

MSc

2.º
CICLO

FCUP
UM
2021

U.PORTO

Validação secundária do método de contagem de
Staphylococcus spp. e *Staphylococcus coagulase*
positiva e auditoria interna

Bianca Marlene da Silva Rodrigues

FC



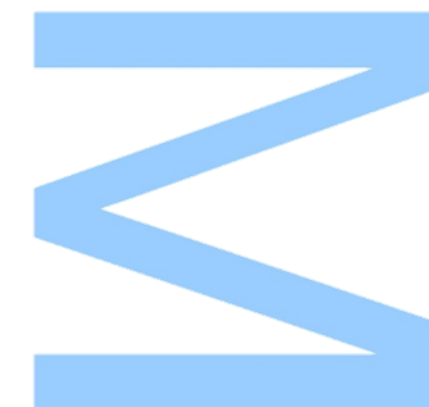
Universidade do Minho



Validação secundária do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva e auditoria interna

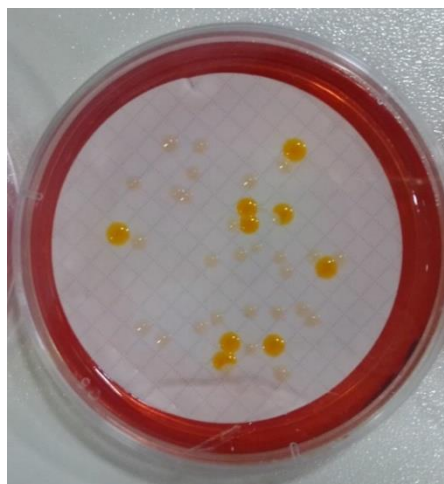
Bianca Marlene da Silva Rodrigues

Relatório de Estágio de Mestrado apresentado à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
e à Universidade do Minho em
Tecnologia e Ciência Alimentar
2021

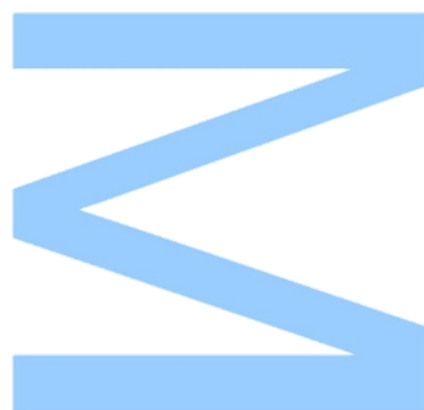


Universidade do Minho





Validação secundária do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva e auditoria interna



Bianca Marlene da Silva Rodrigues

Tecnologia e Ciência Alimentar

Departamento de Química e Bioquímica

2021

Orientador FCUP

Prof. Dr. Fernando Manuel dos Santos Tavares, Professor Associado, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Supervisora Empresa

Dra. Andreia Poças, Responsável Técnica Microbiologia, *Silliker* Portugal, S.A.



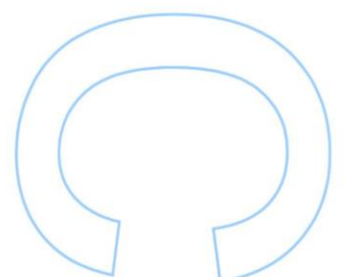
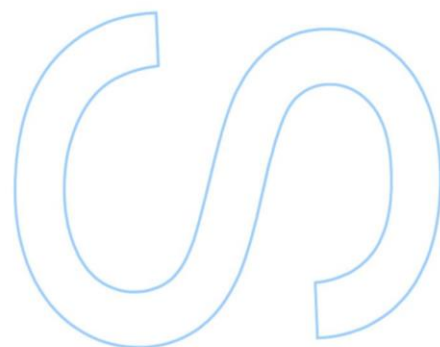
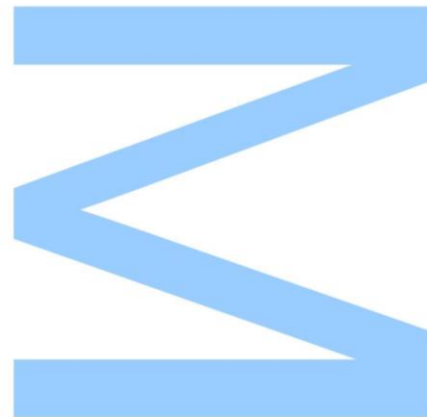
Universidade do Minho



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à *Silliker* Portugal, S.A por me ter acolhido e me ter dado a oportunidade de realizar o meu estágio nas suas instalações.

Agradeço também à Dra. Andreia Poças por todo o acompanhamento, disponibilidade e simpatia durante estes nove meses de estágio na *Silliker* e ao professor Dr. Fernando Tavares pelo apoio, disponibilidade, simpatia e orientação na elaboração deste relatório de estágio. Quero também dirigir a minha gratidão a todos os colaboradores da *Silliker*, em particular aos analistas do laboratório de microbiologia, por todo o carinho e disponibilidade que demonstraram ao longo destes meses, e por todo o conhecimento que me transmitiram.

Um agradecimento a todos os meus amigos que me foram acompanhando ao longo destes anos, especialmente ao meu grupinho de licenciatura que se manteve desde o meu primeiro ano de faculdade. E também às minhas colegas de casa, da RUCA I, que sempre me apoiaram e se tornaram na minha segunda família ao longo destes anos de vida académica. Quero também agradecer à minha colega de estágio, por todo o apoio e força que me transmitiu e toda a ajuda que me deu num período menos bom da minha vida.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer à minha família, principalmente à minha mãe e ao meu irmão, por toda a força, incentivo e confiança e por me fazerem lutar pelos meus objetivos e nunca desistir.

Resumo

A água é um recurso imprescindível para a vida na terra. Esta é fundamental no auxílio de funções extremamente importantes para o corpo humano, tendo também um papel essencial em diversos setores da economia, tais como a agricultura, a pesca, atividades recreativas, entre outras. A procura por atividades recreativas em água tem vindo a aumentar, principalmente pelos seus benefícios associados à saúde e bem-estar. No entanto, esta prática pode estar relacionada a vários tipos de perigos, como perigos biológicos, físicos e/ou químicos. Os agentes biológicos resultam principalmente dos próprios banhistas e de fontes ambientais. Quando presentes na água, estes podem resultar em vários problemas, como doenças gastrointestinais. De modo a minimizar estes perigos potencialmente presentes na água, a análise microbiológica torna-se numa ferramenta essencial para garantir a segurança dos banhistas e a qualidade da água.

O presente trabalho teve como objetivo a validação secundária e auditoria interna do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva de acordo com a Norma Portuguesa 4343:1998 – Qualidade da água: Pesquisa e Quantificação de Estafilococos. A metodologia aplicada consistiu na filtração de água através de uma membrana que foi posteriormente colocada no respetivo meio de crescimento. Após a obtenção de colónias e, de modo a confirmar a presença de *Staphylococcus*, estas foram sujeitas a estudos morfológicos e bioquímicos. Por fim, realizou-se uma auditoria interna ao método de modo a verificar se o mesmo cumpria com os requisitos impostos na norma.

Foram analisadas 33 amostras de águas de piscinas, as quais originaram 110 resultados provenientes de amostras naturalmente contaminadas, amostras contaminadas artificialmente e amostras não contaminadas, realizadas em duplicado e/ou paralelo. Os parâmetros determinados, nomeadamente, a sensibilidade (100%), especificidade (100%), taxa de falsos positivos e negativos (0%), seletividade (84%) e eficiência (100%) apresentaram valores satisfatórios e dentro do pretendido. Foram também avaliados, a produtividade do meio, o critério de precisão, a exatidão e a incerteza do método que obtiveram resultados aceitáveis. A auditoria interna demonstrou a ausência de não conformidades.

Este trabalho demonstra a importância da realização de análises microbiológicas e a relevância da validação dos métodos utilizados e das suas auditorias internas, de

modo a garantir resultados credíveis, consistentes e a usufruir de uma melhoria contínua do sistema de gestão da qualidade.

Palavras-chave: Água, análises microbiológicas, microrganismos indicadores, *Staphylococcus aureus*, NP 4343:1998, validação de métodos, auditoria interna

Abstract

Water is an essential resource for life on earth. This is fundamental in extremely important functions for the human body and plays an essential role in various sectors of the economy, such as agriculture, fishing, recreational activities, among others. The demand for recreational activities in water has been increasing, mainly for their associated health and well-being benefits. However, this practice can be related to several types of hazards, such as biological, physical and/or chemical hazards. Biological agents result mainly from bathers themselves and from environmental sources. When present in water these can result in various problems such as gastrointestinal illnesses. To minimize these hazards potentially present in water, microbiological analysis becomes an essential tool to ensure the safety of bathers and the quality of the water.

The present work aimed to validate and internally audit the method of enumeration of total staphylococci and coagulase positive staphylococci according to NP 4343:1998 – Water quality: Detection and enumeration of staphylococci. The applied methodology consisted of filtering water through a membrane that was after placed in the respective growth medium. After obtaining colonies and, to confirm the presence of staphylococci, they were subjected to morphological and biochemical studies. Finally, an internal audit of the method was carried out to verify if it complied with the requirements imposed by the standard.

A total of 33 swimming pool water samples were analyzed, resulting in 110 results from naturally contaminated samples, artificially contaminated samples, and non-contaminated samples, performed in duplicate and/or in parallel. The parameters determined, namely, sensitivity (100%), specificity (100%), rate of false positives and negatives (0%), selectivity (84%) and efficiency (100%) presented satisfactory values. The medium's productivity, the precision criteria, the accuracy, and the uncertainty of the method were also evaluated, obtaining acceptable results. The internal audit demonstrated the absence of non-compliances.

This work demonstrates the importance of carrying out microbiological analyses and the relevance of validating the methods used and their internal audits to ensure credible and consistent results and benefit from continuous improvement in the quality management system.

Keywords: Water, microbiological analysis, indicator microorganisms, *Staphylococcus aureus*, NP 4343:1998, method validation, internal audit

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo	vi
Abstract	viii
Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Breve apresentação da empresa	1
1.2. Enquadramento geral	3
1.3. Águas recreativas.....	5
1.3.1. Benefícios e riscos associados à sua utilização.....	6
1.3.1.1. Perigos físicos	7
1.3.1.2. Perigos químicos	7
1.3.1.3. Perigos biológicos.....	7
1.3.2. Microrganismos indicadores da qualidade da água	9
1.3.2.1. Microrganismos cultiváveis a 37 °C	10
1.3.2.2. Coliformes totais.....	10
1.3.2.3. Coliformes fecais/ <i>Escherichia coli</i>	10
1.3.2.4. <i>Enterococcus</i> spp.	11
1.3.2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.3.2.6. <i>Legionella</i> spp.	12
1.3.2.7. <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	12
1.4. Tratamento da água	14
1.5. Legislação	16
1.6. Validação de métodos	18
1.6.1. Caraterísticas de desempenho	21
1.6.1.1. Sensibilidade	22
1.6.1.2. Especificidade	22
1.6.1.3. Taxa de falsos positivos	22

1.6.1.4. Taxa de falsos negativos	23
1.6.1.5. Seletividade	23
1.6.1.6. Eficiência	23
1.7. Auditoria	24
1.8. Objetivos	25
2. Materiais e Métodos	26
2.1 Amostragem	26
2.2 Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	30
3 Resultados e Discussão	35
3.1 Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva	36
3.2 Auditoria interna ao método	47
4 Conclusão.....	57
5 Referências Bibliográficas	58

Lista de Tabelas

Tabela 1: Possíveis perigos biológicos presentes em piscinas e ambientes semelhantes.....	8
Tabela 2: Parâmetros microbiológicos a analisar em águas de piscinas (adaptado de Direção Geral de Saúde, 2009; Ministério do Equipamento, do Planeamento e da Administração do território, 1997).....	17
Tabela 3: Cálculos utilizados para as características de desempenho de um método quantitativo (adaptada de Silliker Portugal S.A.,2020).....	21
Tabela 4: Amostras analisadas para a validação do método de contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> produtores de coagulase.....	27
Tabela 5: Resultados obtidos para a contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. (a) e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (b).....	36
Tabela 6: Resultados dos parâmetros obtidos para a validação do método de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (adaptada de Silliker Portugal S.A., 2020).....	45
Tabela 7: Resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial para a contagem de <i>Staphylococcus</i> spp.....	46
Tabela 8: Resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial para a contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	46
Tabela 9: Tópico da auditoria ao método relacionado com questões e problemas obtidos durante a auditoria ao mesmo e respetivos comentários.....	47
Tabela 10: Tópico da auditoria ao método relacionado com a lista de verificação ao analista e respetivos comentários.....	48
Tabela 11: Tópico da auditoria ao método relacionado com o princípio do método e respetivos comentários.....	49
Tabela 12: Tópico da auditoria ao método relacionado com as reclamações dos clientes e respetivos comentários.....	50
Tabela 13: Tópico da auditoria ao método relacionado com o teste ao método e respetivos comentários.....	51

Tabela 14: Tópico da auditoria ao método relacionado com a execução do método e respetivos comentários.....52

Tabela 15: Tópico da auditoria ao método relacionado com a rastreabilidade e respetivos comentários..... 53

Tabela 16: Tópico da auditoria ao método relacionado com a lista de verificação ao analista e respetivos comentários..... 54

Tabela 17: Tópico da auditoria ao método relacionado com os registos e documentação e respetivos comentários.....55

