é considerada uma reação positiva (*ISO 14189- Qualidade da água- Enumeração de Clostridium perfringens- Método de membrana filtrante.*, 2013). Realizar, por sessão de trabalho, controlo positivo (*Clostridium perfringens*) e um controlo negativo (*Clostridium bifermentans*) para validação do teste.

Em suma, contam-se todas as colónias negras, cinzentas ou amarelas acastanhadas, capazes de crescer em anaerobiose e fosfatase ácida positivas como *Clostridium perfringens*, figura 10.



Figura 10-Colónias de *Clostridium Perfringens* em meio CP

A partir do nº de colónias características contadas na membrana e considerando o resultado dos testes confirmatórios realizados, calcula-se o número de bactérias de *Clostridium perfringens* presentes na amostra.

$$X = \frac{K}{n} Z$$

X – nº de colónias confirmadas na amostra

K – nº de colónias repicadas e confirmadas n- nº de colónias repicadas

Z – Nº total de colónias contadas na placa

- Se a placa semeada apresentar mais de 80 colónias, exprime-se o resultado como > 80 N por volume de amostra (mL).
- Se a placa semeada apresentar menos de 80 colónias, exprime-se o resultado como N por volume de amostra (mL).

- Se a placa semeada apresentar o colónias, exprime-se o resultado como N=0 por volume de amostra (mL).

No relatório de ensaio os resultados são expressos em N/volume de amostra analisada (mL), em que N \leftrightarrow NMP \leftrightarrow UFC (ISO 14189- Qualidade da água- Enumeração de *Clostridium perfringens*- Método de membrana filtrante., 2013).

4.5.4 Pesquisa e Quantificação de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras segundo a Norma de Ensaio NP EN 26461-2:1994

Os esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras estão disseminados no ambiente, estando presentes tanto em matéria fecal humana e animal como na água e solo. Estes esporos são indicadores de poluição fecal remota, são capazes de sobreviver durante muito tempo, uma vez que são mais resistentes à ação de fatores químicos e físicos do que as células vegetativas, podem mesmo ser resistentes à adição de cloro e por esse motivo são úteis para efeitos de controlo. A pesquisa e quantificação de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras é feita por filtração através de membrana, segundo a norma EN26461-2. As bactérias anaeróbias sulfito-redutoras são bactérias produtoras de esporos, que pertencem à família *Bacillaceae* e ao género *Clostridium*, que têm cor negra capacidade de crescer em meio EC em anaerobiose após pasteurização (LSPG, 2021c, NP EN 26461-2:1994- Qualidade da água- Pesquisa e Quantificação de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras., 1994). No laboratório esta pesquisa é feita em águas minerais naturais, de nascente e termais e águas de processo (hemodiálise).

Procedimento

1. Pasteurizar 50 mL da amostra num banho de água a (75 + 5) °C durante 15 minutos, contados a partir do momento em que esta temperatura é atingida. Deve ser usado um tubo testemunho para controlar da temperatura do processo, contendo um termómetro calibrado. A pasteurização permite-nos fazer uma seleção dos esporos com o objetivo de eliminar as células vegetativas.
2. Filtrar os 50 mL da amostra de água por uma membrana com porosidade de 0,22µm de diâmetro, inferior ao tamanho dos esporos para que estes sejam retidos.
3. Transferir a membrana para o meio seletivo EC.
4. Fazer uma dupla camada com uma gelose nutritiva (WPCA ou CP agar base).
5. Incubar a (37 ± 1) °C durante (44 ± 4) horas.
6. Contar todas as colónias negras. Esta pesquisa e quantificação não exige testes confirmatórios, o resultado é direto (NP EN 26461-2:1994- Qualidade da água- Pesquisa e Quantificação de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras., 1994, LSPG, 2021c).

Em suma, contam-se as colónias que após pasteurização apresentam crescimento em anaerobiose e cor negra em meio TSC como bactérias anaeróbias sulfito redutoras, tal como representado na figura 11.

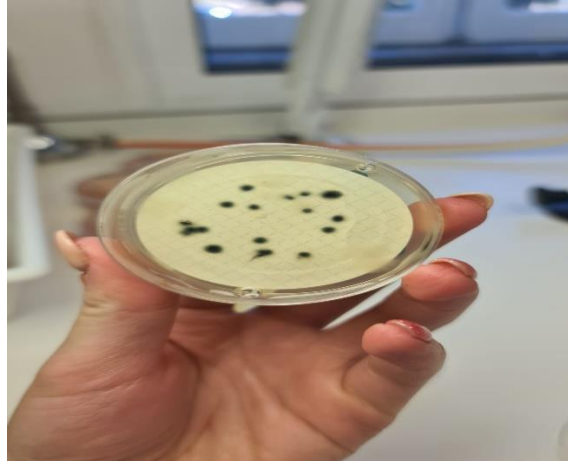


Figura 11-Colónias de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras em meio EC

Considera-se cada colónia como tendo origem num só microrganismo.

- Se a placa semeada apresentar mais de 80 colónias, exprime-se o resultado como > 80 N por volume de amostra analisada, de acordo com a legislação em vigor.
- Se a placa semeada apresentar menos de 80 colónias, exprime-se o resultado como N por volume de amostra (mL).
- Se a placa semeada apresentar 0 colónias, exprime-se o resultado como $N=0$ por volume de amostra (mL) (*NP EN 26461-2:1994- Qualidade da água- Pesquisa e Quantificação de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras.*, 1994).

4.5.5 Pesquisa e Quantificação de Enterococos fecais

Os enterococos são microrganismos comensais do trato gastrointestinal de muitas espécies de animais homeotérmicos tais como o homem, e podem ser encontrados em diversos habitats, possivelmente devido à disseminação de excreções de animais e à elevada persistência destes microrganismos no ambiente. O género *Enterococcus* inclui mais de 17 espécies, apesar de apenas algumas delas serem causadoras de infeções clínicas em humanos. A norma ISO 7899-2 descreve uma metodologia para isolar Enterococos fecais. A pesquisa e quantificação de enterococos é um ensaio laboratorial fiável usado como indicador de contaminação microbiológica da água. A espécie *E. faecalis* é um patógeno oportunista associado a infeções do trato urinário e a endocardites.

O *Enterococcus* intestinais são bactérias, cocos Gram positivos, com capacidade de reduzir o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolium a formazona e hidrolizar a esculina a 44°C em meio específico. As colónias presuntivas de enterococos têm uma cor vermelha, rosa ou acastanhada (LSPG, 2021, *ISO 7899-2:2000- Qualidade da água- Detecção e Enumeração de Enterococos intestinais- Método de membrana filtrante.*, 2000).

O LSPG tem duas metodologias implementadas e acreditadas para a pesquisa e quantificação de enterococos fecais.

Procedimento segundo a norma de ensaio ISO 7899-2:2000

1. Filtrar o volume de amostra adequado, de acordo com a tabela 12.

Tabela 11- Volume de amostra a filtrar de acordo com a matriz.

Matriz	Volume a Filtrar (mL)
Águas de Piscinas	100
Águas naturais doces (superficiais, subterrâneas)	100
Águas minerais naturais de nascente e termais	250
Águas de processo (hemodiálise)	250

2. Transferir a membrana de celulose de 0,45 µm de porosidade para o meio SB.
3. Incubar as placas são incubadas a (36C) °C durante (44h ± 4) horas.
4. Observar as placas e contar as colónias características de enterococos fecais, colónias vermelhas.
5. Pré-aquecer as placas de BE a (44± 1) °C durante 15 minutos
6. Transferir a membrana do meio SB diretamente para o meio BE.
7. Ler os resultados 2 horas após a transferência (*ISO 7899-2:2000- Qualidade da água- Detecção e Enumeração de Enterococos intestinais- Método de membrana filtrante.*, 2000, LSPG, 2021e) .

Em suma, consideram-se todas as colónias vermelhas, rosa ou acastanhadas em meio SB, tal como representadas na figura 12, que sejam capazes de hidrolisar a esculina como positivas e, portanto, de enterococos fecais.

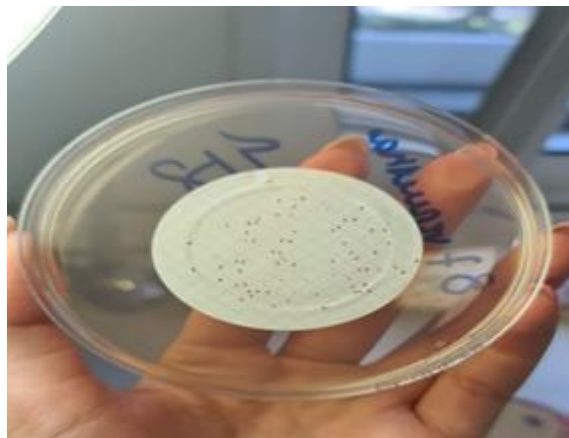


Figura 12-Colónias de *Enterococcus faecalis* em meio SB

A partir do número de colónias características contadas na membrana e considerando os resultados do teste confirmatório, calcula-se o número de colónias de *Enterococcus* em 100 mL ou 250 mL de amostra, contando todas as colónias bÍlis esculina positivas na placa.

- Se a placa semeada apresentar menos de 80 colónias, exprime-se o resultado como N por volume de amostra (mL).
- Se a placa semeada apresentar o colónias, exprime-se o resultado como N=0 por volume de amostra (mL).
- Se a placa semeada tiver mais de 80 colónias confirmadas, exprime-se o resultado como “> 80 N” por volume de amostra analisado, em que N ⇔ NMP ⇔ UFC (ISO 7899-2:2000- *Qualidade da água- Detecção e Enumeração de Enterococos intestinais- Método de membrana filtrante.*, 2000, LSPG, 2021e).

Procedimento de ensaio interno

1. Ligar o selador Quanti-Tray®, pelo menos 20 minutos antes de iniciar a técnica.
2. Adicionar de modo asséptico o conteúdo de uma ampola do substrato Enterolert®-DW a cada frasco de 100mL de volume de amostra de água.
3. Transferir a amostra completamente dissolvido para o Quanti-Tray®.
4. Selar o Quanti-Tray®.
5. Incubar os Quanti-Tray® inoculados durante 24 a 28 horas, a $41 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com os poços virados para cima, nunca sobrepondo mais de 6 Quanti-Tray®.
6. Analisar os Quanti-Tray® e contar todos os poços com cor verde como reação positiva, para o substrato Enterolert®-DW, usado para amostras com um grau de contaminação inferior, para o substrato Enterolert®-E, usado para amostras com um maior grau de contaminação, consideram-se como positivos todos os poços com emissão de fluorescência em camara UV,

interpretar de acordo com as tabelas 13 e 14 para cada substrato respectivamente, na figura 13 está representada uma amostra com poços positivos para enterococos fecais em Enterolert®-DW (LSPG, 2018a).

Tabela 12- Interpretação de resultados Enterolert®-E.

Enterolert®-E	
Enterococos detetados	Fluorescência azul
Enterococos não detetados	Ausência de fluorescência

Tabela 13- Interpretação de resultados Enterolert®-DW.

Enterolert®-DW	
Enterococos detetados	Cor verde
Enterococos não detetados	Cor azul

Sempre que existam resultados duvidosos após 24 horas de incubação, devem reincubar-se os Quanti-Tray® por mais 4 horas e reavaliar.



Figura 13- Quanti-tray com poços verdes, positivos para Enterococos fecais para substrato Enterolert®- DW.

A partir da contagem de número de poços positivos, determina-se o NMP através das tabelas existentes na Norma ou através do *software* específico. No relatório de ensaio os resultados são expressos em N/100 mL, em que $N \Leftrightarrow NMP \Leftrightarrow UFC$.

Águas de consumo, águas de processo para uso industrial, águas de piscinas e águas naturais doces (superficiais e subterrâneas):

- Se não forem detetadas bactérias, o resultado deve ser expresso como 0 N/100 mL.
- Se forem detetadas bactérias os resultados devem ser arredondados, por excesso, à unidade e expressos em N/100 mL.
- Se forem detetadas bactérias em todos os poços do Quanti-Tray® os resultados são expressos como “>201 N/100 mL” (LSPG, 2018a).

4.5.6 Pesquisa e Quantificação de *Pseudomonas aeruginosa*

As *Pseudomonas aeruginosa* têm uma maior resistência à desinfecção que outros microrganismos indicadores pesquisados, por isso a sua pesquisa é essencial e a sua presença pode estar associada a um processo de desinfecção insuficiente. A *Pseudomonas aeruginosa* é a espécie mais virulenta do género *Pseudomonas*, já que é um patógeno bacteriano invasivo e oportunista, encontrado em diversos ambientes e causadores de infeções nosocomiais severas e uma série de infeções sistémicas humanas, incluindo endocardite, pneumonia, infeções do trato urinário, infeções gastrointestinais, e septicemia em indivíduos imunodeprimidos, crianças, internados hospitalares e idosos. As infeções causadas por *P. aeruginosa* estão associadas a uma elevada taxa de incidência de doença e sua taxa de mortalidade foi relatada de 20 a 60% nas infeções adquiridas em ambiente hospitalar. Apesar de ser considerada um patógeno oportunista não habitante do trato intestinal de animais de sangue quente, esta bactéria tem uma grande versatilidade metabólica que lhe permite ter outras vantagens em comparação a outros organismos presentes nas águas (Gomes, 2017).

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativa, com 1,5 a 5,0 µm de comprimento que pertence à ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae*, e ao género *Pseudomonas*. Esta bactéria é aeróbia, podendo, no entanto, crescer em anaerobiose, é catalase e oxidase positivas, produz amónia e consegue crescer usando o citrato como única fonte de carbono. Tem capacidade de produzir vários pigmentos como pioverdina (cor verde-amarelada com fluorescência), piorrubina (cor vermelha), piomelanina (cor castanha) e piocianina (cor azul) exclusiva desta espécie. A *Pseudomonas aeruginosa* apresenta um metabolismo oxidativo positivo e uma temperatura ótima de crescimento a 37°C, podendo também crescer a 42°C e em meios com cetrimida e leite tem capacidade de hidrolisar a caseína (LSPG, 2022d).

Procedimento Interno

1. Filtrar o volume de amostra adequado, de acordo com a tabela 14.

Tabela 14- Volume de amostra a filtrar de acordo com a matriz.

Matriz	Volume a Filtrar (mL)
Águas de Piscinas	100
Águas naturais doces (superficiais, subterrâneas)	100
Águas minerais naturais de nascente e termais	250
Águas de processo (hemodiálise)	250

2. Transferir a membrana para PS-CN.
3. Incubar a (37 ± 1) °C e examinar as placas às (22 ± 2) horas e (44 ± 4) horas de incubação.
4. Observar as membranas e contar como colônias presumíveis de *Pseudomonas aeruginosa*: colônias típicas, colônias estas produtoras de pigmento verde sem fluorescência sob luz UV e colônias atípicas colônias com pigmento, com ou sem fluorescência.
5. Repicagem as colônias presumíveis, pelo menos três de cada tipo se possível, para meio de cultura não seletivo (WPCA).
6. Incubar o meio não seletivo a (37 ± 1) °C durante (22 ± 2) horas.
7. Realizar o teste da oxidase.
8. Se o teste da oxidase for positivo, repicar para Meio de Skim Milk constituído por cetrimida e incubar (22 ± 2) horas a (37 ± 1) °C.
9. Repicar também para meio de cultura não seletivo que incuba (22 ± 2) horas a (42 ± 1) °C (LSPG, 2022d).

Em suma, contam-se colônias pigmentadas (azuis, verdes, castanhas, amarelas ou vermelhas), com ou sem fluorescência UV, oxidase positivas, com crescimento a 42°C e com hidrólise da caseína no meio Skim-Milk como *Pseudomonas aeruginosa*.

Contam-se colônias sem pigmentação, com ou sem fluorescência UV, oxidase positivas, com crescimento a 42°C e com hidrólise da caseína no meio Skim-Milk como *Pseudomonas aeruginosa*, figura 14 representação de *Pseudomonas aeruginosa* em meio PSCN.

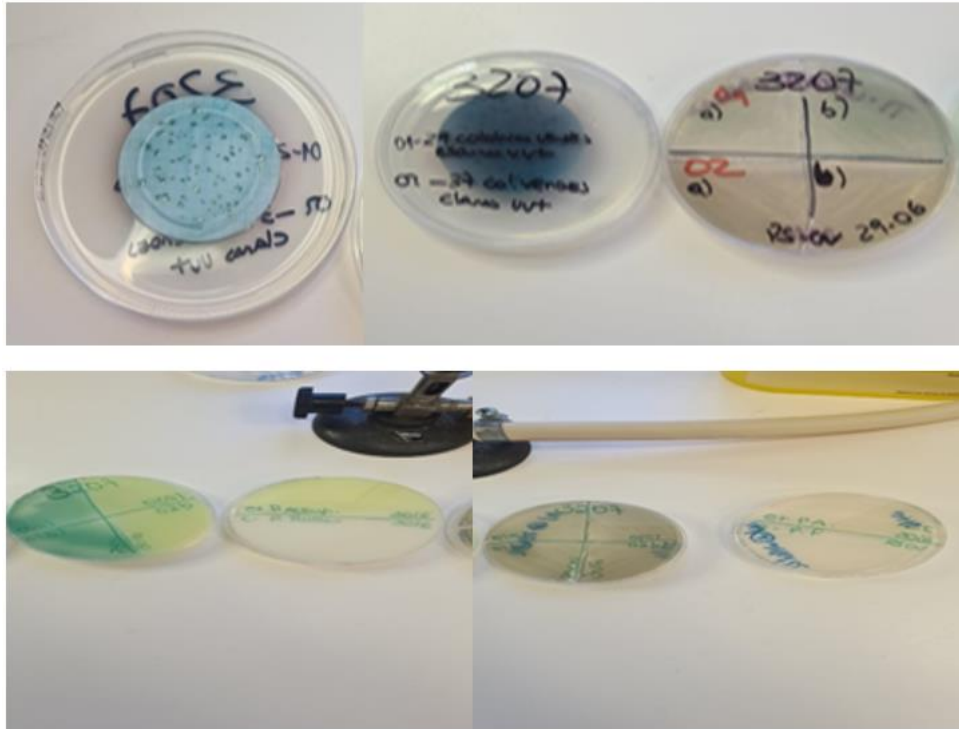


Figura 14-Placas com colônias características de *Pseudomonas aeruginosa* em meio PS-CN, SM e WPCA.

A partir do número de colônias características contadas na membrana filtrante e considerando o resultado dos testes confirmatórios realizados, calcula-se o número de *Pseudomonas aeruginosa* presentes em 100 mL 250 mL de amostra.

$$X = \frac{K}{n} Z$$

X-nº de colônias confirmadas por volume de amostra analisada

K – nº de colônias repicadas e confirmadas

n- nº de colônias repicadas

Z – Nº total de colônias contadas na placa

- Se a placa semeada apresentar menos de 80 colônias, exprime-se o resultado como N por volume de amostra (mL).
- Se a placa semeada apresentar o colônias, exprime-se o resultado como N=0 por volume de amostra (mL).

- Se a placa semeada apresentar mais de 80 colônias, exprime-se o resultado como > 80 N por 100 mL ou 250 mL.

No relatório de ensaio os resultados são expressos em N/volume de amostra analisada (mL), em que N ⇔ NMP ⇔ UFC (LSPG, 2022d).

Procedimento segundo a Norma de Ensaio ISO 16266-2:2018

Para amostras de águas de consumo, piscinas, naturais doces e de processo para uso industrial são analisados 100 mL. Para amostras de águas de hemodiálise e águas minerais naturais, de nascente e termais são analisados 250 mL.

1. Ligar o selador Quanti-Tray®.
2. Adicionar de modo asséptico o conteúdo de uma ampola de substrato Pseudalert® a 100 mL de volume de amostra de água. Para analisar 250 mL: Identificar os frascos sendo que nos frascos P1 e P2 se colocam 100 mL de amostra e no frasco P3 se colocam 50mL de amostra e depois se perfaz o volume com água desionizada estéril. Adicionar uma ampola de Pseudalert® em cada um dos frascos e agitar até que a dissolução seja completa.
3. Transferir para Quanti-Tray®.
4. Selar o(s) Quanti-Tray®.
5. Incubar o(s) Quanti-Tray 24 horas a (38±0,5) °C.

Visualizar os Quanti-Tray ao fim de 24 horas de incubação e contabilizar como positivos todos os poços que emitam qualquer intensidade de fluorescência azul sob luz ultravioleta (365 nm). Caso existam resultados duvidosos após as 24 horas de incubação, reavaliar ao fim de 28 horas, interpretar de acordo com a tabela 16.

No relatório de ensaio os resultados são expressos em N/volume de amostra analisada (mL), em que N ⇔ NMP ⇔ UFC.

Tabela 15- Interpretação de resultados Pseudalert® (ISO 16266-2).

Leitura dos poços do Quanti-Tray®	Interpretação
Sem fluorescência azul	Negativo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Qualquer intensidade de fluorescência azul	Positivo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

A partir da contagem do número de poços positivos, determina-se o NMP de microrganismos através da tabela estatística B.1 da Norma ISO 16266-2 relativa ao Quanti-Tray®, ou através do *software* específico (IDEXX NMP Generator) (ISO 16266-2:2018- *Qualidade da água- Detecção e enumeração de Pseudomonas Aeruginosa- Número Mais Provável.*, 201, LSPG, 2019a).

- Se não forem detetadas bactérias o resultado deve ser expresso como o N/volume de amostra analisada;
- Se forem detetadas bactérias os resultados devem ser arredondados, por excesso, à unidade e expressos em N/ volume de amostra analisada;
- Se forem detetadas bactérias em todos os poços do Quanti-Tray®, ou do Quanti-Tray® 2000, os resultados são expressos como “> 201 N/ volume de amostra analisada” ou “> 2419 N/ volume de amostra analisada” respetivamente, resultado representado na figura 15.