Lista de Figuras

Figura 1: Instalações da <i>Silliker</i> Portugal S.A em Canelas, Vila Nova de Gaia.....	1
Figura 2: Esquema com algumas das creditações e serviços adquiridos ao longo dos anos pela <i>Silliker</i> Portugal, SA.....	2
Figura 3: Recipientes utilizados para a recolha de água (a) e rampa de filtração das águas (b).....	30
Figura 4: Placas com o meio <i>Mannitol Salt Agar</i>	31
Figura 5: Esquema com alguns passos da Coloração de Gram.....	32
Figura 6: Gráfico de produtividade obtido para o meio MSA.....	35
Figura 7: Placas de meio MSA com colónias suspeitas de <i>Staphylococcus</i> , nomeadamente, colónias brancas (a) e colónias amarelas onde ocorreu mudança de cor do meio (b).....	40
Figura 8: Coloração Gram das amostras suspeitas de <i>Staphylococcus</i> , onde se pode observar células azul-violeta, correspondendo assim a bactérias Gram-positivas.....	41
Figura 9: Resultados do tipo respiratório – Com crescimento na presença de oxigénio nos tubos 1 e 2 (crescimento apenas na parte superior do tubo) e crescimento na presença e ausência de oxigénio nos restantes tubos (crescimento por todo o tubo e mudança de cor).....	42
Figura 10: Resultados da pesquisa de coagulase: a - <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (não formação de coágulo); b - <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (formação de coágulo).....	42

Lista de Abreviaturas

BHI – Meio *Brain Heart Infusion*

C – Conforme

DGS – Direção Geral de Saúde

DPCS – *Daily Process Control Samples*

ECI – Ensaio de Comparação Interlaboratorial

EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade

FSC – *Food Science Center*

ISO – *International Organization for Standardization*

LGC – *Laboratory of the Government Chemist*

MEVAG – Meio de estudo da via de ataque aos glícidos (do francês, Milieu d'Étude de la Voie d'Attaque des Glucides)

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina

MSA – Meio *Mannitol Salt Agar*

NA – Não Aplicável

Meio NA – Meio *Nutrient Agar*

NC – Não Conforme

NP – Norma Portuguesa

OMS – Organização Mundial de Saúde

PHE – *Public Health England*

TSA – Meio *Tryptic Soy Agar*

UFCs – Unidades Formadoras de Colónias

UV – Ultravioleta

VL – Valor Limite

VR – Valor Recomendado

1. Introdução

1.1. Breve apresentação da empresa

A *Silliker* Portugal S.A é uma empresa independente associada aos vários ramos do setor agroalimentar. Surgiu inicialmente em Vila Nova de Gaia em 1992 como Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda (EGI), assumindo rapidamente a posição de líder nacional no setor numa altura em que a prevenção e a segurança alimentar se acentuavam no mercado. Integra desde 1993 o Sistema Português da Qualidade através da acreditação do seu laboratório. Em 2000 surge o laboratório de Análise Sensorial e em consequência do seu forte crescimento, a EGI muda em 2005 para novas instalações em Canelas (figura 1), projetadas para albergar os seus laboratórios e todos os seus serviços (*Silliker* Portugal S.A., 2021a, 2021b).



Figura 1: Instalações da *Silliker* Portugal S.A em Canelas, Vila Nova de Gaia

Em 2008, a multinacional norte-americana *Silliker* adquire 86% do capital da empresa, dando origem à *Silliker* Portugal S.A. e passando a integrar um dos maiores grupos mundiais na prestação de serviços na área da qualidade e segurança alimentar.

Em 2009, lança o serviço de Estudos de Vida Útil e no ano seguinte obtém a acreditação dos 8 primeiros ensaios de águas de consumo humano (4 ensaios microbiológicos e 4 ensaios físico-químicos).

Em 2012, obtém a acreditação para mais dois ensaios físico-químicos e para a colheita das amostras de água de consumo humano, surgindo em 2013 o serviço de

análises aos materiais de embalagem que entram em contacto direto com os géneros alimentícios, oferecendo assim a possibilidade de avaliação de todos os aspetos do produto, desde o design e fabrico até à sua utilização final (Silliker Portugal S.A., 2021a, 2021b).

Em 2016, alcança a acreditação flexível global para 48 ensaios acreditados de físico-química e passam a utilizar globalmente a marca *Mérieux NutriSciences*.

Em 2018, obtém a acreditação para análise de águas minerais naturais e de nascente e águas naturais superficiais e subterrâneas. Para além disso, lançam dois novos serviços: Relatórios Nutricionais e Gestão de Crises.

Em 2020, inauguram o escritório em Lisboa, que serve de base para a Assessoria Técnica e como centro de gestão das amostras, inaugurando também o *Food Science Center* (FSC) Portugal. Na figura 2, encontram-se representados alguns dos marcos anteriormente descritos de forma mais esquematizada.

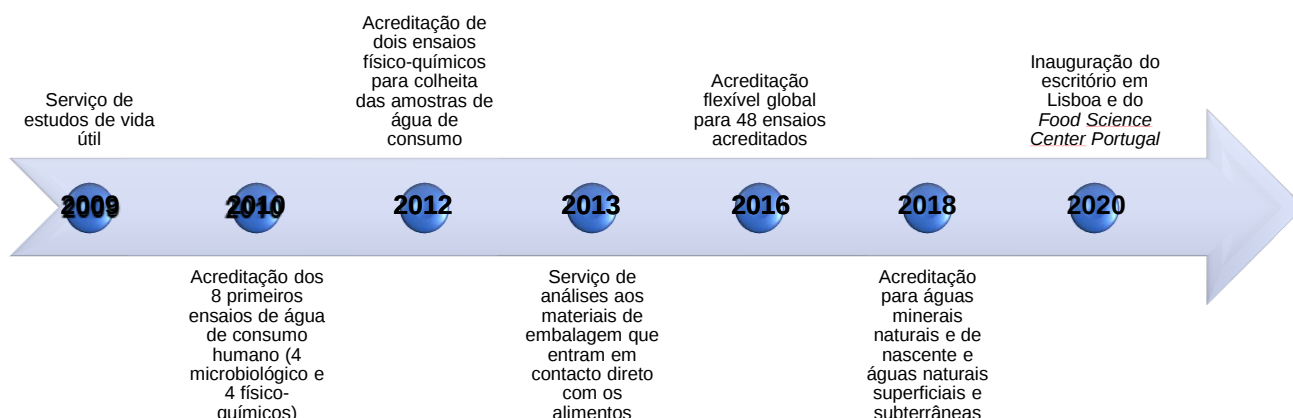


Figura 2: Esquema com algumas das creditações e serviços adquiridos ao longo dos anos pela *Silliker* Portugal, SA

Após 50 anos de experiência no mercado, a *Mérieux NutriSciences* encontra-se presente em 26 países com mais de 100 laboratórios acreditados segundo a ISO/IEC 17025. Dedicar-se à proteção da saúde dos consumidores através de uma diversa oferta de serviços analíticos e de consultoria para as indústrias do setor alimentar e da nutrição. Os seus valores englobam a excelência, a responsabilidade, integridade e iniciativa. Para além disso, disponibiliza também serviços a empresas de diferentes áreas, nomeadamente nas áreas de ambiente, água, bens de consumo, farmacêutica e cosméticos (Silliker Portugal S.A., 2021a, 2021b).

1.2. Enquadramento geral

A água é um dos bens mais essenciais ao ser humano. É um recurso natural indispensável e fundamental para a sobrevivência de qualquer forma de vida existente no planeta Terra (Odonkor & Ampofo, 2013).

O corpo humano é constituído por aproximadamente 75 % de água. Esta é utilizada para manter a homeostase do corpo, auxiliando em funções extremamente importantes, tais como, regulação da temperatura corporal, remoção de toxinas e transporte de nutrientes pelo corpo (Khalifa & Bidaisee, 2018; Odonkor & Ampofo, 2013). Estima-se que cada pessoa necessite de uma média de 20 a 50 litros de água potável por dia, quer seja para beber, cozinhar, higiene, etc. (Khalifa & Bidaisee, 2018).

A importância da água não se restringe apenas ao corpo humano, esta desempenha um papel vital em diferentes setores da economia, tais como, na agricultura, pecuária, atividades industriais, atividades recreativas, entre outras (Tyagi *et al.*, 2020).

Apesar da sua extrema relevância, o acesso a água potável continua a ser um problema para mais de um bilião de pessoas, sendo que cerca de 2,3 mil milhões sofrem todos os anos com doenças relacionadas à utilização de água imprópria para consumo e cerca de 40.000 acabam por morrer anualmente devido ao consumo da mesma (Leon *et al.*, 2003).

Estes dados realçam o quão é imprescindível o acesso a boas condições higiénico sanitárias e a água potável. Para tentar combater a falta de acesso às mesmas, a Assembleia Geral das Nações Unidas declarou em 28 de Julho de 2010, que a água limpa, segura e o saneamento básico é um direito humano essencial (Unity Nations, 2010).

De modo a garantir que uma água se encontra nas devidas condições para ser utilizada, é necessário proceder a análises, nomeadamente, organoléticas, físico-químicas e microbiológicas.

A análise microbiológica visa analisar a presença ou ausência dos diferentes tipos de microrganismos. Os microrganismos encontram-se presentes na natureza de forma ubíqua, sendo que a sua existência pode trazer benefícios ao ser humano, contudo, em alguns casos, esta pode ser prejudicial para o mesmo. Os microrganismos são

usados na indústria alimentar no fabrico de produtos como iogurtes, cerveja, vinho, entre outros e na indústria farmacêutica na produção de antibióticos e vacinas. No entanto, apesar da existência de microrganismos com utilizações benéficas, existem outros que são conhecidos por serem responsáveis por doenças transmitidas pelo consumo de alimentos e consumo/contacto com água contaminados (Chauhan & Jindal, 2020).

A análise microbiológica tem como objetivo, portanto, determinar se certo produto se encontra adequado para o consumo humano ou se o mesmo atende a algum critério microbiológico estabelecido (Chauhan & Jindal, 2020). A microbiologia atua em diversas áreas, tais como, na área alimentar, ambiental, veterinária, clínica, entre outras. Um dos seus importantes setores é a análise das águas. Estas análises têm como objetivo monitorizar e verificar a qualidade e segurança de vários tipos de águas. Estas águas englobam as utilizadas para consumo humano ou na preparação de alimentos, águas tratadas utilizadas para a recreação (como piscinas, spas e piscinas de hidroterapia), águas recreativas não tratadas (como rios, lagos) e águas não tratadas para consumo humano (como poços e furos) (Al-khatib *et al.*, 2011; Barrell *et al.*, 2000; Chauhan & Jindal, 2020).

A prática de atividades recreativas em água é algo que se tem intensificado ao longo do tempo, tanto pelos benefícios associados à saúde e bem-estar, como por simples lazer, sendo a natação uma atividade bastante praticada nos dias de hoje. No entanto, esta prática pode estar associada a vários tipos de perigos, tais como, perigos biológicos, físicos e/ou químicos (Araştırılması, 2019; Fadaei & Amiri, 2015; Pasquarella *et al.*, 2013).

Para evitar a ocorrência destes perigos e, portanto, avaliar se uma água se encontra dentro dos parâmetros impostos é então necessário recorrer à avaliação das suas propriedades físico-químicas e microbiológicas. Em relação a estas últimas e dependendo do tipo de águas e do uso pretendido, existe um conjunto de microrganismos que servem de referência para avaliar a qualidade microbiológica da água. No caso de serem águas recreativas, pesquisam-se microrganismos de origem fecal e de origem não fecal. Dentro dos não fecais incluem-se os microrganismos patogénicos, nomeadamente os *Staphylococcus* (Bello & Temitope, 2012; Ibarluzea *et al.*, 1998; WHO, 2006).

Os *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas, de forma esférica, imóveis que se encontram principalmente na pele, vias respiratórias e mucosa nasal de animais de

sangue quente (Adams & Moss, 2008). Estes dividem-se em *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus* coagulase positiva, encontrando-se nestes últimos, *Staphylococcus aureus*. Foram primeiramente descritos em 1881 por um cirurgião escocês, Sir Alexander Ogston, como causadores de pus em humanos (infecções piogénicas), que após a sua observação ao microscópio, nomeou-os de *Staphylococcus*, derivado do grego “staphyle” que significa cacho de uvas, cocos, grão ou baga (Adams & Moss, 2008). Já em 1884, o médico alemão Friedrich Julius Rosenbach, distinguiu as bactérias de acordo com o seu fenótipo, chamando às colónias amarelas de *S. aureus* (do latim “aurum” que significa ouro) e às colónias brancas de *S. albus* (que significa branco), que foram posteriormente denominadas de *S. epidermidis*, devido à sua presença na pele humana (Licitra, 2013).

De modo a detetar estes microrganismos e, portanto, proceder à análise microbiológica das águas recorre-se a determinadas normas. No caso da contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva, é utilizada a NP 4343:1998 que é utilizada para águas de piscinas (Instituto Português da Qualidade, 1998). Após os valores obtidos, estes são confrontados com os valores recomendados existentes na legislação (Decreto de Lei Regulamentar nº 5/97), de modo que se conclua se as águas se encontram aptas para o uso pretendido. Estas análises para além de garantir a qualidade e segurança das águas, permitem avaliar a eficácia dos tratamentos efetuados nas mesmas.

1.3. Águas recreativas

Águas recreativas são instalações ou áreas com equipamentos associados em conjunto com lagos, nascentes ou rios que são designados para uso público de banho, recreação e natação (Environmental Health Intelligence New Zealand, 2021). Estas podem dividir-se em águas recreativas tratadas, como as piscinas, spas e piscinas de hidroterapia e águas não tratadas utilizadas para fins recreativos, como rios e lagos (Barrell *et al.*, 2000).

As piscinas podem ser definidas como um conjunto de instalações onde se incluem os tanques artificiais concebidos e apetrechados para atividades natatórias e derivadas, nomeadamente para o banho com fins lúdicos, desportivos, de jogo ou de lazer. Podem classificar-se de acordo com a sua tipologia funcional em: tanques infantis; tanques de diversão; tanques polivalentes e tanques de onda (Ministério do

Equipamento, do Planeamento e da Administração do território, 1997). Podem também definir-se como piscinas públicas (tipo I), como as piscinas municipais, piscinas semi-públicas (tipo II), as existentes em hotéis, *health clubs*, barcos de cruzeiro, etc., e privadas (tipo III), sendo exclusivas de uso familiar (Ministério do Equipamento, do Planeamento, e da Administração do território, 1997; WHO, 2006).

A água de alimentação dos tanques deve ser potável, proveniente de uma rede pública de abastecimento, e caso isso não seja possível, será necessário obter concordância e a correspondente autorização emitida pelos organismos de tutela da saúde pública e da gestão de recursos hídricos nacionais (Ministério do Equipamento, do Planeamento e da Administração do território, 1997).

1.3.1. Benefícios e riscos associados à sua utilização

Nas últimas décadas a procura por atividades aquáticas tem vindo a aumentar por todo o mundo. Piscinas e outras instalações recreativas com água são cada vez mais frequentadas, não só para a prática de desporto, mas também para o relaxamento, diversão, socialização e devido principalmente aos benefícios para a saúde e bem-estar dos seus utilizadores. A natação é considerada uma importante terapia de reabilitação, e é uma excelente forma de praticar exercício (Giampaoli & Spica, 2014; Pasquarella *et al.*, 2013, 2014). A sua prática tem sido recomendada a crianças, principalmente a crianças asmáticas, devido ao seu efeito na melhoria da aptidão aeróbia, nos sintomas da asma e na função respiratória (Lakind *et al.*, 2010). Para além disso, pode ajudar pessoas com doenças crónicas como a artrite e osteoartrite, melhorando o uso das articulações e resultando numa diminuição das dores. A natação é também uma ótima maneira de ajudar na saúde mental das pessoas, tendo também o benefício de melhorar a qualidade de vida dos idosos, auxiliando na diminuição de incapacidade (Centers for Disease Control and Prevention, 2016).

No entanto, apesar de todos os benefícios associados à prática desta atividade desportiva, a utilização das suas instalações pode estar associada a diversos perigos para a saúde. Estes podem ser perigos físicos, químicos e/ou biológicos.

1.3.1.1. Perigos físicos

Em relação aos perigos físicos, existe o risco de afogamento ou quase afogamento, devido, por exemplo, ao facto de não saberem nadar, ao uso de substâncias alcoólicas (no caso de adultos) e à falta de uma maior vigilância (no caso de crianças). Existe também a possibilidade de ocorrerem acidentes, como quedas, devido ao piso escorregadio e saltos perigosos para a água, que podem resultar em lesões mais leves, como cortes ou pequenas escoriações. E em casos mais extremos levar a lesões graves na coluna e na cabeça, causando problemas irreversíveis como a paraplegia, quadriplegia e problemas neurológicos respetivamente (WHO, 2006).

1.3.1.2. Perigos químicos

Os perigos químicos encontram-se relacionados com a fonte da água (normalmente proveniente de uma rede de abastecimento público), os desinfetantes utilizados no tratamento da água na piscina, e com os próprios banhistas. Estes últimos libertam determinados compostos para a água (urina, suor, loções corporais) que podem reagir com os produtos já utilizados previamente na desinfecção da água de abastecimento e com os desinfetantes utilizados na própria piscina, existindo a possibilidade de originarem subprodutos de desinfecção. Os trihalometanos são um exemplo de um subproduto, que se encontram associados a diversos problemas de saúde, tais como doenças respiratórias e cancro (El-Salam, 2012; Fadaei & Amiri, 2015; Font-Ribera *et al.*, 2016; WHO, 2006). Os banhistas podem ser expostos a estas substâncias através de três vias de exposição, sendo elas, a ingestão direta da água, o contacto dérmico e a absorção através da pele e, a inalação de solutos voláteis ou de aerossóis (Fadaei & Amiri, 2015; WHO, 2006).

1.3.1.3. Perigos biológicos

Os perigos biológicos associados a piscinas e a ambientes recreativos semelhantes que podem representar um risco de doença ou infeção encontram-se normalmente relacionados com a contaminação fecal e não fecal da água. Os microrganismos responsáveis pela contaminação fecal da água devem-se à libertação accidental de matéria fecal por parte dos banhistas, à utilização de água já contaminada, ou em caso de piscinas descobertas, contaminação animal direta, por

exemplo, por pássaros e roedores. A contaminação não fecal diz respeito à libertação de matéria orgânica não fecal, tal como, saliva, pele, suor e/ou muco por parte dos banhistas (Papadopoulou *et al.*, 2008; WHO, 2006). Estes microrganismos para além de contaminar a água podem também contaminar as superfícies e formar biofilmes (WHO, 2006).

Na tabela seguinte encontram-se apresentados os principais agentes biológicos presentes em piscinas e ambientes semelhantes (spas, piscinas hidroterapia) e a respetiva origem (fecal ou não fecal), segundo a OMS (WHO, 2006).

Tabela 1: Possíveis perigos biológicos presentes em piscinas e ambientes semelhantes

	Bactérias	Protozoários	Vírus	Fungos
Origem	<i>Shigella</i> spp.	<i>Giardia</i>	Adenovirus	
Fecal	<i>Escherichia coli</i>	<i>Cryptosporidium</i>	Hepatite A	-
			Norovirus	
			Enterovirus	
Origem	<i>Legionella</i> spp.			
Não	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Naegleria fowleri</i>	Molluscipoxvirus	<i>Trichophyton</i> spp.
	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>Acanthamoeba</i> spp.	Papillomavirus	<i>Epidermophyton</i>
Fecal	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Plasmodium</i> spp.	Adenoviruses	<i>floccosum</i>
	<i>Leptospira</i> spp.			

Estes agentes biológicos quando presentes nas águas podem causar doenças respiratórias, gastrointestinais ou cutâneo-mucosas, conjuntivites e otites (Al-khatib *et al.*, 2011; Masoud *et al.*, 2016; Oviedo *et al.*, 2021; Rabi *et al.*, 2007).

Os vírus não possuem capacidade para se multiplicar na água, sendo, portanto, a sua presença em águas de piscinas devida à poluição das mesmas. Os vírus com origem fecal são geralmente associados a gastroenterites (Sinclair *et al.*, 2009; WHO, 2006). O Adenovirus é também responsável por conjuntivites e problemas respiratórios (Sinclair *et al.*, 2009). O Molluscipoxvirus é conhecido por produzir inchaços ou lesões nas camadas superiores da pele (*molluscum contagiosum*) e o Papillomavirus por uma infeção que ocorre geralmente na superfície do pé (verruga plantar) (WHO, 2006).

Os fungos (*Epidermophyton floccosum* e várias espécies do género *Trichophyton*) provocam o chamado “pé de atleta” (WHO, 2006). Já os protozoários, nomeadamente, a *Giardia* e o *Cryptosporidium* aparecem em forma de cistos ou oocistos altamente resistentes, sendo responsáveis por doenças gastrointestinais (Gracenea *et al.*, 2018).

Em relação às bactérias, as de origem fecal, como, *Shigella* spp., e *E. coli*, estão na origem de doenças gastrointestinais. As de origem não fecal resultam em problemas tais como: infecções nos ouvidos, pele e feridas (*S. aureus*); Doença dos legionários (*Legionella* spp.); Foliculite e otites (*P. aeruginosa*); entre outras (WHO, 2006).

1.3.2. Microrganismos indicadores da qualidade da água

Numa análise de rotina não é exequível testar a água para todos os perigos biológicos que nela possam estar presentes, sendo por isso importante recorrer a microrganismos indicadores (WHO, 2000). Estes microrganismos devem possuir como características: 1) serem detetados por um método simples, rápido e barato; 2) estarem presentes em maior número que os microrganismos patogénicos; 3) serem fáceis de isolar, identificar e enumerar; 4) estarem presentes em ambientes onde a existência de microrganismos patogénicos é preocupante e ausentes em ambientes não poluídos; 5) devem responder às condições ambientais naturais e aos processos de tratamento da água de forma semelhante aos patogénicos de interesse (WHO, 2000, 2006).

A escolha do melhor indicador para avaliar a segurança e qualidade de águas de piscinas é algo ainda muito debatido (El-Salam, 2012). Normalmente recorre-se a microrganismos que demonstrem a ocorrência de contaminação fecal onde se incluem o grupo de coliformes termotolerantes, ou também chamados de coliformes fecais devido à sua capacidade de fermentar a lactose a 44 °C, e o grupo dos *Enterococcus* (Odonkor & Ampofo, 2013). Para além disso, alguns autores consideram vantajoso utilizar como indicadores da qualidade das águas, microrganismos de origem não fecal como os *Staphylococcus aureus* por estes serem cerca de 5 a 20 vezes mais resistentes ao tratamento com cloro e a outros desinfetantes de halogénio que os coliformes (Masoud *et al.*, 2016). Esta resistência implica que, a ausência de microrganismos indicadores de origem fecal na água, não significa diretamente que esta se encontre livre de microrganismos patogénicos.

Portanto, como não existe um consenso, e sendo que um único microrganismo indicador não seria eficaz, recorre-se a um conjunto de microrganismos, desde os microrganismos cultiváveis a 37 °C, às bactérias de origem fecal (Coliformes totais, Coliformes fecais, *Enterococcus*) e a microrganismos patogénicos tais como

Pseudomonas aeruginosa, *Legionella* spp. e *Staphylococcus* spp. (El-Salam, 2012; Ibarluzea *et al.*, 1998; WHO, 2006).

1.3.2.1. Microrganismos cultiváveis a 37 °C

São microrganismos mesófilos aeróbios que fornecem indicação sobre a população microbiana geral dentro da piscina, englobando bactérias, leveduras e bolores (Bartram *et al.*, 2004; WHO, 2006). Inclui diversos microrganismos desde, bactérias sensíveis aos processos de desinfecção (coliformes) a organismos resistentes como os formadores de esporos (WHO, 2017). Permitem avaliar a eficiência dos sistemas de tratamento de água (coagulação, filtração e desinfecção) e a qualidade higiénica da mesma (Bristow *et al.*, 2004; ISO 6222, 1999).

1.3.2.2. Coliformes totais

São bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos e oxidase negativas, que englobam tanto bactérias aeróbias como anaeróbias facultativas. Expressam β -D-galactosidase, fermentam lactose a 37 °C, produzindo ácido, e crescem na presença de sais biliares (Cabral, 2010; ISO 9308, 2016; WHO, 2017). Dentro dos coliformes totais encontram-se os géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* (Cabral, 2010). Não são a melhor opção como indicadores de contaminação fecal visto nem todas as bactérias pertencentes ao grupo terem origem fecal, podendo ser encontradas em ambientes naturais como o solo e a água doce (Cabral, 2010; Park *et al.*, 2006; Ramteke *et al.*, 1992; Saxena *et al.*, 2015). A presença destas bactérias pode indicar a existência de uma falha a nível de tratamento ou distribuição da água, dando uma indicação geral das condições sanitárias (ISO 9308, 2016).

1.3.2.3. Coliformes fecais/ *Escherichia coli*

Os coliformes fecais incluindo a *E. coli* são um subgrupo das bactérias coliformes, anaeróbias facultativas, que conseguem fermentar lactose a 44° C, sendo por isso conhecidas como bactérias termotolerantes (Odonkor & Ampofo, 2013; Saxena *et al.*, 2015). Expressam a β -D-glucuronidase e são capazes de produzir indol através de

triptofano (Cabral, 2010; ISO 9308, 2016). A *E. coli* é considerada um indicador mais específico de contaminação fecal considerando que esta normalmente só é encontrada no trato intestinal dos seres humanos e de animais de sangue quente e não se multiplica no meio ambiente. A sua presença na água revela a existência de uma contaminação fecal recente (Cabral, 2010; Odonkor & Ampofo, 2013; Saxena *et al.*, 2015).

No geral, a maioria das estirpes de *E. coli* são inofensivas para o ser humano, no entanto, algumas estão associadas a diarreias e outras infeções do trato urinário e respiratório, tendo sido já relatados surtos em piscinas associados à *E. coli* O157:H7 (Centers for Disease Control and Prevention, 2014; WHO, 2006).

1.3.2.4. *Enterococcus* spp.

Os *Enterococcus* são bactérias de forma esférica, Gram-positivas e catalase negativas. Possuem uma capacidade de crescer a temperaturas entre os 10 e 45 °C, conseguindo desenvolver-se em ambientes com uma percentagem de 6,5% de sal e um pH elevado (9,6) (Devane *et al.*, 2020). São considerados bons indicadores de contaminação fecal devido à sua resistência a ambientes adversos (sobrevivendo durante períodos superiores aos coliformes), e ao facto de serem habitantes naturais da microbiota intestinal de humanos e animais (Devane *et al.*, 2020; ISO 7899, 2000; Monticelli *et al.*, 2019). Existem cerca de 37 espécies de *Enterococcus* sendo *E. faecalis* responsável por aproximadamente 85 a 95% das infeções (Brooks *et al.*, 2013b). Os *Enterococcus* podem provocar sintomas como dores de cabeça e vómitos, sendo também responsáveis por causarem infeções nosocomiais, endocardites e infeções do trato urinário de difícil tratamento devido à sua resistência aos antibióticos mais comuns (Cho *et al.*, 2020; Monticelli *et al.*, 2019).

1.3.2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

As pseudomonas são bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, móveis e em forma de bacilos, com dimensões entre os 0,5-1 µm por 1,5 - 4 µm (Anversa *et al.*, 2019; WHO, 2006, 2017). Possuem uma camada densa de lipopolissacarídeos que atua como uma barreira físico-química contribuindo para a patogenicidade da bactéria e protegendo-a contra determinados desinfetantes e

antibióticos, inibindo os sistemas de defesa do hospedeiro e influenciando a criação de biofilmes (Huszczyński *et al.*, 2020). São amplamente distribuídas (solo, água e vegetação) e conseguem proliferar em águas com baixa concentração de nutrientes, metabolizando uma grande variedade de compostos. Possuem uma notável capacidade de resistência e de adaptação (Anversa *et al.*, 2019; Hardalo & Edberg, 1997). *P. aeruginosa* é considerada patogénica para o Homem e pode formar biofilmes em filtros e em áreas com limpeza insuficiente. São responsáveis por causar diversas infeções tais como, foliculites, conjuntivites e otites, podendo também afetar o sistema urinário e respiratório, principalmente em pessoas com o sistema imunitário comprometido (Anversa *et al.*, 2019; Guida *et al.*, 2009).

1.3.2.6. *Legionella* spp.