Figura 15-Quanti-tray com poços com fluorescência positivos para *Pseudomonas aeruginosa*

4.5.7 Pesquisa e Quantificação de Estafilococos totais e Coagulase Positiva segundo a Norma de Ensaio NP 4343:1998

A pesquisa de estafilococos produtores e não produtores de coagulase fazem parte do quadro de vigilância sanitária de águas de piscinas e tanques de recepção de recintos aquáticos. Os estafilococos são bactérias saprófitas da pele e faneras do homem, são, portanto, bons indicadores de contaminação inter-humana. Algumas substâncias usadas na desinfecção de águas de piscinas, como é o caso do cloro têm uma ação irritante sobre as mucosas potenciando assim a virulência destas bactérias. Como estas são bactérias ubíquas, podem comportar-se como agentes patogénicos oportunistas.

Os estafilococos são cocos Gram positivos, com 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, aeróbios e anaeróbios facultativos e produtores de catalase. A sua estrutura celular em cocos é responsável por uma alta tolerância à desidratação, o que explica a sua ampla distribuição e persistência no ambiente. Os estafilococos coagulase positiva têm ainda capacidade de coagular o plasma de certos animais. Os estafilococos têm capacidade de fermentar o manitol com produção de ácido, mesmo na presença de concentrações elevadas de cloreto de sódio, têm também capacidade de fermentar a glucose tanto em

anaerobiose como em anaerobiose (NP 4343 (1998)- Qualidade da água- Pesquisa e quantificação de Estafilococos., 1998, LSPG, 2021d).

1. Filtrar o volume adequado de amostra, no caso de águas de piscinas, de acordo com a tabela 16.

Tabela 16- Volume de amostra a filtrar de acordo com a matriz

Matriz	Volume a Filtrar (mL)
Águas de Piscinas	100
Águas de processo (hemodiálise)	250

2. Transferir a membrana de 0,45 µm de porosidade para meio de cultura seletivo MSA.
3. Incubar as placas a (37±1) °C durante (48±4) horas.
4. Observar as colónias desenvolvidas á superfície da membrana e contar os vários tipos de colónias presuntivas, brancas e amarelas, envolvidas ou não por um halo amarelo, eliminando as colónias grandes mucosas, que correspondem a bactérias do género *Bacillus*;
5. Repicar três de cada tipo, para meio não seletivo (WPCA) para posterior realização dos testes confirmatórios.
6. Incubar o meio não seletivo a (37±1) °C durante (24±4) horas.
7. Realizar a coloração de Gram:
 - 7.1 Fixar o esfregaço à chama.
 - 7.2 Cobrir o esfregaço com a solução de violeta de cristal e deixar atuar durante 1 minuto.
 - 7.3 Cobrir completamente com solução lugol e deixar atuar 1 minuto.
 - 7.4 Lavar com água destilada durante 5 segundos.
 - 7.5 Descorar 10 a 15 segundos com a solução descorante.
 - 7.6 Lavar com água destilada durante 5 segundos.
 - 7.7 Cobrir completamente com a solução de safranina e deixar atuar durante 1 minuto.
 - 7.8 Lavar com água destilada durante 5 segundos.
 - 7.9 Deixar secar ao ar.
 - 7.10 Observar ao microscópio ótico, começando com a objetiva de 40x e passando depois para a objetiva de imersão (100x) (LSPG, 2017).
8. Realizar o teste da catalase. Colocam-se umas gotas de reagente da catalase sobre uma placa de Petri e com a ajuda de uma ansa inoculam-se colónias sobre as bolhas de reagente, se houver formação de bolhas podemos concluir que estamos perante um microrganismo catalase positiva.
9. Inocular o meio MEVAG.
10. Inocularo meio de Brain Heart.

11. Realizar o teste da coagulase para distinguir estafilococos totais de estafilococos coagulase positiva (NP 4343 (1998)- Qualidade da água- Pesquisa e quantificação de Estafilococos., 1998, LSPG, 2021d).

Em suma, contam-se colónias brancas e amarelas, com ou sem halo, capazes de fermentar o manitol, aeróbias e anaeróbias facultativas, Gram-positivas em forma de cocos, produtoras de catalase e fermentadoras da glicose como estafilococos totais, representado na figura 16 lado esquerdo.

Contam-se colónias brancas e amarelas, com ou sem halo, capazes de fermentar o manitol, aeróbias e anaeróbias facultativas, Gram-positivas em forma de cocos, produtoras de catalase, fermentadoras da glicose e coagulase positivas como estafilococos coagulase positiva, representado na figura 16 lado direito.

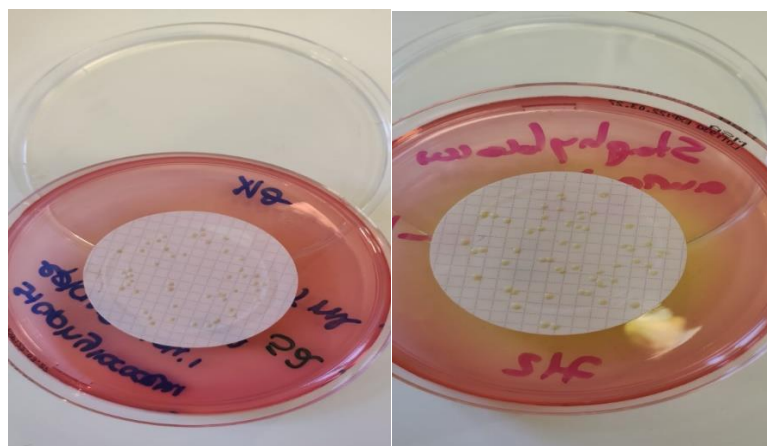


Figura 16-Colónias de *Staphylococcus epidermidis*, coagulase negativa e de *Staphylococcus Aureus*, coagulase positiva

Por convenção considera-se cada colónia como tendo origem num só microrganismo. Exprimem-se os resultados obtidos em número de colónias de estafilococos produtores de coagulase e estafilococos não produtores de coagulase por 100 mL de amostra nas piscinas e por 250 mL de amostra em águas de hemodiálise.

$$X = \frac{K}{n} Z$$

X – nº de colónias confirmadas por volume de amostra

K – nº de colónias repicadas e confirmadas

n- nº de colónias repicadas

Z – Nº total de colónias contadas na placa

- Se a placa semeada apresentar menos de 80 colónias, exprime-se o resultado como N por volume de amostra (mL).
- Se a placa semeada apresentar o colónias, exprime-se o resultado como N=0 por volume de amostra (mL).
- Se a placa semeada apresentar mais de 80 colónias, exprime-se o resultado como > 80 N por 100mL ou 250mL. (NP 4343 (1998)- Qualidade da água- Pesquisa e quantificação de *Estafilococos.*, 1998, LSPG, 2021d).

4.5.8 Pesquisa e Quantificação de *Legionella pneumophila* segundo o procedimento de ensaio interno do LSPG

A metodologia de Legiolert® é baseada na deteção de enzimas bacterianas que sinalizam a presença da *Legionella pneumophila* através da utilização de um substrato rico em aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes. As bactérias viáveis da espécie *Legionella pneumophila* são capazes de metabolizar o substrato para produzir um indicador castanho. O Legiolert® deteta *Legionella pneumophila* em amostras de água após 7 dias de incubação. Esta metodologia tem dois protocolos distintos, adaptados ao tipo de matriz: dispõem de um protocolo para água potável, aplicável a águas tratadas e/ou com baixas contagens microbiológicas como as águas de consumo, piscinas, águas minerais naturais, nascente e termais e águas de processo (hemodiálise) e um protocolo para água não potável: aplicável a águas não tratadas, com elevada quantidade de matéria interferente, como as águas das torres de refrigeração, menos comum no LSPG.

Protocolo para amostras de água potável (100 mL):

1. Ligar o selador Quanti-Tray®.
2. Medir a dureza da amostra de água usando uma fita de teste de dureza, de acordo com as instruções do fabricante, como apresentado na tabela 17:

Tabela 17-Dureza das amostras de *Legionella*.

Fonte: Kit usado no LSPG

Nº de Quadrados da Reação	0	1	2	3	4
CaCO₃	<3	>4	>7	>14	>21
Dureza	Baixa	Baixa	Baixa	Alta	Alta

3. Adicionar de modo asséptico o volume adequado de suplemento de acordo com a tabela 18:

Tabela 18- Volume a adicionar às amostras de acordo com a dureza.

Dureza da amostra	Volume de substrato a adicionar
Amostras de dureza alta adicionar	1 mL
Amostras de dureza baixa	0,33 mL

4. Adicionar de modo asséptico o conteúdo de uma ampola de substrato Legiolert[®] a 100mL de volume de amostra de água.
5. Agitar até que o conteúdo se dissolva totalmente, colocar no Quanti-Tray Plus.
6. Transferir quando este estiver completamente dissolvida a amostra para o Quanti-Tray[®].
7. Selar o Quanti-Tray[®].
8. Incubar os Quanti-Trays[®] inoculados com o lado de papel virado para baixo, durante 7 dias, a (39±0.5) °C em atmosfera humidificada.
9. Sobrepor os Quanti-Tray[®] em sentidos alternados para aumentar a estabilidade, neste caso podemos sobrepor 10 Quanti-Tray[®]. (LSPG, 2020b)
10. Ler os resultados de acordo com a seguinte tabela, tabela 19:

Tabela 19- Interpretação de resultados Legiolert[®].

Leitura dos poços do Quanti-Tray [®]	Interpretação
Qualquer cor castanha (com ou sem turvação)	Poço positivo
Qualquer turvação (com ou sem mudança de cor)	Poço positivo
Sem alteração de cor e sem turvação	Poço negativo

Os resultados de Legiolert são definitivos ao fim de 7 dias. Turvação isolada pode indicar crescimento de *Legionella pneumophila* em situações em que o indicador não se desenvolve tão rapidamente, exemplo de Quanti-Tray[®] com amostra *Legionella pneumophila* positiva esquerda e Quanti-Tray[®] com amostra *Legionella pneumophila* positiva direita, figura 17.



Figura 17-Quanti-Tray® (Lado Esq.) – Amostra Positiva (Contém *Legionella pneumophila*); Quanti-tray® (Lado Dir.) – Amostra Negativa (Não contém *Legionella pneumophila*)(Ferreiro, 2017)

A partir da contagem do número de poços positivos, determina-se o NMP através das tabelas estatísticas ou do *software* específico, fornecidos pela IDEXX. No relatório de ensaio os resultados são expressos em N/volume de amostra analisada, em que $N \Leftrightarrow NMP \Leftrightarrow UFC$ (LSPG, 2020b).

- Se não forem detetadas bactérias o resultado deve ser expresso como $<LD$ (10 N/L);
- Se forem detetadas bactérias os resultados devem ser arredondados, por excesso, à unidade, multiplicados por 10 e expressos em N/L;
- Se forem detetadas bactérias em todos os poços do Quanti-Tray®, os resultados são expressos como “ > 22730 N/L”.

4.6 Controlo de Qualidade

4.6.1-Controlo de Qualidade Interno (CQI)

O Controlo de Qualidade é essencial nos laboratórios para a avaliação contínua do trabalho, com o objetivo de monitorizar a qualidade e a consistência dos procedimentos e assegurar a fiabilidade dos resultados. O controlo de qualidade é dividido em CQI e Controlo de Qualidade Externo (CQE) (Almeida, 2013).

O CQI realizado no LSPG compreende: testes de esterilidade, cartas de produtividade, estudo de paralelos e duplicados através da análise de amostras contaminadas natural ou artificialmente (*spiked samples*), manutenção e calibração de equipamentos e manutenção dos técnicos na matriz de competências. A realização destes controlos é executada com frequências distintas e deve ser otimizada de modo não ocupar demasiado os técnicos e assim garantir resultados com qualidade.