São bacilos Gram-negativos que medem entre 0,3 a 0,9 µm de largura e 2 a 3 µm de comprimento, são móveis, aeróbios obrigatórios e não formadores de esporos. São microrganismos heterotróficos e podem ser encontrados tanto em sistemas de água natural como artificial, sendo capazes de se reproduzir numa gama de temperaturas entre 25 e 43 °C, sobrevivendo até 55-60 °C (E. Leoni *et al.*, 2001; WHO, 2006). A *Legionella* apresenta um elevado nível de resistência a condições adversas e é responsável pela Legionelose, infeção provocada por *Legionella pneumophila*, que se pode manifestar de duas maneiras distintas. Demonstrando-se em casos mais graves como a Doença dos Legionários, semelhante a uma pneumonia e em casos mais leves, como a Febre de Pontiac (Centers for Disease Control and Prevention, 2021; Fields *et al.*, 2002). A Legionelose é provocada pela inalação de vapores/aerossóis contaminados, sendo por isso, estes microrganismos maioritariamente pesquisados em spas naturais, especialmente de água termal e jacuzzis, devido à sua maior presença nessas instalações (Fields *et al.*, 2002; Erica Leoni *et al.*, 2018; WHO, 2006).

1.3.2.7. *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva

O género *Staphylococcus* é composto atualmente por cerca de 40 espécies (Brooks *et al.*, 2013a). Os *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas com cerca de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não formadores de esporos, que possuem uma parede celular espessa constituída por peptidoglicano e ácido teicóico. Podem ocorrer

de forma isolada, em pares, tétradas, ou com o formato de um cacho de uvas (Adams & Moss, 2008; Brooks *et al.*, 2013a; Seo & Bohach, 2013). Estes são catalase positiva (o que permite distingui-los dos *Streptococcus*) e fermentam carboidratos produzindo ácido láctico (Brooks *et al.*, 2013a). São oxidase negativa e crescem tanto em aerobiose como anaerobiose, sendo anaeróbios facultativos. A sua capacidade de fermentar glicose permite diferenciar o género *Staphylococcus* do género *Micrococcus* (Adams & Moss, 2008; Brooks *et al.*, 2013a; Seo & Bohach, 2013). Os *Staphylococcus* são bastante resistentes à desidratação e suportam um elevado teor de salinidade (Brooks *et al.*, 2013a).

Os *Staphylococcus* estão presentes na flora da pele humana, que é dividida em duas partes, a transitória e a residente. Dentro da parte transitória podemos encontrar microrganismos como a *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Já na flora residente, estão presentes bactérias como *S. epidermidis* que representa 90% da flora residente da camada córnea (camada mais exterior da epiderme) e outras como *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* e *S. saprophyticus* (Lagière *et al.*, 2020). Dentro dos *Staphylococcus*, os mais importantes a nível clínico em humanos são o *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (Brooks *et al.*, 2013a; WHO, 2006; Zhou *et al.*, 2021).

Alguns *Staphylococcus* possuem a capacidade de coagular o plasma de certos animais, o que leva à sua distinção dos restantes, dividindo-se o género em *Staphylococcus coagulase* negativa e *Staphylococcus coagulase* positiva. Os *Staphylococcus coagulase* negativa, nomeadamente, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* são normalmente associados a infeções hospitalares com a utilização de aparelhos como próteses e cateteres, e a infeções urinárias e endocardites em crianças, idosos e doentes com o sistema imunitário comprometido (Brooks *et al.*, 2013a; Zhou *et al.*, 2021). Dentro dos *Staphylococcus coagulase* positiva encontra-se *S. aureus* (Instituto Português da Qualidade, 1998).

1.3.2.7.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é um microrganismo mesófilo que consegue crescer num intervalo de temperaturas entre os 7 e os 48 °C, tendo uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37 °C. Relativamente ao pH, este microrganismo pode desenvolver-se numa gama de valores de pH de 4,5 e 9,5, apresentando um crescimento máximo

entre valores 6,0 e 7,0. Possui também a capacidade para crescer em ambientes com uma elevada concentração de NaCl, entre os 5 e os 7%, sendo que algumas estirpes conseguem crescer com concentrações até 20%. *S. aureus* desenvolve-se tanto em condições de anaerobiose como de aerobiose (Adams & Moss, 2008; ASAE, 2021). Em condições específicas, produz uma enterotoxina responsável por intoxicações alimentares que apenas se desenvolve em situações de aerobiose. Estima-se que cerca de 40% dos indivíduos saudáveis sejam portadores assintomáticos da bactéria na nasofaringe (ASAE, 2021). Para além destas características, *S. aureus* são coagulase positiva, o que os permite distinguir de outras bactérias como *S. epidermidis* (Instituto Português da Qualidade, 1998). *S. aureus* é responsável por infeções de pele, ouvidos e olhos e infeções urinárias (Masoud *et al.*, 2016; WHO, 2006). Este microrganismo é conhecido pela sua resistência a condições adversas como, temperatura e pH extremos, ao tratamento com desinfetantes e antibióticos, tendo sido já detetados casos de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) em águas de piscinas (Tolba *et al.*, 2008).

1.4. Tratamento da água

Os microrganismos referidos previamente podem ser responsáveis pela transmissão de diversas doenças, o que torna necessário a tomada de medidas de modo a minimizar esse risco. Existem vários fatores que facilitam o desenvolvimento dos microrganismos nas águas, tais como: o número elevado de banhistas presentes; a desinfecção insuficiente da água; temperaturas elevadas; a deficiência na renovação do ar e da água e a utilização de determinados materiais de construção (Al-khatib *et al.*, 2011; Fadaei & Amiri, 2015; Rabi *et al.*, 2007).

De modo a prevenir a ocorrência de determinados perigos, quer sejam estes físicos, químicos ou biológicos, medidas como uma construção e manutenção adequada da piscina, uma devida educação/consciencialização dos seus utilizadores e uma correta gestão por parte dos proprietários podem ser passos essenciais para uma ótima prática desportiva com um menor risco para a saúde (Fadaei & Amiri, 2015).

Uma das formas de minorizar estes riscos passa pelos próprios banhistas, com a toma de um duche antes da entrada na piscina. Esta prática vai remover traços de

suor, matéria fecal, urina, cosméticos e outros potenciais contaminantes da água (Fadaei & Amiri, 2015; WHO, 2006).

Para além do duche, a própria piscina precisa de sofrer constantemente um controlo diário, sendo necessário recorrer à floculação, filtração e desinfecção da água de modo a mantê-la dentro dos parâmetros microbiológicos adequados à sua utilização (Masoud *et al.*, 2016).

A floculação é um processo em que se usam coagulantes de forma a ocorrer a agregação das partículas mais pequenas em suspensão, em flocos bem definidos, sendo posteriormente removidos, através do processo de filtração (Brito *et al.*, 2014).

A filtração consiste, portanto, na eliminação de partículas que estejam em suspensão na água e que comprometem a transparência da mesma e podem dificultar a ação dos desinfetantes sobre os microrganismos (WHO, 2006). Esta tem como objetivo, remover os flocos e sólidos suspensos que resultam do processo de coagulação-floculação (Brito *et al.*, 2014). O método mais utilizado é a filtração em leito granular que consiste no uso de um leito com várias camadas de areia e antracite. Os meios filtrantes atuam de forma mecânica, de forma a que as partículas maiores que os poros do filtro fiquem retidas (Brito *et al.*, 2014).

Outra etapa essencial é a desinfecção que consta num tratamento que pode ser químico ou físico e que tem como objetivo a inativação dos microrganismos patogénicos existentes na água, reduzindo assim o risco para a saúde pública (Brito *et al.*, 2014; Direção Geral de Saúde, 2009). Antes da escolha de um desinfetante é necessário ter em atenção determinados aspetos, tais como: 1) compatibilidade com a água (ter em atenção o pH da água); 2) tipo e tamanho da piscina; 3) capacidade para ficar na água em concentração residual após aplicação; 4) número de banhistas na piscina; 5) segurança (os desinfetantes devem ser tóxicos para os microrganismos mas não para os operadores e banhistas) (Brito *et al.*, 2014; WHO, 2006). Entre os agentes físicos mais utilizados encontra-se a radiação UV e como agentes químicos recorre-se normalmente aos halogéneos (cloro, bromo, iodo), sendo o cloro, o mais utilizado (Brito *et al.*, 2014).

É recomendado também a existência de um desinfetante residual na água, de modo a controlar os microrganismos que são inseridos na mesma pela constante entrada de banhistas (Direção Geral de Saúde, 2009; WHO, 2006). Para além destes procedimentos, a adição de água em intervalos regulares, a limpeza da piscina (ex.

remoção de biofilmes) e a ventilação das instalações internas ajudam na prevenção de doenças infecciosas (WHO, 2006).

1.5. Legislação

Apesar dos diversos perigos associados às piscinas, em Portugal não existe uma legislação específica que regule a qualidade da água de piscinas públicas. Apenas as piscinas que pertencem a recintos com diversões aquáticas e a empreendimentos turísticos, incluindo piscinas de uso terapêutico se encontram dentro da legislação (Ministério do Equipamento, do Planeamento e da Administração do território, 1997; Neves *et al.*, 2016).

Em 1993, o Conselho Nacional da Qualidade aprovou a Diretiva nº 23/93 sobre a qualidade da água das piscinas de uso público. Esta diretiva teve como objetivo a elaboração de algumas disposições de segurança, hígio-sanitárias, técnicas e funcionais das piscinas e dos estabelecimentos dedicados a atividades recreativas aquáticas. No entanto, a utilização deste documento é algo de adesão voluntária, podendo apenas ser usado como referência, visto o mesmo não ter caráter legal. Esta diretiva serviu como base para o Decreto de Lei Regulamentar nº 5/97 que veio estruturar as condições técnicas e de segurança dos recintos com diversões aquáticas (Conselho Nacional da Qualidade, 1993; Ministério do Equipamento, do Planeamento e da Administração do território, 1997).

Já em 2009, a Direção Geral de Saúde (DGS) publicou a Circular Normativa nº 14/DA, onde estabelece o programa de vigilância sanitária de piscinas. Este documento tem como principais objetivos, a uniformização dos procedimentos relativos à vigilância sanitária das piscinas e a identificação dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos a analisar, os seus valores de referência e as técnicas de amostragem no âmbito de ações de monitorização. Esta Circular Normativa abrange piscinas públicas, semi-públicas, de hidroterapia e com fins terapêuticos (Direção Geral de Saúde, 2009).

Na tabela 2, apresentam-se os parâmetros microbiológicos a pesquisar em águas de piscinas, que se encontram descritos nos documentos referidos anteriormente.

Tabela 2: Parâmetros microbiológicos a analisar em águas de piscinas (adaptado de Direção Geral de Saúde, 2009; Ministério do Equipamento, do Planeamento e da Administração do território, 1997)

Parâmetros microbiológicos	Valores de referência		Expressão dos resultados	Métodos analíticos	Periodicidade das análises
	VR	VL			
Microrganismos cultiváveis a 37 °C (24h)	≤ 100*	-	UFC/ 1 ml	ISO 6222	Mensal
Coliformes totais	0	10	UFC/ 100 ml	ISO 9308-1 modificada	Mensal
<i>Escherichia coli</i>	-	0	UFC/ 100 ml	ISO 9308-1 modificada	Mensal
<i>Enterococcus</i> spp.	-	0	UFC/ 100 ml	ISO 7899-2	Mensal
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	0	UFC/ 100 ml	ISO 16266	Mensal
<i>Staphylococcus</i> produtores de coagulase	-	0**	UFC/ 100 ml	NP4343	Mensal
Nº total de <i>Staphylococcus</i>	≤ 20*	-	UFC/ 100 ml	NP4343	Mensal
<i>Legionella</i> ***	-#		Nº/ 1000 ml	ISO 11731:1998	Trimestral

VR - Valor recomendado; **VL** – Valor limite

* O valor recomendado poderá ser ultrapassado uma vez por época de abertura ao público.

** 0/100 ml em 90% das amostras.

*** Em tanques de hidromassagem.

Em caso de *Legionella* spp, recomenda-se um valor ≤ 10²; A *Legionella pneumophila* não deve ser identificada na água.

Em suma, a carga microbiana total expressa em bactérias cultiváveis a 37 °C deve ser inferior a 100 UFCs em 1 ml. O número de coliformes totais existentes na água deve ser inferior a 10 UFCs por cada 100 ml, com ausência de coliformes fecais (*E. coli*) e *Enterococcus*. Por fim, não devem existir vestígios de microrganismos patogénicos em 100 ml, como as pseudomonas, e os *Staphylococcus* coagulase positiva em 100 ml e em 90% das amostras. Estas análises devem ser realizadas mensalmente.

No caso da *Legionella* spp., a sua pesquisa deve ser efetuada trimestralmente, recomendando-se um valor inferior a 100 UFCs por cada 1000 ml, com ausência de *Legionella pneumophila*.

A água é considerada própria para o uso a que se destina, quando nenhum dos parâmetros microbiológicos analisados ultrapassar os valores limites referidos na tabela 2. Caso algum parâmetro esteja acima do imposto, as Autoridades de Saúde têm que tomar medidas, entre as quais: 1) Encerrar o tanque; 2) Mandar executar um

tratamento da água através da adição direta de desinfetante de modo a atingir uma concentração de 20 mg/L de Cl_2 em 8 horas (ou 40 mg/L em 4 horas); 3) Efetuar o mais rapidamente possível uma nova colheita para a realização de nova análise; 4) Caso a nova análise volte a confirmar uma má qualidade da água, a Autoridade de Saúde manterá o encerramento das atividades aquáticas até a água se encontrar em condições potáveis. Complementarmente deve-se verificar os valores de pH, temperatura da água e o valor residual de desinfetante no momento da sua colheita, e consultar o livro de registo sanitário, os registos relativos ao funcionamento e de qualidade da água, assim como avaliar os processos relativos à filtração e desinfecção (Direção Geral de Saúde, 2009).

1.6. Validação de métodos

Cada vez mais existe uma maior preocupação em relação a doenças transmitidas pelo consumo de alimentos ou água contaminados por microrganismos que possam acarretar riscos para a saúde humana. Torna-se, por isso, essencial, a sua análise microbiológica que é normalmente realizada em laboratórios acreditados para tal. O laboratório necessita, portanto, de possuir meios e critérios objetivos que demonstrem através de uma validação que os métodos internos de ensaio que realizam conduzem a resultados adequados e credíveis à qualidade desejada. É necessário efetuar uma descrição e caracterização do método interno de ensaio quando o objetivo for validá-lo. Esta descrição deve ser feita em documentos e de forma pormenorizada, de maneira, a que qualquer pessoa com preparação apropriada o possa executar (Relacre, 2000). A validação de métodos deve refletir as situações reais dos ensaios, utilizando-se amostras naturais e/ou amostras contaminadas artificialmente com um nível de contaminação pré-definido (Relacre, 2007).

Neste trabalho foi efetuada uma validação secundária do método, que consiste na demonstração do cumprimento das especificações e da adequação ao uso de um método normalizado (Silliker Portugal S.A., 2020). Neste caso, efetuou-se uma validação secundária do método analítico para a contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva em águas de piscina, de acordo com a Norma Portuguesa 4343:1998: Qualidade da água – Pesquisa e quantificação de estafilococos.

O protocolo da validação de um método inclui a descrição de diversos parâmetros, entre os quais (Silliker Portugal S.A., 2020):

- i) O resumo da metodologia aplicada;
- ii) Identificação das matrizes analisadas;
- iii) Carta de produtividade do meio de cultura utilizado: Construída através do recurso a lentículas de material de referência, com limites estabelecidos de acordo com a norma internacional ISO 11133 - *Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage, and performance testing of culture media*.
- iv) Critério de precisão: Obtido após a construção de uma Carta de Duplicados – Amplitudes, sendo recalculado anualmente;
- v) Incerteza: Calculada através dos resultados obtidos em paralelo e com recurso ao impresso IQ.295: Cálculo da incerteza da medição – Microbiologia – Águas e Ar ambiente;
- vi) Exatidão: Demonstrada com base nos resultados dos ensaios de comparação interlaboratorial;
- vii) Características de desempenho: Sensibilidade, Especificidade, Taxa de Falsos positivos, Taxa de Falsos negativos, Seletividade, Eficiência;
- viii) Qualificação do pessoal técnico;
- ix) Documentos utilizados durante o procedimento do método.

Primeiramente, para construir a carta de produtividade do meio, recorre-se a um meio não seletivo de referência, TSA (*Tryptic Soy Agar*) e compara-se a recuperação do microrganismo nesse meio com a sua recuperação no novo lote do meio seletivo, MSA (*Mannitol Salt Agar*). A produtividade é calculada de acordo com a equação (1), onde “N_s” representa o número total de colónias obtido no meio de cultura que está a ser testado e “N_o”, o número total de colónias obtido no meio de referência.

$$Produtividade = \frac{N_s}{N_o} (1)$$

De seguida, para a validação deste método é necessário a realização de no mínimo 30 amostras, sendo que, destas amostras, o laboratório precisa de cerca de 15 ensaios positivos, efetuados em duplicado (mesmo analista) para a realização da carta de duplicados – amplitudes, que irá permitir o cálculo do critério de precisão do método, cujos resultados são registados no impresso IQ. 178 Carta de duplicados

(Silliker Portugal S.A., 2020). De modo a calcular a incerteza do método, é necessário no mínimo 30 ensaios positivos realizados em paralelo entre pessoal técnico diferente. É também efetuado a análise de 2 brancos (Silliker Portugal S.A., 2020).

De maneira a determinar o critério de precisão, é necessário primeiramente converter os resultados obtidos em duplicado (D1 e D2) em logarítmico. Após esta transformação, calcula-se a média das amplitudes ($\bar{R}$) que é obtida através da equação 2, onde R_{log} corresponde ao módulo da amplitude de cada par de duplicados (equação 3) e “n” ao número total de ensaios. Por fim, recorre-se à equação 4 para a determinação do critério de precisão.

$$\bar{R} = \frac{\sum R_{Log}}{n} \quad (2)$$

$$R_{Log} = |Log_{D1} - Log_{D2}| \quad (3)$$

$$Critério\ de\ Precisão = 3.27 \times \bar{R} \quad (4)$$

Para calcular a incerteza, começa-se por determinar a variância da reprodutividade ($u_{R'}^2$) e a variabilidade intrínseca (incerteza relativa da distribuição), u_{di}^2 , através da equação 5 e 6, respetivamente. Onde “Xa” e “Xb” representam os resultados obtidos na análise em paralelo por analistas diferentes (ISO 29101, 2012).

$$u_{R'}^2 = \frac{(\log_{10} Xa - \log_{10} Xb)^2}{2} \quad (5)$$

$$u_{di}^2 = \frac{2 \times 0,1886}{Xa + Xb} \quad (6)$$

Com os valores obtidos nestas equações, obtém-se a incerteza operacional, calculada através da equação 7.

$$u_o^2 = u_{R'}^2 - u_{di}^2 \quad (7)$$

Por fim, calcula-se a incerteza operacional relativa, multiplicando-se a média da incerteza operacional obtida para os 30 ensaios por 5,302 (constante para a conversão de logaritmo comum a logaritmo natural) e determinando-se a sua raiz quadrada (equação 8). O resultado é posteriormente multiplicado por 100% de modo a ser apresentado em percentagem (ISO 29101, 2012).

$$u_{o,rel} = \sqrt{u_o^2} \quad (8)$$

A exatidão é demonstrada através dos resultados obtidos nos Ensaio de Comparação Interlaboratorial (ECI). Um ECI pode ser definido como “Organização, realização e avaliação de medições ou ensaios do mesmo (ou similares) itens por dois ou mais laboratórios, de acordo com condições pré-definidas”. As amostras analisadas durante os ensaios devem ser executadas do mesmo modo que as amostras de rotina/clientes, sendo os resultados obtidos pelos laboratórios participantes enviados à organização responsável para avaliação. Por fim, cada laboratório recebe um relatório onde consta o seu desempenho no ensaio, normalmente sob a forma de “Z-score”. Este valor é calculado através da equação 9, onde “Xlab” corresponde ao valor obtido pelo laboratório, “Xv” ao valor alvo/esperado e “s” ao desvio padrão do ensaio (Relacre, 1996, 2000).

$$Z - score = \frac{X_{lab} - X_v}{s} \quad (9)$$

1.6.1. Caraterísticas de desempenho

Para calcular as caraterísticas de desempenho (sensibilidade, especificidade, seletividade, eficiência, taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos) recorreu-se à tabela 3.

Tabela 3: Cálculos utilizados para as caraterísticas de desempenho de um método quantitativo (adaptada de Silliker Portugal S.A., 2020)

		Ensaio Presuntivo		
		+	-	
Confirmados/ Verdadeiramente	+	(a) Verdadeiramente positivos	(b) Falsos negativos	a + b
	-	(c) Falsos positivos	(d) Verdadeiramente negativos	c + d
		a + c	b + d	n

1.6.1.1. Sensibilidade

A sensibilidade de um método consiste na sua capacidade em detetar o organismo alvo, ou seja, na fração do total de culturas ou colónias positivas corretamente atribuídos na contagem presuntiva. É calculada através da equação 10, em que, “a” representa o número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros e “b” o número de colónias ou ensaios que não são presuntivos, mas que são verdadeiros. A sensibilidade deve possuir normalmente um valor superior a 90% (ISO 13843 , 2017; Silliker Portugal S.A., 2020).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{(a+b)} * 100 \quad (10)$$

1.6.1.2. Especificidade

A especificidade compreende o número total de colónias negativas definidas corretamente na contagem presuntiva. A sua percentagem deve rondar ou ser superior a 80% e é calculada com o recurso à equação 11, em que “d” corresponde ao número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros, e “c” o número de colónias ou ensaios presuntivos, mas que são falsos (ISO 13843, 2017; Silliker Portugal S.A., 2020).

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{(c+d)} * 100 \quad (11)$$

1.6.1.3. Taxa de falsos positivos

A taxa de falsos positivos refere-se à fração de resultados positivos (colónias típicas) que demonstram ser devido a organismos não alvo. O seu cálculo está apresentado na equação 12, onde “a” e “c” correspondem ao número de colónias ou ensaios presuntivos verdadeiros e ao número de colónias ou ensaios presuntivos, mas que são falsos, respetivamente (ISO 13843 , 2017; Silliker Portugal S.A., 2020).

$$\text{Taxa de Falsos positivos} = \frac{c}{(a+c)} * 100 \quad (12)$$

1.6.1.4. Taxa de falsos negativos

A taxa de falsos negativos refere-se à fração de resultados negativos (colónias atípicas) que acabam por se confirmar serem colónias alvo. Determina-se através da equação 13, em que “b” representa o número de colónias ou ensaios não considerados presuntivos, mas que são verdadeiros e “d” o número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros (ISO 13843, 2017; Silliker Portugal S.A., 2020).

$$\text{Taxa de Falsos negativos} = \frac{b}{(b+d)} * 100 \quad (13)$$

1.6.1.5. Seletividade

A seletividade consiste no rácio do número de colónias/ensaios alvo com o número total de colónias, ou seja, na divisão entre o número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros (a) com o número total de colónias ou ensaios (n), equação 14. Os resultados não são válidos caso a mesma tenha um valor inferior a 10% (ISO 13843 , 2017; Silliker Portugal S.A., 2020).

$$\text{Seletividade} = \frac{a}{n} * 100 \quad (14)$$

1.6.1.6. Eficiência

A eficiência refere-se à fração de colónias/ensaios totais corretamente atribuídas na contagem presuntiva. Consiste na soma do número de colónias ou ensaios presuntivos que são verdadeiros (a) com o número de colónias ou ensaios não presuntivos verdadeiros (d) sobre o número total de colónias ou ensaios (n), equação 15 (ISO 13843 , 2017; Silliker Portugal S.A., 2020)

$$\text{Eficiência} = \frac{(a+d)}{n} * 100 \quad (15)$$

1.7. Auditoria

Após a validação do método, é necessário efetuar avaliações periódicas ao mesmo (auditorias) de modo a verificar se este está em conformidade com os próprios requisitos da organização, com os requisitos presentes na norma NP EN ISO/IEC 17025 e se se encontra eficazmente implementado e mantido (ISO 9001, 2015; ISO 19011, 2018).

A auditoria é “um processo sistemático, independente e documentado para obter evidência objetiva e respetiva avaliação objetiva, com vista a determinar em que medida os critérios da auditoria são cumpridos” (ISO 9000, 2015). Possui como objetivo determinar o grau de conformidade do sistema de gestão face aos requisitos normativos, avaliar a capacidade do sistema de gestão para cumprir a legislação, regulamentação e requisitos contratuais, avaliar a eficiência do sistema de gestão no cumprimento dos objetivos definidos e identificar áreas de melhoria do sistema de gestão. De uma auditoria podem resultar não conformidades, conformidades e oportunidades de melhoria (ISO 19011, 2018).

Existem dois tipos de auditorias: auditoria interna e auditoria externa. Dentro da auditoria externa temos as de segunda e de terceira parte. As auditorias de segunda parte são realizadas por clientes ou por uma organização em seu nome. Já as auditorias de terceira parte são efetuadas por organizações externas e independentes como organismos de certificação/acreditação (ISO 19011, 2018).

A auditoria interna é realizada pela própria empresa. Esta deve ser efetuada em intervalos planeados, no mínimo com periodicidade anual de modo a detetar e corrigir não conformidades assim como fazer uma melhoria contínua do sistema de gestão (IPAC, 2018).

1.8. Objetivos

Este relatório reporta o trabalho realizado entre Outubro de 2020 a Junho de 2021 na *Silliker* Portugal, S.A com a Dra. Andreia Poças como supervisora na empresa e o Professor Doutor Fernando Tavares como orientador na FCUP.

Os objetivos deste estágio incidiram principalmente sobre a validação secundária do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva e auditoria interna ao método. Para tal foi necessário o estudo de documentação (legislação, normas), protocolos e metodologia para a implementação do mesmo. Simultaneamente, este incluiu a integração no trabalho de rotina num laboratório de microbiologia acreditado, nomeadamente em tarefas que vão desde a preparação de meios de cultura, distribuição de meios, até às confirmações e leituras. Para além das águas de piscinas, foram também incluídas na rotina de trabalho, águas de consumo, minerais naturais e de nascente, desde a sua preparação, execução e incubação das placas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia da Silliker Portugal, S.A. Para a validação do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva foram analisadas 33 amostras num total de 110 ensaios. Estes ensaios englobaram a análise de amostras de águas de piscinas naturalmente contaminadas, amostras contaminadas artificialmente e amostras não contaminadas, realizadas em duplicado (mesmo analista) e/ou paralelo (analistas diferentes). E amostras derivadas de ensaios interlaboratoriais, tendo o laboratório participado em 2 ECI.

As amostras contaminadas artificialmente (tabela 4) com lentículas (Sigma-Aldrich, Suíça), foram obtidas através da utilização de DPCS (*Daily Process Control Samples*). Estes consistem num material com características bem definidas de homogeneidade e estabilidade, usado para as verificações de controlo e para a construção das cartas de controlo. Os DPCS contêm o microrganismo alvo a uma concentração conhecida e é analisado seguindo o mesmo método que as amostras do cliente. Estas amostras ajudam a suportar a validade do procedimento e a verificar que os processos do laboratório se encontram dentro de controlo. Demonstra a capacidade do laboratório em encontrar o microrganismo alvo se o mesmo estiver presente (Silliker Portugal S.A., 2020).

Na tabela 4 encontram-se apresentadas as amostras que foram analisadas para a validação secundária do método, o número de ensaios correspondentes, o produto e as respetivas observações. Os ensaios correspondem à análise da mesma amostra “n” vezes, nas mesmas condições de análise. O número de ensaios correspondentes a cada amostra depende da quantidade de água excedente das amostras dos clientes, sendo necessário no mínimo 2 ensaios por cada amostra. No caso das águas contaminadas artificialmente, estas possuem maioritariamente 4 ensaios cada, de acordo com os critérios do laboratório. Estas amostras foram contaminadas com vários microrganismos para além dos *Staphylococcus*, devido ao controlo semanal das águas que é efetuado pelo laboratório.