Num laboratório de microbiologia é essencial que as condições de esterilidade sejam asseguradas, para isso estas devem rigorosamente monitorizadas para que seja possível detetar possíveis fontes de contaminação, que possam pôr em causa os ensaios. A área de microbiologia está sujeita a um rigoroso controlo e a esterilidade é assegurada ao longo de todo o processo de análise de amostras (Pessoa, 2014).

Qualidade do ar

O controlo da qualidade do ar é realizado por sessão de trabalho em todas as bancadas de trabalho, a de sementeira por incorporação, junto à rampa de filtração e também na bancada NMP. Semanalmente é realizado controlo nas bancadas das repicagens e na bancada de distribuição de meios. Este controlo permite garantir que as amostras são processadas em ambiente controlado, pela monitorização da esterilidade e também da temperatura das salas de trabalho.

Coloca-se de uma placa de WPCA aberta junto ao bico de Bunsen durante 15 minutos, registando-se a hora e a temperatura da sala de trabalho, monitorizada por sondas calibradas, de seguida, procede-se à incubação das mesmas durante 48 horas a (22 ± 2) °C. O critério de aceitação é < 5 UFC/Placa/15min. O critério de aceitação da temperatura das salas de microbiologia é de (22 ± 3) °C. Caso os critérios de aceitação não sejam cumpridos, deve proceder-se a uma análise de causa e agir em conformidade (LSPG, 2021g).

Controlo das Superfícies

O controlo das superfícies é realizado semanalmente nas bancadas de trabalho e trimestralmente nas estufas. O procedimento de desinfeção é realizado com álcool a 70%. De seguida, coloca-se uma placada de contacto com meio não seletivo, sob um peso relógio de massa 500 g, durante 10 segundos. Estas placas são incubadas durante (18 a 24) horas a (37 ± 1) °C. O critério de aceitação é de ≤ 3 UFC/placa. Caso o critério de aceitação não seja cumprido deve realizar-se a limpeza das superfícies e repetir o procedimento anteriormente descrito, se mesmo assim a não conformidade se mantiver deve averiguar-se a causa e aplicar medidas corretivas (LSPG, 2021g).

Controlo dos Banhos

Para evitar o desenvolvimento de microrganismos, os banhos devem ser esvaziados, limpos, desinfetados e cheios semanalmente ou após ocorrência de um derrame. Deve usar-se água desionizada e, de modo a evitar contaminações, não imergir demasiado os tubos e frascos, nem molhar os rolhões de algodão quando são utilizados.

Procedimento:

- Semear 1 mL de água do banho por incorporação com WPCA.
- Incubar duas placas a $(37\pm 0,5)$ °C durante 48 horas e duas placas a (22 ± 2) °C durante 72 horas.
- Registrar os resultados no impresso adequado (LSPG, 2021g).

Controlo do Processo de Esterilização

Para verificar o bom desempenho das autoclaves e das estufas de esterilização o LSPG utiliza mensalmente bioindicadores de esterilidade, de acordo com as indicações do fabricante.

Caso se verifique que o processo de esterilização não ocorreu devidamente, deve rejeitar-se toda a carga, registada previamente no impresso adequado e esterilizar novamente o material/ meios de cultura/ água destilada e proceder a novo controlo.

Teste de Esterilidade de frascos de colheita de amostras de água

O LSPG adquire os frascos de colheita de amostras de água prontos a usar, no entanto é responsável por verificar a sua esterilidade. Este controlo é efetuado por lote de fabricante e é repetido quando o lote se mantenha a uso por mais de 6 meses ou haja suspeita de contaminação.

O procedimento é realizado em 1% do número total de frascos de cada lote, do *stock* do laboratório, de acordo com o descrito:

1. Colocar 20 a 50 mL do meio de cultura não seletivo (WPCA) em cada frasco.
2. Se o frasco for transparente, forrar as paredes com o meio pela rotação do frasco enquanto o meio arrefece e solidifica; se o frasco for opaco proceder da mesma forma e verter o meio para uma placa de Petri para facilitar a visualização do resultado.
3. Incubar a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias.

Critério de aceitação: $< 1 \text{ UFC/Frasco}$.

Teste da Inativação do Cloro

O laboratório deve garantir que a quantidade de agente quelante de cloro presente nos frascos de colheita é suficiente para inativar todo o desinfetante residual das amostras de água de modo a garantir que as amostras de água que chegam ao laboratório são representativas do estado real da água, ou seja, chegam ao laboratório com a carga microbiológica real e que o agente desinfetante não vai camuflar os microrganismos presentes. Esta verificação é efetuada por lote de fabricante e são testados 1% do número total de frascos de cada lote, verificando-se que a quantidade de agente quelante é suficiente para neutralizar uma solução de cerca de 6 mg/L preparada a partir de uma solução de concentração em hipoclorito de sódio $\geq 13\%$.

Placas de Petri

É realizado um ensaio de esterilidade antes da abertura de cada novo lote de fabricante e é repetido quando o lote se mantenha a uso por mais de 6 meses ou haja suspeita de contaminação. Existem dois locais de armazenamento para as placas, devido ao escasso espaço existente no laboratório:

- ✓ *Stock* do laboratório (uso).
- ✓ *Stock* do armazém geral.

O procedimento é realizado em 1% do número total de placas de cada lote, do *stock* do laboratório (sempre que as caixas chegam do armazém geral). Além destes controlos, é realizado um ensaio de esterilidade por cada sessão de trabalho.

Procedimento:

1. Colocar 20 a 25 mL de meio de cultura não seletivo (WPCA) em cada placa.
2. Incubar a (22 ± 2) °C durante 5 dias.

Critério de aceitação: < 1 UFC/placa

Membranas de filtração:

A verificação da esterilidade é atestada pelo certificado fornecido pela casa comercial. Para além disso, o LSPG verifica a esterilidade em cada sessão de trabalho, através do teste de esterilidade da água, que se pretende que não tenha qualquer crescimento microbiano garantindo assim que tanto a água usada como as membranas são estéreis.

Verificação intermédia da Balança

Realiza-se a verificação intermédia da balança PB602 após a calibração anual por entidade externa acreditada para definição dos critérios de aceitação. Mensalmente realiza-se o registo das massas 20,00 g, 50,00 g e 200,00 g (LSPG, 2021g).

Controlo da Qualidade da Água

A água utilizada no LSPG é desionizada estéril indicada para a preparação de meios de cultura e reagentes de acordo com a norma ISO 11133. A purificação é realizada através de equipamentos apropriados (Élix 3 e 5) para desmineralização da água da rede através de osmose inversa e eletrodesionização. O controlo da qualidade da água é feito através da medição da condutividade por sessão de trabalho e também pela avaliação da carga microbiana, mensalmente. A esterilização da água é assegurada através do autoclave, que permite uma esterilização através de vapor sob pressão. O controlo de esterilidade consiste em pipetar 1 mL da água de cada um dos para uma placa de Petri e de seguida fazer a incorporação com WPCA e incubar durante 72 horas a 22 °C. O critério de aceitação é de $<10^3$ UFC/mL e uma condutividade de $<25\mu\text{S/cm}$ (LSPG, 2022b).

Ensaio em Branco

O objetivo dos ensaios em branco é avaliar as condições de esterilidade ao longo do processo analítico. Estes ensaios são feitos por sessão de trabalho na técnica de incorporação e na de filtração. No caso do NMP, este ensaio é feito por lote e posteriormente de 2 em 2 meses, exceto para o meio de

Legiolert® em que o branco é realizado por sessão de trabalho. O procedimento consiste na análise da água desionizada estéril mais recente, o ensaio deve ser feito de acordo com o procedimento das amostras (LSPG, 2022b).

Cartas de Produtividade

Como ferramenta de controlo de qualidade analítica dos ensaios microbiológicos de águas são utilizados materiais de referência (MR), preparados de acordo com as instruções do fabricante, para a determinação da produtividade dos meios de cultura usados.

De acordo com a Norma ISO 11133, a determinação da produtividade consiste na inoculação, em paralelo, do meio de cultura a testar e do meio de referência. O inóculo a usar deve permitir obter um intervalo de cerca de 80 a 120 N com o microrganismo alvo, utilizando a técnica de sementeira e as condições de incubação específicas para cada metodologia (LSPG, 2022a).

No entanto, nalguns casos específicos, como nas técnicas de NMP, pelo tipo de águas a que se destinam, as contagens podem ser superiores.

A partir da contagem obtida no meio a testar e no meio de referência efetua-se o cálculo da Produtividade utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Contagem total obtida no meio a testar}}{\text{Contagem total obtida no meio de referência ou lote anterior}}$$

A determinação da produtividade dos meios de cultura usados para sementeira é realizada mensalmente. Não se realizam estudos de produtividade para meios de cultura usados apenas para repicagens e testes confirmatórios.

Os critérios de aceitação estão definidos, para cada meio de cultura, no respetivo impresso, carregado na aplicação de gestão documental.

Sempre que se verifique pelo menos uma das seguintes situações, o lote deve ser considerado fora de controlo:

- Um valor fora dos limites de controlo;
- Dois ou três valores consecutivos que excedam os limites de aviso;
- Seis valores consecutivamente a aumentar ou a diminuir;
- Nove valores consecutivos do mesmo lado da média.

Nestes casos, o lote de meio de cultura deve ser rejeitado e devem ser investigadas as causas.

Garantia da Qualidade de Meios de Cultura e Reagentes

Os fabricantes de meios de cultura e reagentes prontos a usar têm um sistema de gestão certificado de acordo com a norma ISO 9001 e emitem certificados de qualidade dos meios que fornecem de acordo com a norma ISO 11133. Para a preparação de meios de cultura e reagentes, devem usar-se componentes de qualidade homogénea e produtos químicos de qualidade analítica reconhecida. Para preparar meios de cultura deve usar-se água desionizada preparada, com base na norma ISO 11133 e seguir as instruções do fornecedor. Periodicamente devem ser efetuadas verificações para avaliar possíveis alterações de transporte, armazenamento e fusão de meio sólido, quando aplicável.

Meios preparados

Por cada pesagem de cada meio o LSPG atribui um lote interno, que consiste na sigla do meio de cultura seguida do número da pesagem e da data de preparação e é efetuado o registo.

Por cada lote interno registam-se os seguintes dados:

- Designação;
- Lotes comerciais das fórmulas desidratadas e dos suplementos, quando aplicável;
- Validade do(s) lote(s) comercial;
- Volume de água (ml) / massa de meio de cultura (g);
- Quantidade de unidades preparadas;
- Características visuais: cor, aspeto e consistência;
- Temperatura de adição de suplemento;
- Temperatura do ar da sala aquando da distribuição de meios;
- Rubrica do técnico e do assistente operacional responsáveis pela preparação dos meios de cultura;
- Ciclos de esterilização.

A validade das unidades preparadas, armazenados refrigerados a (5 ± 3) °C, ao abrigo da luz:

- Meio CP: 7 dias em condições de anaerobiose;
- Outros meios de cultura distribuídos em placas: 2 a 4 semanas;
- Meios distribuídos em tubos e frascos: 1 mês.