Tabela 4: Amostras analisadas para a validação do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* produtores de coagulase

Nº de amostra	Nº de ensaios	Produto	Observações
1	1	Interlaboratorial PHE – água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>B. atrophaeus</i>
	2		
2	3	Água de piscina	Branco analisado em duplicado
	4		
3	5	Água de piscina	Analisada em paralelo
	6		
4	7	Água de piscina	Analisada em paralelo
	8		
5	9	Água de piscina	Analisada em paralelo
	10		
6	11	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i>
	12		
	13		
	14		
7	15	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i>
	16		
	17		
	18		
8	19	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	20		
	21		
	22		
9	23	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	24		
	25		
	26		
10	27	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	28		
	29		
	30		
11	31	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	32		
	33		
	34		
12	35	Água de piscina	Analisada em paralelo
	36		
13	37	Água de piscina	Analisada em paralelo
	38		

Tabela 4: Amostras analisadas para a validação do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* produtores de coagulase (continuação)

Nº de amostra	Nº de ensaios	Produto	Observações
14	39	Água de piscina	Analisada em paralelo
	40		
15	41	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	42		
	43	Água de piscina	
	44		
16	45	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	46		
	47		
	48		
17	49	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	50		
	51		
	52		
18	53	Água de piscina	Analisada em paralelo
	54		
19	55	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	56		
	57		
	58		
20	59	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	60		
	61		
	62		
21	63	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	64		
	65		
	66		
22	67	Água de piscina	Analisada em paralelo
	68		
23	69	Água de piscina	Analisada em paralelo
	70		
24	71	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	72		
	73		
	74		
25	75	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	76		

Tabela 4: Amostras analisadas para a validação do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* produtores de coagulase (continuação)

Nº de amostra	Nº de ensaios	Produto	Observações
25	77	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	78		
26	79	Água de piscina	Branco analisado em paralelo
	80		
27	81	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	82		
	83		
	84		
28	85	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	86		
	87		
	88		
29	89	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	90		
	91		
	92		
30	93	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	94		
	95		
	96		
31	97	Água de piscina	Analisada em paralelo
	98		
32	99	Interlaboratorial_ LGC – água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
	100		Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
	101		Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
	102		Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
	103		Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
	104		Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
	105		Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
	106		Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
	107		Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
	108		Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>
33	109	Água de piscina	Analisada em paralelo
	110		

2.2. Contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase positiva*

O método de referência para a contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase positiva* encontra-se descrito na NP 4343:1998 a qual foi seguida na íntegra para a realização desta validação.

As amostras são inicialmente recolhidas em recipientes esterilizados (figura 3, a) e refrigeradas entre 4 °C a 8 °C até serem analisadas. Esta análise deve acontecer preferencialmente antes de decorridas 6h e nunca depois de 24h.

Para a filtração da água é utilizada uma rampa de filtração com os respetivos copos (figura 3, b), onde se coloca a quantidade de água necessária de acordo com o procedimento. Neste caso, considerando serem águas de piscinas, o volume será de cerca de 100 ml. Esta água é então filtrada com o recurso a uma membrana de porosidade de 0,45 µm e 47 mm Ø (Merck KGaA, Alemanha), que é posteriormente colocada numa placa de Petri com o meio de cultura seletivo.

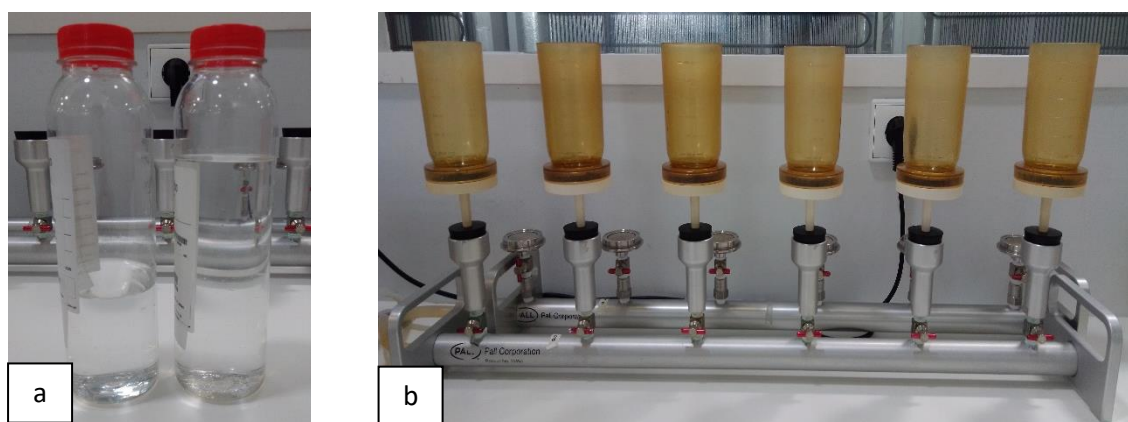


Figura 3: Recipientes utilizados para a recolha de água (a) e rampa de filtração das águas (b)

De modo a detetar a possível existência de colónias de *Staphylococcus*, utiliza-se o meio seletivo *Mannitol Salt Agar* (MSA - Biokar Diagnostics, França), figura 4. Este é constituído por proteose de peptona (10 g), extrato de carne (1 g), cloreto de sódio (75 g) manitol (10 g), vermelho de fenol (0,2 g) e agar (15 g) para 1000 ml de água destilada. Este meio encontra-se já completamente desidratado, sendo apenas necessário pesar a quantidade desejada e adicionar água destilada de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. É posteriormente esterilizado por calor húmido (autoclave) durante 15 minutos a 121 °C (Instituto Português da Qualidade, 1998).

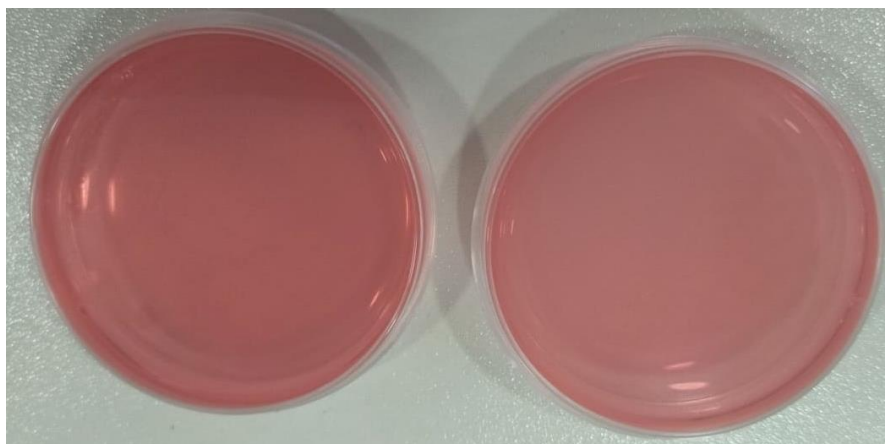


Figura 4: Placas com o meio *Mannitol Salt Agar*

É um meio seletivo e diferencial pois contém uma quantidade de sal considerável, cerca de 75 g/L, que inibe o crescimento de bactérias não halófilas, principalmente Gram-negativas, tornando-se seletivo para bactérias como *Staphylococcus* e *Micrococcus*, Gram-positivas que toleram a concentração de sal existente no meio. Para além disso possui o indicador vermelho de fenol que é utilizado para detetar a formação de ácido produzido pelas bactérias que consigam fermentar o manitol, como o caso de *S. aureus*, resultando na mudança da cor do meio para amarelo e produzindo colónias amarelas (Biokar, 2010).

A placa de MSA com a membrana é então incubada em posição invertida durante $24 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ a $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$. Observam-se e contam-se as colónias suspeitas. Estas consistem em colónias brancas ou amarelas, com ou sem halo amarelo, sendo eliminadas as colónias mucosas (correspondentes a bactérias do género *Bacillus*) (Instituto Português da Qualidade, 1998).

De seguida, efetua-se um isolamento de 3 colónias de cada tipo em meio não seletivo, Nutrient Agar (NA - Oxoid, Inglaterra) incubando-se as placas a $24 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ a $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, procedendo-se posteriormente ao seu estudo morfológico e bioquímico com o objetivo de identificar as colónias inicialmente obtidas.

▪ **Coloração de Gram**

Através da coloração de Gram (bioMérieux, França) é possível analisar a morfologia das células, de modo a inferir a estrutura das suas paredes celulares, esperando-se observar células de coloração azul-violeta, correspondendo assim a bactérias Gram-positivas.

Procedimento (figura 5):

- i) Colocar uma gota de água no centro de uma lâmina de vidro, efetuar o esfregaço de uma amostra de colónia retirada do meio NA e deixar secar ao natural;
- ii) Fixar ao calor, passando a lâmina por uma chama, evitando o seu sobreaquecimento;
- iii) Cobrir o esfregaço com cristal violeta e deixar atuar 1 minuto;
- iv) Retirar o corante com água, adicionar solução de lugol e deixar atuar 1 minuto;
- v) Remover o lugol com água, lavar com o descorante (álcool a 95 %) e voltar a passar por água;
- vi) Cobrir o esfregaço com safranina e deixar atuar 1 minuto;
- vii) Lavar com água, deixar secar e observar ao microscópio com a objetiva de imersão.

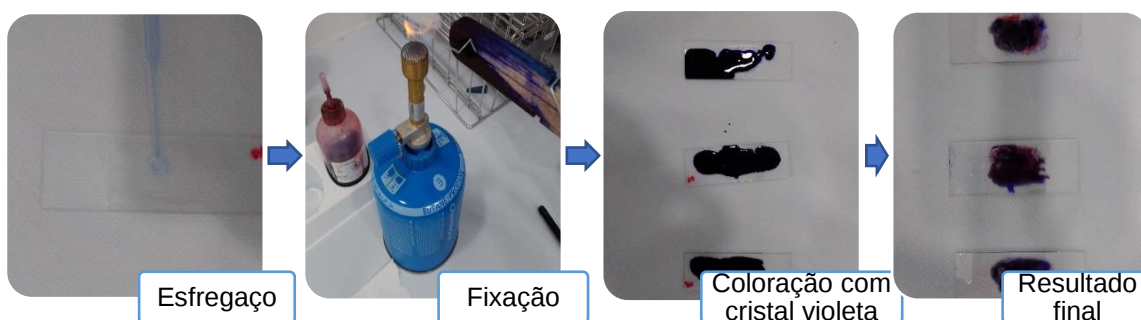


Figura 5: Esquema com alguns passos da Coloração de Gram

As bactérias Gram-positivas devido à sua parede celular espessa vão reter o complexo cristal violeta-lugol, apresentando uma cor final de azul-violeta. Já as bactérias Gram-negativas ficarão com uma cor vermelha devido à safranina utilizada. Esta cor as células após as mesmas ficarem descoradas devido à desintegração da membrana exterior e da parede celular fina e, à consequente remoção do complexo cristal violeta-lugol (Sapra & Tripathi, 2021).

Sendo os *Staphylococcus*, bactérias Gram-positivas, pretende-se, portanto, observar células azul-violeta de formato esférico, aparecendo de forma isolada, em pares, tétradas ou agrupados em cacho.

De maneira a verificar que os testes, produtos e reagentes utilizados estão a funcionar corretamente, é sempre necessário a utilização de um controlo positivo e um

controlo negativo em cada estudo/teste de modo a garantir a veracidade dos resultados finais.

No caso da coloração de Gram, utiliza-se como controlo positivo, *S. aureus* WDCM 00032 (Gram-positiva) e como controlo negativo, por exemplo, a *E. coli* WDCM 00013 (Gram-negativa).

Após o estudo morfológico das colónias e a confirmação de colónias Gram-positivas, efetua-se o seu estudo bioquímico, com o recurso a testes, nomeadamente, a pesquisa de catalase, a determinação do tipo respiratório (metabolismo oxidativo/fermentativo) e a pesquisa de coagulase.

▪ Pesquisa de Catalase

Para a pesquisa da catalase colhe-se uma colónia do meio NA e coloca-se numa lâmina em contacto com uma gota de solução de peróxido de hidrogénio (VWR Chemicals, Estados Unidos). Sendo que os *Staphylococcus* são bactérias catalase positivas, pretende-se observar a formação de bolhas de oxigénio, que consiste na cisão do peróxido de hidrogénio em oxigénio e água. Nesta pesquisa, recorre-se a *E. faecalis* WDCM 00009 como controlo negativo (catalase negativa) e a *S. aureus* WDCM 00032 como controlo positivo (catalase positiva).

▪ Determinação do tipo respiratório

Na determinação do tipo respiratório, utiliza-se o meio MEVAG (Tritium microbiologie B.V., Holanda), no qual a partir de uma colónia isolada do meio NA se realiza uma picada central com movimento oscilatório no final do tubo, retirando-se a ansa na vertical de modo a limitar a entrada de ar no meio. Os tubos de MEVAG são posteriormente colocados a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 4\text{ h}$. O meio MEVAG possui na sua constituição 10 g/L de glicose e 1,5 ml de uma solução de púrpura de bromocresol a 0,2 % que funciona como indicador de pH. Considerando os *Staphylococcus* serem bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, estas irão provocar uma acidificação do meio por todo o tubo devido à utilização da glicose, quer na presença como na ausência de oxigénio. Esta acidificação irá fazer com que o indicador de pH mude da cor violeta para amarelo. A ocorrência de crescimento apenas na parte superior do tubo, indica que ocorreu oxidação da glicose e que, portanto, trata-se de *Micrococcus*, descartando-se assim a hipótese inicial.

Como controlo positivo utiliza-se *S. aureus* WDCM 00032 e como controlo negativo, *E. faecalis* WDCM 00009.