Para efetuar o controlo de cada lote preparado no LSPG verifica-se:

- pH;
- Seletividade e/ou especificidade, quando aplicável, representadas na tabela 21;
- Controlo positivo;

- Teste de esterilidade.

A produtividade que é determinada mensalmente ou sempre que se inicia um frasco de meio desidratado e/ou uma caixa de suplemento. Não se realizam estudos de produtividade para meios de cultura usados apenas para testes confirmatórios. O teste de esterilidade é realizado por cada lote interno, após o ciclo de esterilização (quando aplicável) e consiste numa placa/tubo sem inóculo. No caso dos meios que são distribuídos em placa, após o ciclo de esterilização, é feito um teste de esterilidade na primeira e na última placa, para o controlo do processo. Estes testes incubam nas mesmas condições do procedimento a que o meio se destina. O controlo de seletividade consiste na inoculação de uma placa (técnica de esgotamento do inóculo) ou tubo (suspensão de uma colónia) com o microrganismo não alvo para verificar que não há crescimento. O controlo de especificidade consiste na inoculação de uma placa (técnica de esgotamento do inóculo) ou tubo (suspensão de uma colónia) com o microrganismo não alvo para verificar que não há inibição do seu crescimento e que as colónias apresentam características diferentes do microrganismo alvo. O controlo positivo é efetuado por lote interno e consiste na inoculação de uma colónia no meio de cultura com o microrganismo alvo para verificar que exibe as características expectáveis, como descrito na Tabela 20 (LSPG, 2022a).

Tabela 20- Seletividade dos meios a partir de fórmulas desidratadas.

Meio de cultura	Controlo Positivo	Seletividade	Condições incubação	pH a 25°C
WPCA	<i>Escherichia coli</i>	N/A	36±2°C 21±3h	7,2±0,2
CP	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	41±1°C 21±3h Anaerobiose	7,6±0,2
Fluorocult	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37±1°C 21±3h	7,2±0,2
Bilis-esculina	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	44±0,5°C 21±3h	7,1±0,2

Meios de cultura comprados

Receção Aquando da receção de meios de cultura e reagentes, o LSPG verifica:

- Lote Comercial;
- Validade comercial;
- Quantidade recebida;
- Acondicionamento.

Após verificadas as condições anteriores, procede-se ao armazenamento de acordo com as instruções do fabricante. A gestão de stocks é feita na aplicação informática de gestão do trabalho técnico do laboratório, sempre que se dá entrada de um novo lote comercial é carregado nesta aplicação o respetivo certificado de qualidade. As características visuais dos meios prontos a usar são registadas no sistema informático: cor, aspeto e consistência, para além disso é também feita a rastreabilidade do meio em que é registado o número de amostra inicial e final de cada lote de meio de cultura. O LSPG recorre a fornecedores de meios de cultura prontos a usar certificados de acordo com a norma ISO 9001 e que emitem certificados de qualidade de acordo com a norma ISO 11133.

É realizado o controlo de lote é realizado para verificar as condições dos meios, com o objetivo de avaliar os fornecedores em que se verifica:

- Produtividade;
- Seletividade;
- Especificidade, quando aplicável.

Para o estudo da seletividade, especificidade e produtividade utilizam-se estirpes de origem certificada e reconhecidas internacionalmente. O controlo de lotes deve ser realizado num lote aleatório, anualmente, preferencialmente durante o primeiro trimestre do ano. Este controlo é registado na aplicação informática de gestão do trabalho laboratorial, com a respetiva data de realização. É feita a determinação da seletividade e especificidade e consistem na inoculação de uma placa (técnica de esgotamento do inóculo) com o(s) microrganismo(s) adequado(s). Nos meios usados para a técnica de NMP deve ser inoculado um Quanti-tray® com o(s) microrganismo(s) adequado(s). O lote testado é aceite desde que os resultados obtidos nos vários testes estejam de acordo com a tabela 21. Caso não se cumpram os critérios de aceitação procede-se a um estudo de causas. São ainda realizados testes de esterilidade nos meios usados para a filtração, são realizados a cada sessão de trabalho, sendo assegurado este controlo ao longo de todo o ano. Nos meios de NMP, o teste de esterilidade é realizado mensalmente, juntamente com a *spiked sample* (LSPG, 2022a).

Tabela 21-Seletividade e especificidade dos meios de cultura prontos a usar.

Meio de cultura	Controlo Positivo	Seletividade	Especificidade	Condições incubação
Colilert-18	<i>Escherichia coli</i> ou <i>Klebsiella variicola</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	N/A	36±2°C 20±2h
Enterolert-DW	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Serratia marescens</i>	N/A	41±0,5°C 26±2h
Enterolert-E		<i>Serratia marescens</i> e <i>Aerococcus viridans</i>		
Pseudalert	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	N/A	38±0,5°C 26±2h
Legiolert	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	N/A	39±0,5°C/7dias 37±0,5°C/7dias
CP	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacillus subtilis</i> **	N/A	34±1°C 21±3h Anaerobiose
EC	<i>Clostridium perfringens</i>	Inibição total de <i>Bacillus subtilis</i>	N/A	37±1°C 21±3h Anaerobiose
LSA*	<i>Escherichia coli</i>	Inibição total de <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> ou <i>Citrobacter freundii</i>	36±2°C 21±3h
SB	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> ** ou <i>S. aureus</i> **	N/A	36±2°C 21±3h
PS-CN	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i> ** ou <i>Enterococcus faecalis</i> **	N/A	37±1°C 21±3h
MSA*	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> **	<i>S. aureus</i> ou <i>S. epidermidis</i>	37±1°C 21±3h

CCA	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i> ***	36±2°C 21±3h
------------	-------------------------	------------------------------	-----------------------------	-----------------

* De acordo com o certificado de análise do fornecedor do meio de cultura **Total inibição

***Colónias incolores N/A Não aplicável

Cálculo do Critério de Precisão e Estimativa da Incerteza

Com o objetivo de assegurar a repetibilidade e a reprodutibilidade interlaboratorial dos resultados obtidos para uma determinada análise pelo mesmo analista ou entre analistas, está implementado um programa de realização de ensaios em duplicado e paralelo.

São efetuados para isso mensalmente ensaios em duplicado e paralelo, para todos os ensaios acreditados, a partir de amostras natural ou artificialmente contaminadas (*spiked samples*) e ainda aquando da participação nos ensaios interlaboratoriais.

O critério de precisão é calculado com recurso à análise de duplicados e é recalculado anualmente, sendo que o R médio é calculado a partir do somatório de todas as amplitudes obtidas nos últimos três anos (retiram-se deste cálculo os que excederam o limite superior). Este critério de precisão será usado para a avaliação dos ensaios em duplicado do ano seguinte. O LSPG definiu que 5% dos valores das amplitudes dos duplicados e paralelos podem exceder o valor estabelecido pelo critério de precisão em vigor, não implicando a ocorrência de trabalho não conforme. Quando os resultados estiverem fora do critério de aceitação, o LSPG dá como resultado o valor do duplicado mais elevado.

O cálculo da estimativa da incerteza associada a cada parâmetro e método é feita com base nos resultados obtidos a partir das análises realizadas em paralelo e tem de ser recalculada no caso da admissão de novos técnicos no laboratório ou da aquisição de novos equipamentos, qualquer que seja a alteração das variáveis.

4.6.2-Controlo de Qualidade Externo (CQE)

Os principais deveres de um laboratório de Saúde Pública são garantir a qualidade dos resultados laboratoriais, melhorar a qualidade dos serviços prestados, garantindo da qualidade nas fases pré e pós analítica e contribuindo assim para uma melhoria continua dos serviços prestados e assegurando sempre que a saúde pública da população é salvaguardada (Vilhena, 2015).

O *UK Health Security Agency (UKHSA)* é acreditado pelo *United Kingdom Accreditation Service (UKAS)* e é distribuído pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Esta entidade promove, coordena e organiza programas de avaliação externa da qualidade dos laboratórios (Instituto nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2022, Decreto-Lei n.º 27/2012).

Os objetivos do CQE são:

- Avaliar e comparar o desempenho dos laboratórios;
- Identificar diferenças interlaboratoriais;
- Harmonizar a metodologia nos laboratórios;
- Identificar situações não conformes, recomendar ações de melhoria, implementar as mesmas e eliminar o problema;
- Calcular incerteza de medição;
- Validar novas metodologias;
- Qualificar colaboradores;
- Promover confiança dos clientes do laboratório.

A participação em programas de avaliação externa da qualidade apresenta diversas vantagens, entre as quais, imparcialidade e independência, colaboração de uma rede de peritos nacionais e internacionais com competência reconhecida. Para além disso é dinâmico e ativo na resolução de problemas e questões e permite a melhoria continua com base nas entidades europeias. Neste programa participam grupos nacionais e internacionais que recolhem toda a informação importante com o objetivo de promover uma melhoria continua (Instituto nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2022).

Anualmente o LSPG participa em vários ensaios onde são avaliados todos os tipos de matrizes e todos os ensaios realizados no âmbito da acreditação. O procedimento para participação e avaliação dos ensaios de aptidão é efetuado de acordo com as instruções da entidade/fabricante.

A avaliação do desempenho do Laboratório participante é feita pela entidade organizadora. Em geral é usada a seguinte fórmula (“Z-score”):

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S}$$

X_{lab} - valor obtido pelo Laboratório;

X_v - valor aceite como verdadeiro;

S - Desvio padrão da média dos laboratórios participantes.

A avaliação é feita segundo a seguinte escala de pontuação (Relacre, 2000, LSPG, 2019b):

$|Z| < 2$: Satisfatório

$2 \leq |Z| \leq 3$: Questionável

$|Z| > 3$: Insatisfatório

Em suo, o LSPG avalia o desempenho dos seus processos através do Controlo de Qualidade Interno e também da Avaliação Externa da Qualidade, através da participação em Ensaio de Aptidão. A Análise de Tendências dos Ensaio de Aptidão é realizada através do Z-score de cada ensaio, registado em impresso próprio, carregado na aplicação de gestão documental.

Capítulo 5

5.1 Projeto Aplicado

A *Legionella pneumophila* é contraída pela inalação de água contaminada na forma de aerossol, ou, possivelmente, por aspiração pulmonar, apesar da transmissibilidade de pessoa para pessoa não estar comprovada cientificamente. A transmissão da bactéria tem origem, na maior parte das vezes, em ambientes aquáticos antropogénicos, como por exemplo torres de refrigeração, sistemas de água quente-frio, spas, equipamento hospitalar, ar condicionado e fontes, entre outros, uma vez que estes são capazes de, mais facilmente, originar aerossóis. A *Legionella pneumophila* encontra-se em meios aquáticos naturais e artificiais, entre os quais chuveiros, depósitos, cilindros e sistemas de ar condicionado. Na grande maioria dos casos a doença dos legionários está associada a ambientes manipulados pelo ser humano (Pizarro, 2022).

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), é descrita como “uma grande emergência de Saúde Pública”. Devido à patogenicidade que esta estirpe apresenta e com um objetivo de prevenção existe uma tendência crescente para a sua pesquisa (ERSAR, 2018).