▪ Pesquisa da coagulase

Por fim, de forma a distinguir os *Staphylococcus* produtores de coagulase de *Staphylococcus* coagulase negativa, transferem-se as colónias do meio NA para tubos com meio *Brain Heart Infusion* (BHI – Biokar Diagnostics, França) incubando-se a 37 °C ± 1 durante 5 h ± 1 h. Após este tempo, utiliza-se um tubo estéril onde se mistura 0,5 ml do caldo de BHI com 0,5 ml do teste da coagulase reconstituído (plasma de coelho) (Liofilchem, Itália), indo a incubar a 37 °C ± 1 e observando-se os resultados após 4h. Caso ocorra formação de coágulo em $\frac{3}{4}$ do conteúdo significa que são bactérias coagulase positivas, caso isso não se verifique, volta-se a ler o tubo às 24h de incubação. Na presença de *Staphylococcus* coagulase positiva verifica-se a formação de um coágulo. É necessário ter em atenção que para se proceder à pesquisa de coagulase, as colónias de *Staphylococcus* utilizadas não devem ter mais de 48h de desenvolvimento em meios não seletivos (meio NA).

Nesta pesquisa, usa-se *S. aureus* WDCM 00032 como controlo positivo (coagulase positiva) e *S. epidermidis* WDCM 00132 como controlo negativo (coagulase negativa).

Os resultados obtidos são então expressos em número de colónias de *Staphylococcus* produtores de coagulase e *Staphylococcus* não produtores de coagulase por 100 ml.

3. Resultados e Discussão

A utilização de instalações recreativas para a prática de desporto/lazer apesar de trazer bastantes benefícios pode também, ser responsável pela transmissão de diversas doenças provocadas por microrganismos presentes nas águas frequentadas. Este problema torna a análise microbiológica uma ferramenta essencial para evitar e prevenir estas doenças, permitindo verificar se a água cumpre com os parâmetros microbiológicos impostos, garantindo assim uma maior segurança para os banhistas. Permite também averiguar se os tratamentos da água estão a ser efetuados de forma eficaz.

Nesta parte do trabalho encontram-se apresentados os resultados obtidos ao longo do mesmo, a nível da validação secundária do método de contagem *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva e à sua auditoria interna.

- Carta de produtividade do meio

Relativamente ao meio de cultura *Mannitol Salt Agar* obteve-se a carta de produtividade presente na figura 6. Os limites representados pela cor vermelha foram descritos na norma internacional ISO 11133. Através da análise ao gráfico é possível concluir que o meio MSA cumpre com os limites estabelecidos na norma. Após a construção da carta de produtividade, o ensaio realiza-se a cada novo lote do fornecedor.

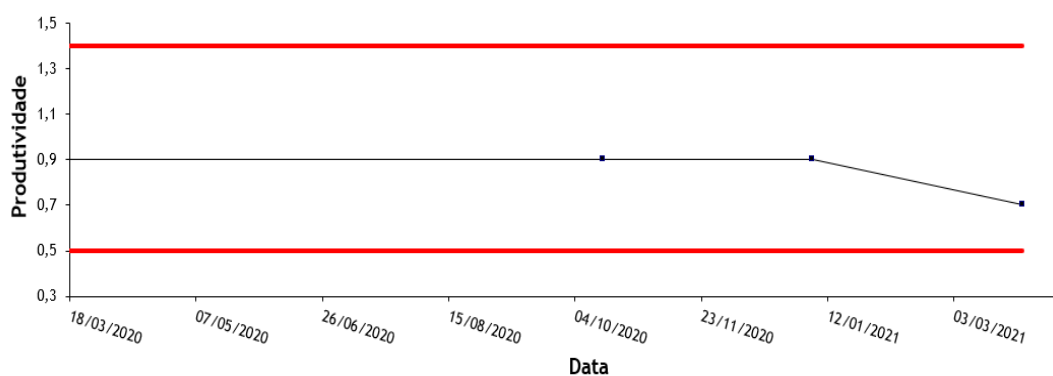


Figura 6: Gráfico de produtividade obtido para o meio MSA

3.1. Contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase positiva*

De modo a calcular os parâmetros anteriormente descritos na metodologia, necessários para a validação secundária do método, foram analisadas 33 amostras provenientes de águas de piscinas. Estas amostras resultaram em 110 resultados (ensaios) que foram obtidos através de amostras contaminadas artificialmente pelo laboratório; naturalmente contaminadas; amostras não contaminadas; realizadas em duplicado e/ou paralelo e amostras derivadas de ensaios interlaboratoriais.

Dos 110 resultados, os 92 ensaios que provieram de amostras contaminadas artificialmente com *S. aureus* e *S. epidermidis* (materiais de referência, ensaios de comparação interlaboratoriais) ou amostras naturalmente contaminadas, o laboratório considerou os mesmos como ensaios presuntivos. Já os 18 ensaios que provinham de amostras não contaminadas, o laboratório considerou como ensaios não presuntivos.

Na tabela seguinte, tabela 5, encontram-se apresentados os resultados obtidos para os 110 ensaios, quer para a contagem de *Staphylococcus* spp. como para a contagem dos *Staphylococcus coagulase positiva*.

Tabela 5: Resultados obtidos para a contagem de *Staphylococcus* spp. (a) e *Staphylococcus coagulase positiva* (b)

Nº de amostra	Nº de ensaios	Produto	Observações	Resultado (a) (UFC/100ml)	Resultado (b) (UFC/100ml)
1	1	Interlaboratorial PHE – água de piscina	Contaminado com <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>B. atrophaeus</i>	19	19
	2			24	24
2	3	Água de piscina	Branco analisado em duplicado	0	0
	4			0	0
3	5	Água de piscina	Analisado em paralelo	0	0
	6			0	0
4	7	Água de piscina	Analisado em paralelo	0	0
	8			0	0
5	9	Água de piscina	Analisado em paralelo	0	0
	10			0	0
6	11	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i>	16	16
	12			21	21

Tabela 5: Resultados obtidos para a contagem de *Staphylococcus* spp. (a) e *Staphylococcus coagulase positiva* (b) (continuação)

Nº de amostra	Nº de ensaios	Produto	Observações	Resultado (a) (UFC/100ml)	Resultado (b) (UFC/100ml)
6	13	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i>	20	20
	14			17	17
7	15	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i>	67	67
	16			59	59
	17			51	51
	18			57	57
8	19	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	42	42
	20			39	39
	21			33	33
	22			35	35
9	23	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	77	77
	24			80	80
	25			83	83
	26			79	79
10	27	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	21	21
	28			30	30
	29			33	33
	30			27	27
11	31	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	85	85
	32			89	89
	33			94	94
	34			83	83
12	35	Água de piscina	Analisada em paralelo	0	0
	36			0	0
13	37	Água de piscina	Analisada em paralelo	0	0
	38			0	0
14	39	Água de piscina	Analisada em paralelo	3	3
	40			3	3

Tabela 5: Resultados obtidos para a contagem de *Staphylococcus* spp. (a) e *Staphylococcus coagulase positiva* (b) (continuação)

Nº de amostra	Nº de ensaios	Produto	Observações	Resultado (a) (UFC/100ml)	Resultado (b) (UFC/100ml)
15	41	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	29	29
	42			15	15
	43			23	23
	44			20	20
16	45	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	54	54
	46			59	59
	47			63	63
	48			51	51
17	49	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	40	40
	50			42	42
	51			49	49
	52			44	44
18	53	Água de piscina	Analisada em paralelo	0	0
	54			0	0
19	55	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E. epidermidis</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	27	16
	56			33	12
	57			41	19
	58			35	15
20	59	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	12	12
	60			19	19
	61			25	25
	62			23	23
21	63	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	71	21
	64			95	30
	65			83	33
	66			90	27
22	67	Água de piscina	Analisada em paralelo	14	10
	68			7	5
23	69	Água de piscina	Analisada em paralelo	0	0
	70			0	0

Tabela 5: Resultados obtidos para a contagem de *Staphylococcus* spp. (a) e *Staphylococcus coagulase* positiva (b) (continuação)

Nº de amostra	Nº de ensaios	Produto	Observações	Resultado (a) (UFC/100ml)	Resultado (b) (UFC/100ml)
24	71	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	77	55
	72			83	47
	73			89	44
	74			91	59
25	75	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	64	64
	76			63	63
	77			56	56
	78			51	51
26	79	Água de piscina	Branco analisado em paralelo	0	0
	80			0	0
27	81	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	36	36
	82			31	31
	83			39	39
	84			43	43
28	85	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	26	19
	86			29	16
	87			19	10
	88			22	12
29	89	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	68	22
	90			66	27
	91			56	27
	92			55	23
30	93	Água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	26	26
	94			30	30
	95			42	42
	96			27	27
31	97	Água de piscina	Analisada em paralelo	63	50
	98			72	61

Tabela 5: Resultados obtidos para a contagem de *Staphylococcus* spp. (a) e *Staphylococcus coagulase* positiva (b) (continuação)

Nº de amostra	Nº de ensaios	Produto	Observações	Resultado (a) (UFC/100ml)	Resultado (b) (UFC/100ml)
32	99	Interlaboratorial_LGC – água de piscina	Contaminada com <i>S. aureus</i> e <i>C. perfringens</i>	81	81
	100			92	92
	101			91	91
	102			79	79
	103			80	80
	104			78	78
	105			76	76
	106			81	81
	107			90	90
	108			89	89
33	109	Água de piscina	Analisada em paralelo	55	51
	110			51	45

De modo a alcançar os resultados apresentados na tabela anterior, foi necessário recorrer a determinados estudos morfológicos e bioquímicos com o objetivo de confirmar as colónias obtidas em placa e distinguir entre *Staphylococcus coagulase* positiva e *Staphylococcus coagulase* negativa.

Na imagem 7, encontra-se apresentado um exemplo proveniente de amostras de águas de piscina contaminadas. Nela é possível observar colónias suspeitas de *Staphylococcus*, isto é, colónias brancas ou amarelas, com ou sem halo amarelo.

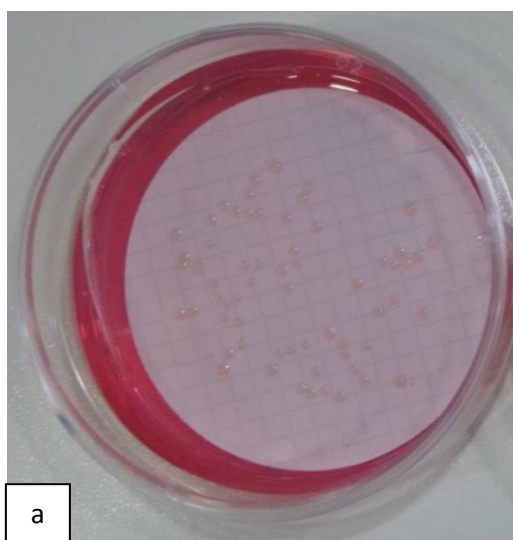


Figura 7: Placas de meio MSA com colónias suspeitas de *Staphylococcus*, nomeadamente, colónias brancas (a) e colónias amarelas onde ocorreu mudança de cor do meio (b)

No exame de microscópio, após coloração de Gram, obtiveram-se as seguintes células (figura 8), sendo como previsto, de coloração azul-violeta, de forma esférica, isoladas, aos pares e no formato de cacho de uvas.

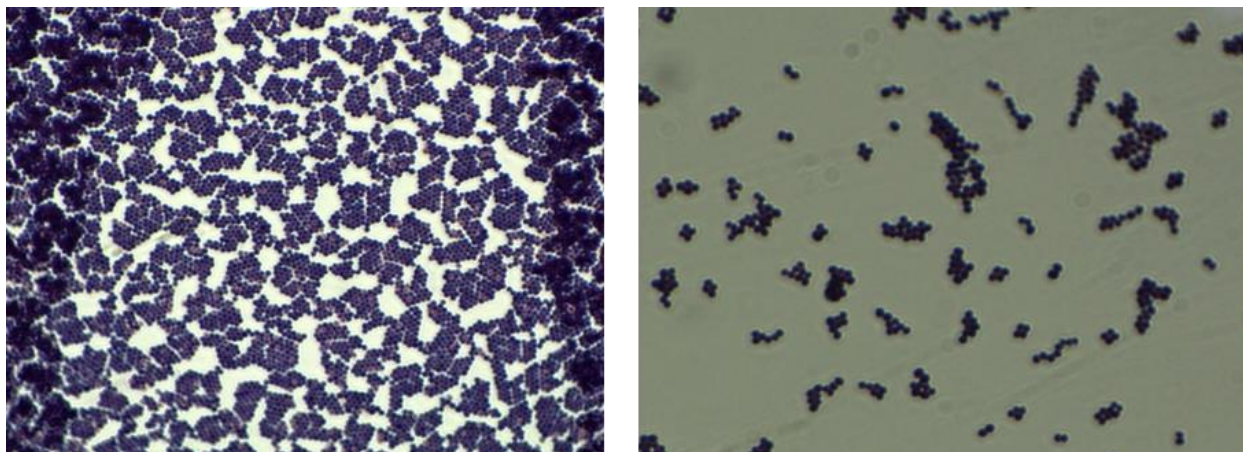


Figura 8: Coloração Gram das amostras suspeitas de *Staphylococcus*, onde se pode observar células azul-violeta, correspondendo assim a bactérias Gram-positivas

Na pesquisa de catalase observou-se a formação de bolhas de oxigénio, confirmando assim a presença de bactérias catalase positivas, o que permitiu seguir o estudo para a pesquisa do tipo respiratório (metabolismo oxidativo/fermentativo) e da coagulase.

No tipo respiratório, verificou-se o crescimento por todo o tubo MEVAG e a mudança de cor roxo para amarelo (figura 9), devido à utilização de glicose por parte dos microrganismos e ao seu crescimento tanto a nível aeróbio como anaeróbio. Estes resultados permitiram concluir que as bactérias inicialmente suspeitas se tratavam realmente de *Staphylococcus*, faltando apenas verificar a presença ou ausência da coagulase.

Por fim, a pesquisa de coagulase possibilitou a distinção entre *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus* produtores de coágulos, nomeadamente, *S. aureus* (figura 10).