A *Legionella* é uma bactéria Gram negativo, aeróbia estrita, catalase positiva, que possui uma largura entre 0,3 a 0,9 μm e um comprimento entre 2 a 20 μm . A sua forma de bastonete possui flagelos longos que lhe conferem mobilidade, podendo estes observar-se ao microscópio ótico após coloração. Atualmente, são conhecidas cerca de 50 espécies distintas de *Legionella* e mais de 70 serogrupos, sendo que a *Legionella pneumophila* possui 16 e é a responsável por mais de 70% das infeções que ocorrem no Homem (Portaria n.º 102-C/2021 de 14 de maio. Diário da República n.º 94 I Série., 2021).

A Doença dos Legionários é a forma mais severa da doença e foi responsável, ao longo de décadas, por diversos surtos mundiais. A taxa de mortalidade mundial associada à Doença dos Legionários é de 8-12%, sendo que no continente europeu é de cerca de 10%. Para determinados grupos de doentes, a taxa de mortalidade pode ser mais elevada, como acontece no caso dos fumadores, doentes com idade mais avançada, doentes com infeção nosocomial ou com atraso no diagnóstico ou tratamento da patologia. De acordo com os dados da DGS a Doença dos Legionário representa 4 a 9% das pneumonias agudas e 4 a 11% das pneumonias adquiridas em Hospitais (Vieira, 2018).

Existem diversos grupos de risco mais suscetíveis à transmissão de *L. pneumophila*, nomeadamente, os fumadores, os idosos, doentes com patologia cardiovascular ou respiratória crónica, diabetes, abuso de álcool, cancro e imunodepressão.

Este projeto teve três momentos bem definidos: inicialmente realizaram-se as colheitas das amostras em ar condicionado e chuveiros em diferentes serviços do Hospital Sousa Martins. Seguidamente efetuaram-se as análises das amostras por duas metodologias de modo a avaliar a existência de *Legionella pneumophila* nos mesmos. Por último, realizou-se uma análise estatística dos resultados obtidos.

5.1.1 Objetivos

Ciente da importância do controlo e da prevenção desta bactéria, sugeri este tema para complementar a minha formação durante o estágio.

Este projeto permitiu verificar se existe *Legionella pneumophila* nos serviços selecionados e assim contribuir para o controlo e prevenção deste microrganismo no Hospital Sousa Martins. Permitiu ainda fazer um despiste da presença de *Legionella* nos serviços analisados e assim contribuir para o bem-estar dos utentes/doentes e dos profissionais de saúde.

5.1.2 Metodologia

Numa fase inicial, para a análise teórica, recorreu-se à revisão da literatura científica e dos normativos legais para contextualizar a temática em estudo. Na fase da análise empírica, efetuou-se um estudo de caso adaptado especificamente aos serviços analisados. Ao longo do projeto foi abordada a importância da pesquisa da *Legionella pneumophila* em ambiente hospitalar assim como as suas consequências para utentes/doentes e profissionais.

Seguidamente foi realizada a colheita das amostras, pelo técnico de colheitas do LSPG, nos serviços e as amostras foram analisadas por NMP (método cultural) e por amplificação de ácido nucleico, RT-PCR.

As amostras destinadas à análise de *Legionella* devem ser colhidas por técnicos com conhecimento da ecologia da bactéria e avaliação geral de risco. O LSPG está acreditado pelo Instituto Português da Acreditação IPAC para a colheita de amostras de águas para análise de *Legionella*, pelo que as colheitas ficaram a cargo do técnico do LSPG.

A técnica de RT-PCR é um método com resultados rápidos, com valores de sensibilidade elevados, grande especificidade e que reduz o risco de contaminação cruzada, e permite detetar, de forma fiável, pequenas diferenças de expressão entre amostras. A técnica de RT-PCR usada no âmbito da biologia molecular permite a análise de quantidades muito pequenas de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), originando assim milhões de cópias da amostra inicial, esta técnica permite ampliar o material genético de um microrganismo patogénico em amostras de sangue, águas e alimentos. A RT-PCR em representa uma evolução face ao existente anteriormente, isto só foi possível devido aos avanços dos métodos moleculares de auxílio de diagnósticos. Ao longo da amplificação aumentam os produtos

PCR aumentando o sinal de fluorescência. O processo de amplificação divide-se em 3 fases: fase exponencial, linear e plateau. Se a eficiência for elevada espera-se que na fase exponencial os produtos de RT-PCR dupliquem em cada ciclo.(Vital, 2019)



Figura 18. Processo de Pesquisa e Quantificação de *Legionella* por PCR.

Por sua vez o Método Cultural por Metodologia de NMP, é um método eficaz e eficiente para a detecção de *Legionella pneumophila*, que não necessita de confirmação e que apenas deteta esta bactéria se estiver na sua forma ativa, com capacidade de proliferação.

É essencial que se proceda à análise por estas duas metodologias uma vez que a RT-PCR deteta ADN da bactéria podendo não estar viável ou num estado não cultivável. Por esse motivo, o método cultural deverá ser aplicado em paralelo com a análise de RT-PCR de forma que haja informação fiável e real sobre a presença/ausência desta bactéria e a sua viabilidade. Estas análises foram ambas realizadas no LSPG e estão ambas acreditadas pelo IPAC.

Por fim, foi efetuada uma análise dos resultados obtidos, bem como uma reflexão onde são apresentadas as conclusões, as limitações encontradas na elaboração deste projeto e as sugestões deixadas para estudos futuros (LSPG, 2020a, *ISO/TS 12869: 2019- Qualidade da água — Detecção e quantificação de Legionella spp. e/ou Legionella pneumophila por concentração e amplificação gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa.*, 2019).

5.1.3 Resultados e Discussão

Não foi detetada a presença de *Legionella pneumophila* em nenhuma das amostras analisadas, tanto na técnica de Legiolert como na RT-PCR. Estes resultados indicam que esta bactéria não está presente na sua forma viável, uma vez que o Legiolert deteta as formas viáveis dos microrganismos, mas também não esteve presente mesmo inativa uma vez que o PCR deteta ADN e caso a *Legionella* estivesse estado presente o resultado seria positivo. Podemos concluir que a água da ULSG aquando do momento da avaliação e nos serviços analisados está livre de *Legionella pneumophila* e, portanto, não põe em causa a saúde dos utentes que se encontram num estado de saúde mais débil, mas também não afeta os profissionais de saúde que com ela contactam. Podemos concluir que os planos de controlo e vigilância da *Legionella pneumophila* estão a ser eficazes implementados na ULSG são eficazes.

Capítulo 6

6-Análise Estatística

Ao longo do meu período de estágio no LSPG, desde o dia 1/09/2021 a 30/09/2022, foram analisadas diversas matrizes de águas. No gráfico da figura 19 podemos observar o número total de amostras analisadas e podemos concluir que as amostras mais analisadas corresponderam a águas de consumo e que as menos analisadas foram as hemodialises.

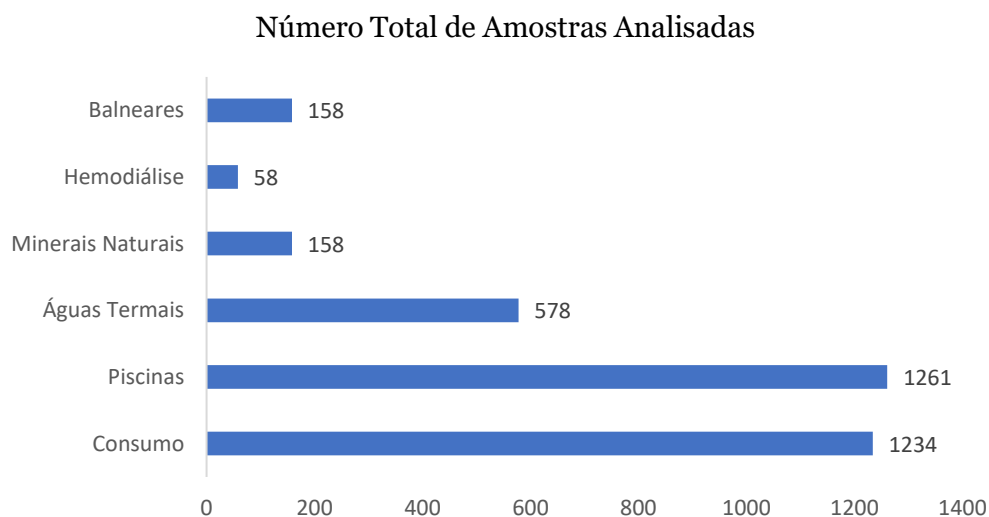


Figura 19- Número total de amostras analisadas

No gráfico da figura 20 estão representados os incumprimentos associados a cada matriz. Podemos concluir através de uma análise deste gráfico que a percentagem de incumprimentos é bastante reduzida tendo em conta o número de amostras analisadas neste período.

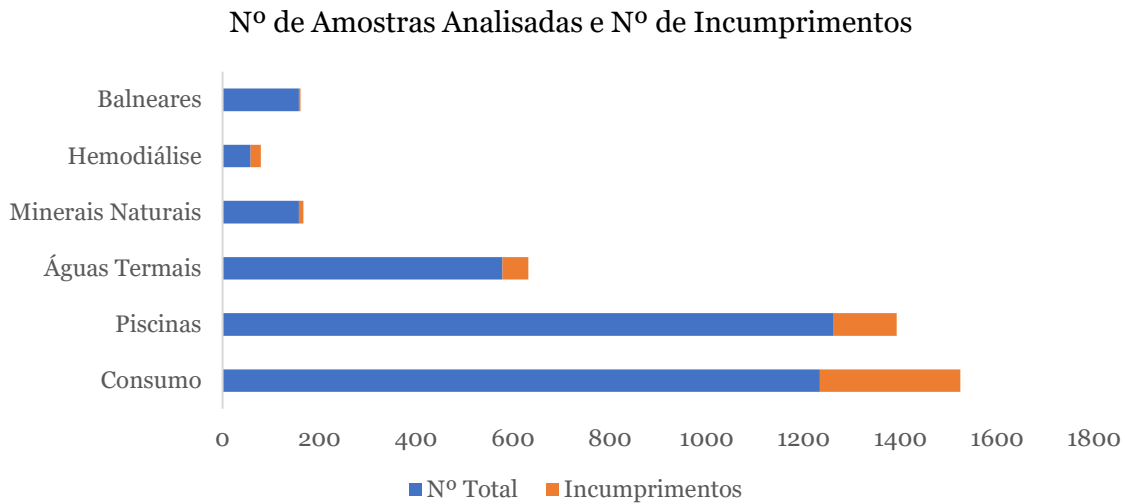


Figura 20-Incumprimentos nas amostras analisadas.

A análise de águas de piscinas foi a mais executada no LSPG ao longo do período de estágio tendo sido analisadas 1261 amostras e destas 132 apresentaram incumprimentos. A *Pseudomonas aeruginosa* foi o microrganismo causador do maior número de incumprimentos, correspondendo a 52% das mesmas. As bactérias coliformes foram a segunda maior causa de incumprimentos representando 28% das amostras, tal como podemos observar no gráfico da imagem 21.

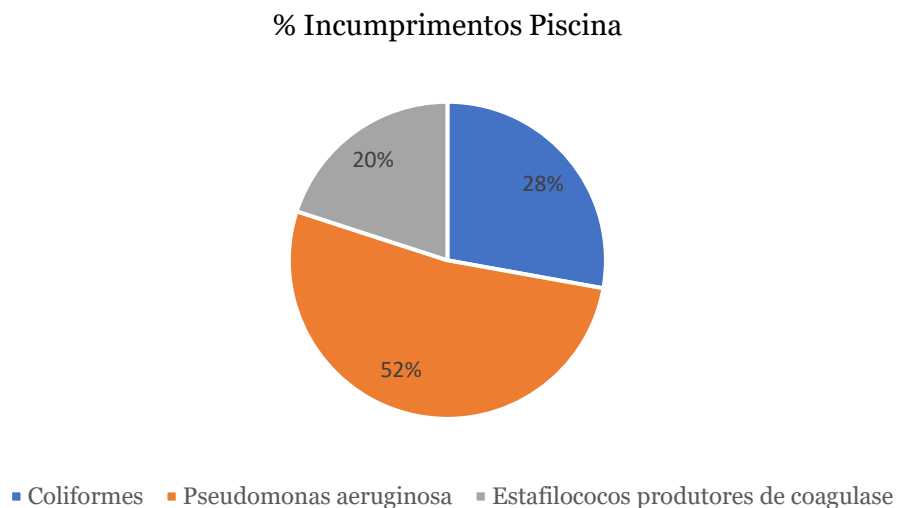


Figura 21-Incumprimentos em águas de piscina.

Da análise do gráfico da figura 22 observa-se que 53% das bactérias coliformes correspondem a *E.coli*. Podemos concluir que os microrganismos mais frequentemente associados a incumprimentos nas

piscinas são as *Pseudomonas aeruginosa* e as bactérias coliformes, o que pode indicar que algumas vezes o tratamento realizado aos tanques não é adequado ao número de utilizadores uma vez que a maioria dos incumprimentos se verificam no período de verão em que a afluência a estes estabelecimentos é máxima.

Presença de Coliformes em Piscinas

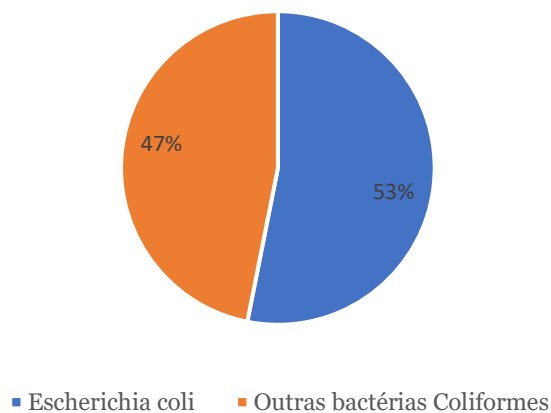


Figura 22-Bactérias coliformes em piscinas.

Os incumprimentos detetados nas águas de consumo devem-se principalmente a três microrganismos, bactérias coliformes (13%), enterococos fecais (4%) e *Clostridium perfringens* (3%) como podemos concluir pela observação do gráfico da imagem 23.

% Incumprimentos Águas de Consumo

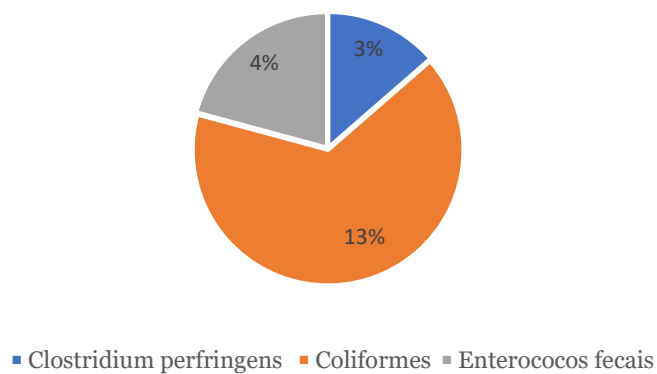


Figura 23-Incumprimentos nas águas de consumo.

Da análise do gráfico da figura 24 observa-se que 24% das bactérias coliformes correspondem a *E.coli*. Podemos concluir que o tratamento nas redes de distribuição de água de consumo é realizado de forma adequada uma vez que a grande maioria das amostras que apresentam incumprimentos são águas de furos ou poços.

Presença de Coliformes em Águas de Consumo

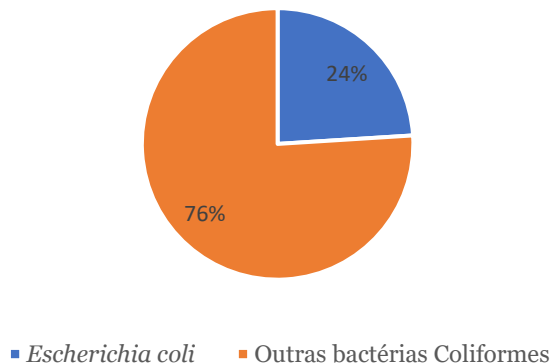


Figura 24- Percentagem de *E.coli* nas águas de consumo.

No que diz respeito às águas termais analisadas, das 578 amostras apenas 54 apresentaram incumprimentos o que corresponde a uma percentagem de cerca de 9%. Sendo que a maior fonte de contaminação é a *Pseudomonas aeruginosa* que corresponde a 83% dos incumprimentos, tal como podemos observar na figura 25.

% Incumprimentos Águas Termais

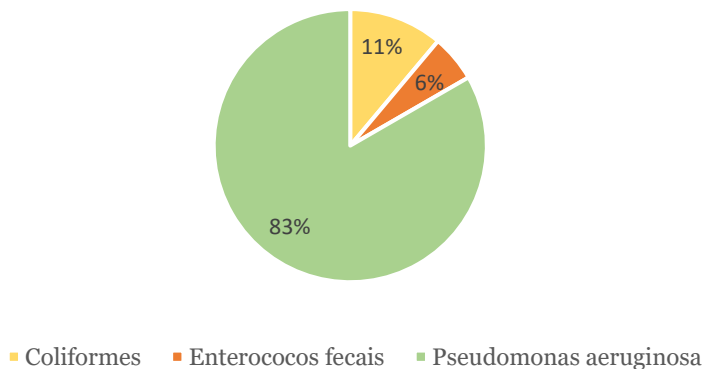


Figura 25- Incumprimentos verificados nas amostras de águas termais analisadas.

Das 158 amostras de águas minerais naturais analisadas no LSPG apenas 9 apresentaram incumprimentos, sendo a maioria causados por bactérias coliformes cerca de 89% e apenas 11% por enterococos fecais, tal como apresentado a figura 26.

% Incumprimentos Águas Minerais Naturais

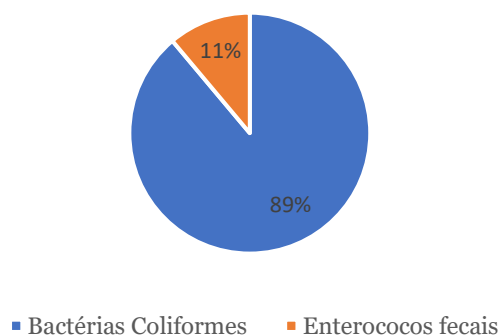


Figura 26- Incumprimentos verificados nas amostras de águas minerais naturais analisadas.

No que diz respeito à matriz das águas Balneares podemos concluir que das 158 amostras analisadas apenas 2%, das mesmas se encontravam em incumprimento, devendo-se à presença de enterococos fecais. Podemos concluir que as águas das praias balneares interiores são de excelente qualidade, não pondo em causa a Saúde Pública da população.

Balneares

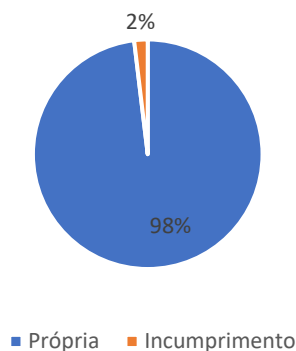


Figura 27-Incumprimentos nas águas balneares.

No que diz respeito às águas de hemodiálise, os incumprimentos foram verificados em 21 das 58 nas amostras analisadas deveram-se à presença de microrganismos a 37°C e a 22°C, sendo que as últimas representam 62% dos incumprimentos.

% Incumprimentos Hemodiálise

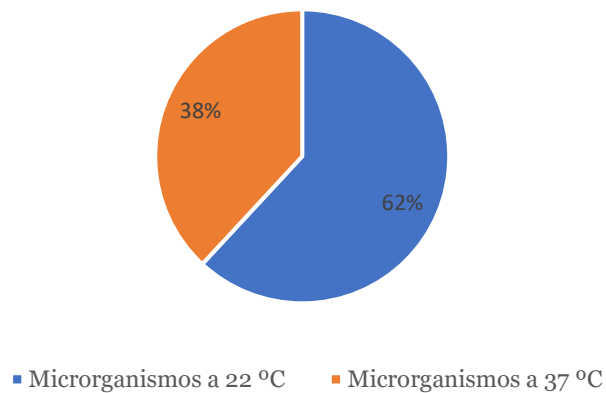


Figura 28-Incumprimentos em águas de hemodiálise.

Podemos concluir que nas amostras de água analisadas no LSPG, apenas uma pequena percentagem do número total de amostras ultrapassa os valores limites para os microrganismos indicadores legislados, o que evidencia a qualidade microbiológica da água que é fornecida à comunidade tanto para consumo para nas atividades de saúde e lazer

Capítulo 7

7-Conclusão

Este estágio teve como objetivo alargar os meus conhecimentos no ramo da microbiologia, mais especificamente, da microbiologia das águas. A água é um elemento essencial para a vida, por esse motivo a sua qualidade elevada na produção e fornecimento deve ser de preocupação primordial, já que tem um grande impacto na Saúde Pública. Uma elevada qualidade da água é um indicador de qualidade de vida e bem-estar social. Ao longo destes meses aprofundei alguns conceitos da área da microbiologia, adquiri novos conhecimentos, competência na realização de novas técnicas e consegui integrar-me numa equipa de trabalho multidisciplinar muito qualificada. Fui admitida à maioria das técnicas do setor microbiológico realizadas no laboratório e consegui sempre alcançar os objetivos a que me propus e ultrapassar as dificuldades, com o auxílio das minhas colegas que foram essenciais para o sucesso do meu estágio.

É essencial que se implementem programas de vigilância das águas para garantir o acesso à água potável à comunidade. A contaminação da água pode ter consequências graves para a saúde humana e para isso as análises frequentes aos sistemas de abastecimento, aos estabelecimentos termais, às piscinas e a todos os tipos de água que de alguma forma contactam coma população é de extrema importância pois possibilita a deteção de microrganismos patogénicos e conseqüentemente permite implementar medidas de tratamento adequadas e promover a Saúde Pública.

O LSPG é um laboratório que garante resultados rigorosos, robustos, com qualidade elevada, assegurados por uma equipa envolvida e com reconhecida competência. É um laboratório de referência na zona centro, acreditado e certificado, que tem uma grande confiança por parte dos clientes.

Capítulo 8

8-Referências

- Agência Portuguesa do Ambiente. (2020). *Norma de Avaliação de amostras únicas para a avaliação pontual da qualidade das águas balneares a adoptar durante a época balnear*. 2020.
- Águas Minerais e de Nascente de Portugal. (2016). Retrieved November 28, 2022, from <https://www.apiam.pt/conteudo/Definição-e-características/-/46>
- Almeida, C. (2013). *Controlo de Qualidade Interno : Elaboração de um programa de Controlo de Qualidade Interno segundo as boas práticas da Qualidade*. 80.
- Ambidata. (2022a). InnovWay® - Gestão - Soluções - ambidata. Retrieved July 7, 2022, from <https://www.ambidata.com/pt/solucoes/gestao/innovway/>
- Ambidata. (2022b). LabWay-LIMS® · Ambidata Partner Portal. Retrieved July 7, 2022, from <https://ambidatapartners.microsoftcrmpartals.com/pt-BR/partner-channel/labway-lims/>
- Bandeira, P., Meneses, W., Araújo, N., Filho, E., Gonzaga, F. e Lira, R. (2018). *Análise físico-química de água de um poço tubular antes e após a passagem da água pelo uso de um filtro natural feito com casca de arroz vermelho*. 1–6.
- Cachapa, F., Abel, M., Oliveira, L e Mestre, J. (2022). *Avaliação da qualidade das águas termais de Montipa, município de Bibala-Namibe*. <https://doi.org/10.51247/st.v5i1.188>
- Calado, J. (2018). *Norma ISO 9001:2018*.
- Clesceri, L., Greenberg, A. e Eaton, A. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22th Edition. *American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation*. Retrieved from http://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_4000-6000.pdf
- Colilert, 2022. (n.d.). Retrieved October 17, 2022, from https://www.google.com/search?q=colilert&tbm=isch&chips=q:colilert,online_chips:comparator:FtzW6-kiJ4Q%3D&rlz=1C1GCEU_pt-BRPT989PT989&hl=pt-PT&sa=X&ved=2ahUKEwiC_8-B3-f6AhVKkicCHZw2BdUQ4lYoAHoECAEQJQ&biw=1351&bih=695#imgrc=Zwsjk2XaVSp1aM
- Cunha, M. (2016). *Execução de ensaios microbiológicos e atividades conexas nas áreas alimentar, ambiental e técnica, em contexto empresarial*. 1–140.
- Decreto-Lei 152/2017*. (2017). Retrieved from <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-lei/152-2017-114315242>
- Decreto-Lei n.º 113/2012*. (2012). *Decreto-Lei n.º 113/2012*, 2011–2012.
- Decreto-Lei nº306/2007*. (2007). *Planta*, 0–1.
- Dionísio, M. (2022). *Implementação da Norma NP EN ISO 9001:2015 e Certificação do Laboratório de Saúde Pública da Guarda*.
- Direção-Geral da Saúde. (2009). Circular Normativa 14/DA-Programa de Vigilância Sanitária de Piscinas. *Ministério Da Saúde*, 1–54. Retrieved from <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-14da-de-21082009-pdf.aspx>
- Direção-Geral da Saúde. (2017). *Norma nº 010/2017. Programa de Vigilância Sanitária das Zonas Balneares Interiores*. (Execução do Programa de Vigilância Sanitária das Zonas Balneares Interiores), 1–28. Retrieved from <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0102017-de-06072017.aspx>

- ERSAR. (2018). Regime legal do controlo da qualidade da água para consumo humano. *Ersar*, (1), 1–94.
- ERSAR, 2011. (2011). *IRAR A reforma dos serviços de águas em Portugal O que são e o que caracteriza os serviços de águas ?*
- Fernandes, L. (2014). Avaliação microbiológica e físico-químicas da qualidade da água para o consumo humano na província do planalto central - Huambo - Angola. *English Language Teaching*, 39(1), 1–24. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025><http://dx.doi.org/10.1038/nature10402><http://dx.doi.org/10.1038/nature21059><http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/eqilibrium/article/view/1268/1127><http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Ferreiro, N. (2017). *Legiolert-Número Mais Provável Pesquisa e Quantificação de Legionella pneumophila*.
- Frazão, P. (2015). *Controlo da qualidade em águas para consumo humano*.
- Gomes, A. (2017). *Implementação da ISO 16266- Detecção e contagem de Pseudomonas aeruginosa em água de consumo por membrana de filtração Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar*. 78.
- Instituto nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2022). *Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade*. 1–11.
- Instituto Português da Acreditação. (2017). *Laboratórios de águas, efluentes líquidos e amostras sólidas ambientais- Âmbito de acreditação*.
- ISO/TS 12869: 2019- *Qualidade da água — Detecção e quantificação de Legionella spp. e/ou Legionella pneumophila por concentração e amplificação gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa*. (2019). 1–52.
- ISO 11133:2015-*Microbiologia de alimentos, ração animal e água — Preparação, produção, armazenamento e testes de desempenho de meios de cultura*. (2014).
- ISO 14189- *Qualidade da água- Enumeração de Clostridium perfringens- Método de membrana filtrante*. (2013).
- ISO 16266-2:2018- *Qualidade da água- Detecção e enumeração de Pseudomonas Aeruginosa- Número Mais Provável*. (2018).
- ISO 6222:1999- *Qualidade da água Enumeração de Microrganismos cultiváveis-Contagem de colónias em meio nutritivo de agar*. (1999).
- ISO 7899-2:2000- *Qualidade da água- Detecção e Enumeração de Enterococos intestinais- Método de membrana filtrante*. (2000).
- ISO 9308-1:2016- *Qualidade da água- Enumeração de Escherichia coli e bactérias coliformes- Método de membrana filtrante*. (2016). Retrieved from www.iso.org
- ISO 9308-2:2012-*Enumeração de Escherichia coli e bactérias coliformes- Método do Número amis Provável*. (2012).
- Jesus, P., Ferreira, J., Carmo, J., Albertino, S., Net, S., Santos, L. e Zamith, H. (2021). *Monitorização da qualidade da água utilizada nos serviços de diálise móvel em unidades de tratamento intensivo no município do Rio de Janeiro*. 9. Retrieved from <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2020-0217>
- LSPG. (2017). *Procedimento Coloração de GRAM*.
- LSPG. (2018a). *Procedimento de Ensaio interno para Pesquisa e Quantificação de Enterococos fecais NMP*.

- LSPG. (2018b). *Procedimento de Ensaio para Pesquisa e Quantificação de Clostridium perfringens*.
- LSPG. (2018c). *Procedimento segundo a norma ISO 6222 : 1999 6 . Material e Equipamento*. 5–9.
- LSPG. (2018d). *Procedimento segundo a Norma ISO9308-2*.
- LSPG. (2019a). *Procedimento de Ensaio para Pesquisa e Quantificação de Pseudomonas aeruginosa segundo a norma ISO 16266-2*.
- LSPG. (2019b). *Procedimento do Controlo de Qualidade Externo*.
- LSPG. (2020a). *Procedimento de ensaio para pesquisa e quantificação de Clostridium perfringens*.
- LSPG. (2020b). *Procedimento interno para Pesquisa e Quantificação de Legionella pneumophila método NMP*.
- LSPG. (2021a). *Composição, hidratação e conservação de meios de cultura*. 1–31.
- LSPG. (2021b). *Procedimento de Colheitas de amostras de Água*.
- LSPG. (2021c). *Procedimento de Ensaio para Pesquisa e Quantificação de esporos de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras*.
- LSPG. (2021d). *Procedimento de Ensaio para Pesquisa e Quantificação de Estafilococos totais e coagulase positiva*.
- LSPG. (2021e). *Procedimento de ensaio segundo a norma ISO 7899-2:2000*.
- LSPG. (2021f). *Procedimento interno para a desinfeção das rampas de filtração*.
- LSPG. (2021g). *Procedimento para o Controlo de Qualidade-Esterilidade Microbiologia*.
- LSPG. (2022a). *Controlo de Lotes de Meios de Cultura*. (31), 1–12.
- LSPG. (2022b). *Controlo de Qualidade Analítica (CQI e CQE)*.
- LSPG. (2022c). *Procedimento de Ensaio Microbiologia de águas Procedimento Interno para Pesquisa e Quantificação de bactérias coliformes fecais*. (04), 2–5.
- LSPG. (2022d). *Procedimento interno para Pesquisa e Quantificação de Pseudomonas aeruginosa*.
- Mansoorian, H., Zarei, S. e Khanjani, N. (2015). *Survey of bacterial contamination of environment of swimming pools in Yazd city*. 2(3), 123–128.
- Manual Boas Práticas Hemodiálise Nº11 482*. (2001). 482–499.
- Martins, A. (2018). *Implementação da ISO 14189 (2013) - Water Quality - Enumeration of Clostridium perfringens - Method using membrane filtration*. 14189(2013), 1–60. Retrieved from <https://comun.rcaap.pt/handle/10400.26/28153>
- Martins, V. (2013). *Relatório de Estágio Profissional II*.
- Nogueira, A. (2007). *Qualidade microbiológica e química das águas de consumo humano do Distrito de Bragança*. 27.
- NP 4343 (1998)- *Qualidade da água- Pesquisa e quantificação de Estafilococos*. (1998).
- NP EN 26461-2:1994- *Qualidade da água- Pesquisa e Quantificação de bactérias anaeróbias sulfito-redutoras*. (1994).
- NP EN ISO/IEC 17025:2017. (2017).
- NP EN ISO 9001:2015. (2015). Retrieved from www.iso.org/iso/foreword.html.

- Odonkor, S. e Ampofo, J. (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>
- ONU. (2016). Guia sobre Desenvolvimento Sustentável. *Guia Sobre Desenvolvimento Sustentável*, 1–38. Retrieved from https://www.unric.org/pt/images/stories/2016/ods_2edicao_web_pages.pdf
- Paradigmas, N. (2007). *Universidade de Lisboa*.
- Pessoa, J. (2014). *Manual de Segurança Laboratório de Microbiologia*. 1–27.
- Pizarro, C. (2022). *Legionella nos Sistemas de Água*.
- Portaria n.º 102-C/2021 de 14 de maio. *Diário da República n.º 94 I Série*. (2021). (10).
- Portaria n.º 102-B/2021 de 14 de maio. *Diário da República n.º 94- I Série*. (2021). (2), 3–4.
- Relacre. (2000). *Guia 13*.
- Souza, L. (2017). *Clostridium perfringens-Monografia de Pós Graduação em Microbiologia-Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais*. 46.
- Tomaz, S. (2011). *Qualidade Microbiológica da Água das Piscinas do Distrito de Aveiro-Tese de Mestrado em Microbiologia. Universidade de Aveiro*. 75.
- Vieira, J. (n.d.). *Água e Saúde Pública. 1ª edição, Edições Sílabo. Lisboa, 2018*.
- Vilhena, F. (2015). Controlo De Qualidade Em Laboratório Clínico: Hemoglobinopatias. *Repositório INSA*, 21, 23, 24, 27.
- Vital, I. (2019). *Deteção, identificação e quantificação de Legionella spp. em amostras de água: comparação da técnica de PCR-RT com o Método Cultural*.
- Water, D. (2017). *Launch version July 12 2017 Progress on Drinking Water , Sanitation and Hygiene*.
- WHO. (2006). *Guidelines for safe for safe recreational water environments creational water environments. Volume 2, Swimming pools and similar environments. 2*.
- WHO. (2012). *Water quality for drinking: WHO guidelines*. 876–883. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4410-6_184
- WHO. (2015). *World Heath Statistics*. World Health Organization.