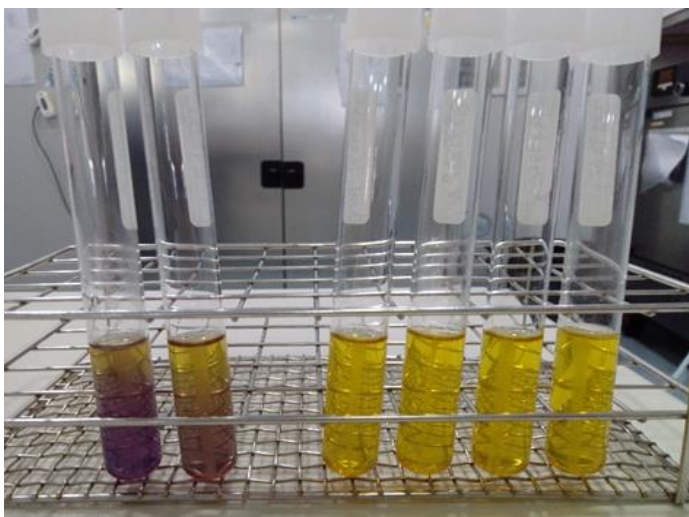


Figura 9: Resultados do tipo respiratório – Com crescimento na presença de oxigénio nos tubos 1 e 2 (crescimento apenas na parte superior do tubo) e crescimento na presença e ausência de oxigénio nos restantes tubos (crescimento por todo o tubo e mudança de cor)

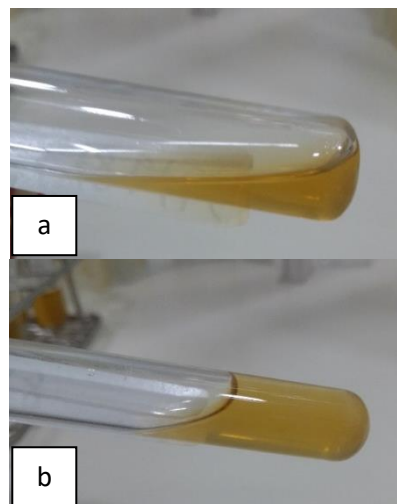


Figura 10: Resultados da pesquisa de coagulase: a - *Staphylococcus* coagulase negativa (não formação de coágulo); b - *Staphylococcus* coagulase positiva (formação de coágulo)

Após efetuados estes estudos para todas as amostras suspeitas, foi então possível chegar aos resultados descritos nas tabelas anteriores (7 a 11). De acordo com estas tabelas, num total de 33 amostras, ocorreu o desenvolvimento de *Staphylococcus* nas 20 amostras contaminadas artificialmente com *S. aureus* e *S. epidermidis* pelo laboratório e em 4 amostras originárias de clientes. Os *Staphylococcus* possuem uma temperatura ótima de crescimento entre os 35 e 37 °C e uma capacidade de crescer em meios com alguma salinidade, o que está de acordo com o efetuado no procedimento, sendo, portanto lógico que tenha ocorrido o seu crescimento nas amostras contaminadas. O desenvolvimento de microrganismos nas amostras não contaminadas pelo laboratório (amostras de clientes), é preocupante, devido ao seu risco para a saúde dos utilizadores, podendo o mesmo dever-se à ineficácia dos tratamentos utilizados na água de piscinas.

Com estes resultados obtidos, foi então possível determinar os parâmetros necessários para a validação do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva que vão ser expostos de seguida.

▪ Critério de precisão

A precisão é um termo geral que tem como objetivo avaliar a dispersão de resultados de ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra ou amostras semelhantes, em condições definidas (Relacre, 2000). Este critério foi obtido através da análise de 15 ensaios positivos, analisados em duplicado, nas mesmas condições (mesmo laboratório, analista e equipamento).

Para a contagem de *Staphylococcus* spp. obteve-se um critério de precisão de 0,199log, já para a contagem de *Staphylococcus* produtores de coagulase positiva obteve-se um valor de 0,239log.

▪ Características de desempenho

Sensibilidade: Para a contagem dos *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* produtores de coagulase, em 110 resultados obtidos, 92 foram considerados como ensaios presuntivos que são verdadeiros (a) e 0 como o número de ensaios não considerados presuntivos, mas verdadeiros (b), obtendo-se um valor de 100% para a sensibilidade (equação 7). Visto que este parâmetro deve ter um valor superior a 90%, este resultado permite concluir que o método possuiu capacidade total para detetar o organismo alvo.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{(a+b)} = \frac{92}{(92+0)} * 100 \quad (7)$$

Especificidade: Dos 110 resultados alcançados, o laboratório considerou 18 como ensaios não presuntivos verdadeiros (d) e 0 como ensaios presuntivos, mas que são falsos (c), dando uma percentagem de 100% para a especificidade do método (equação 8). Sendo que o valor da mesma deve ser superior a 80%, pode-se concluir que o método consegue atribuir a fração total de negativos na contagem presuntiva de forma correta.

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{(d+c)} = \frac{18}{(18+0)} * 100 \quad (8)$$

Taxa de Falso Positivos: Nestes ensaios verificou-se que a taxa de falsos positivos foi nula (equação 9), ou seja, não existiram resultados positivos que demonstrassem

ser devido a organismos não-alvo. O número de ensaios presuntivos, mas que são falsos foi considerado 0 (c), enquanto o número de ensaios presuntivos verdadeiros (a) foi 92.

$$\text{Taxa de falsos positivos} = \frac{c}{(a+c)} = \frac{0}{(92+0)} * 100 \quad (9)$$

Taxa de Falsos Negativos: A fração de resultados negativos que demonstrassem ser colónias alvo foi também nula, onde se considerou um valor de 18 para o número de ensaios não presuntivos verdadeiros (d) e 0 o número de ensaios não considerados presuntivos, mas que são verdadeiros (b), equação 10.

$$\text{Taxa de falsos negativos} = \frac{b}{(b+d)} = \frac{0}{(0+18)} * 100 \quad (10)$$

Seletividade: Para a seletividade considerou-se 110 como o número total de ensaios (n) e 92 como o número de ensaios presuntivos que são verdadeiros, chegando-se a um valor de 84% (equação 11). Este valor é mais que satisfatório considerando que é imposto que a seletividade tenha uma percentagem superior a 10%.

$$\text{Seletividade} = \frac{a}{n} = \frac{92}{110} * 100 \quad (11)$$

Eficiência: Num total de 110 resultados obtidos (n), 92 foram considerados como ensaios presuntivos verdadeiros (a) e 18 como resultados não presuntivos verdadeiros (d), o que levou a uma eficiência de 100% (equação 12), ou seja, todos os ensaios foram atribuídos de forma correta na contagem presuntiva.

$$\text{Eficiência} = \frac{(a+d)}{n} = \frac{(92+18)}{110} * 100 \quad (12)$$

Resumidamente, todas as características analisadas anteriormente encontram-se dentro dos valores descritos na ISO 13843:2017: *Water quality – Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods*, o que permite concluir que a execução do método é eficaz e cumpre com os requisitos, fornecendo, portanto, resultados de elevada credibilidade. Na tabela seguinte (tabela 6) encontram-se apresentados numa forma simplificada as características de

desempenho e os seus valores obtidos. Considerando que os números de ensaios (amostras contaminadas artificialmente, não contaminadas e naturalmente contaminadas) foram iguais tanto para a contagem de *Staphylococcus* spp. como para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*, optou-se por apresentar os resultados em conjunto.

Tabela 6: Resultados dos parâmetros obtidos para a validação do método de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase positiva* (adaptada de Silliker Portugal S.A., 2020)

Amostras	Ensaio	Ensaio de amostras contaminadas artificialmente e/ou naturalmente em paralelo	Ensaio de amostras não contaminadas	Ensaio de amostras contaminadas naturalmente
33	110	92	18	8

Ensaio presuntivo				
		+	-	
Confirmados/ Verdadeiramente	+	(a) Verdadeiros positivos	(b) Falsos negativos	a + b
	-	(c) Falsos positivos	(d) Verdadeiros negativos	c + d
		a + c	b + d	n

Ensaio presuntivo				
		+	-	
Confirmados	+	92	0	a + b
	-	0	18	c + d
		a + c	b + d	n

Sensibilidade	a / (a + b)	100 %
Especificidade	d / (c + d)	100 %
Taxa de falsos positivos	c / (a + c)	0 %
Taxa de falsos negativos	b / (b + d)	0 %
Seletividade	a / n	84 %
Eficiência	(a + d) / n	100 %

▪ Exatidão

A exatidão é demonstrada com base nos resultados dos ensaios de comparação interlaboratorial, tanto para a contagem de *Staphylococcus* spp. como para a contagem dos *Staphylococcus coagulase positiva*. A exatidão permite avaliar a

proximidade entre o resultado obtido no ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro (Relacre, 2000).

Nas tabelas seguintes (7 e 8) apresentam-se os resultados obtidos nesses mesmos ensaios.

Tabela 7: Resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial para a contagem de *Staphylococcus spp.*

Amostra	Matriz	Resultado (UFC)	Resultado esperado (UFC)	“z-score”	Avaliação
a	Água de piscina	19	8-82	-0,39	Aceitável
b	Água de piscina	53	53	0	Aceitável

Tabela 8: Resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Amostra	Matriz	Resultado (UFC)	Resultado esperado (UFC)	“z-score”	Avaliação
a	Água de piscina	19	8-79	-0,34	Aceitável
b	Água de piscina	53	53	0	Aceitável

Analisando as tabelas anteriores, é possível verificar que os resultados alcançados se encontram dentro dos valores esperados e, avaliando o “z-score” verifica-se que em todos os casos, o mesmo possui um valor inferior a 2 e muito próximo de 0. Estes dados permitem concluir que a exatidão do método tanto para os *Staphylococcus spp.* como para os *Staphylococcus coagulase positiva* apresentaram valores aceitáveis, cumprindo assim com os critérios estabelecidos para a matriz analisada (Relacre, 2000).

▪ Incerteza

De modo a calcular as incertezas associadas ao método foram utilizados 44 resultados para a contagem de *Staphylococcus spp.* e 38 para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*, obtidos em paralelo entre pessoal técnico diferente. Para a contagem de *Staphylococcus spp.* foi determinada uma incerteza no valor de 6%, já para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*, chegou-se a

um valor de 8%. A incerteza exprime a possibilidade de erro de um resultado e quanto menor o seu valor, maior a qualidade do resultado obtido (Relacre, 1996).

3.2. Auditoria interna ao método

As auditorias realizadas ao método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva foram realizadas nos dias 15, 16 e 17 de Junho no laboratório da Silliker Portugal. Para tal, recorreu-se a um documento desenvolvido na empresa que serviu de *checklist*. Durante a auditoria interna foi efetuada uma auditoria presencial que consistiu no acompanhamento da realização do método pelo auditor, onde o mesmo pode verificar se todos os passos do método são executados de acordo com a norma NP 4343:1998. Efetuou-se também uma auditoria vertical que consistiu na análise de um boletim analítico de uma amostra de água de piscina desde a sua receção até à emissão dos resultados da mesma. Ao longo destes dias foram analisadas 4 amostras de águas de piscinas.

Nas tabelas seguintes (9 a 17) apresentam-se os tópicos analisados e os respetivos comentários/observações. Devido a questões de confidencialidade não é possível apresentar informações mais específicas.

Na auditoria ao método não foram identificados problemas que pusessem em questão a precisão e a confiança dos resultados do cliente, resultando, portanto, numa conformidade neste ponto (tabela 9).

Tabela 9: Tópico da auditoria ao método relacionado com questões e problemas obtidos durante a auditoria ao mesmo e respetivos comentários

Item	C	NC	NA	Comentários	Ação
Foram identificados problemas/questões durante a auditoria ao método que coloquem em causa a precisão e confiança dos resultados do Cliente que exigem a invalidação dos resultados?	X	-	-	Não foram identificados problemas/questões.	-
Se sim, a Qualidade Corporativa foi notificada (a Qualidade Corporativa deve ser notificada dentro de 24 horas se este problema for observado)	-	-	X	-	-

▪ C – Conforme; NC – Não conforme; NA – Não aplicável

▪ Lista de verificação ao analista

Em relação ao tópico da lista de verificação ao analista (tabela 10), foram analisados os documentos relativos à validação de métodos em análise microbiológica (PCQ 33) e à quantificação de competências em microbiologia (IQ 257). Verificou-se, portanto, que os analistas que participaram na validação do método se encontram automaticamente qualificados para a execução do mesmo e os registos de formação encontram-se completos e são revistos pelo responsável do laboratório de microbiologia. Não foi detetada nenhuma não conformidade neste tópico.

Tabela 10: Tópico da auditoria ao método relacionado com a lista de verificação ao analista e respetivos comentários

Item	C	NC	NA	Comentários	Ação
O treino dos Analistas segue os princípios:					
A) O Analista em treino leu e releu o método/procedimento com um Analista Qualificado?					
B) O Analista em treino, observou o método/procedimento a ser realizado por um Analista Qualificado?	X	-	-	Foi verificado o documento PCQ 33 sobre a validação de métodos em análise microbiológica.	-
C) O Analista em treino demonstrou habilidade e conformidade com o método/procedimento sob a supervisão direta de um Analista Qualificado?					
D) O analista demonstra competência no método/procedimento?					
Os registos da formação encontram-se completos: registos dos testes, resultados de cálculos e têm completa rastreabilidade.	X	-	-	Foi verificado o documento IQ 257 sobre a matriz de qualificação de competências em microbiologia.	-
Os registos de formação são revistos, verificados e autorizados pelos Responsáveis do laboratório?	X	-	-	Os documentos são verificados pelo responsável do laboratório de microbiologia.	-
O desempenho técnico é verificado anualmente?	-	-	X	O método foi validado este ano (2021).	-

▪ C – Conforme; NC – Não conforme; NA – Não aplicável

▪ Princípios do método

Relativamente aos princípios do método, os analistas foram questionados sobre os possíveis pontos críticos do método, ou seja, o que pode colocar em causa a precisão dos resultados finais. Para além disso, foram também questionados sobre os pontos que possam levar a um resultado elevado, um resultado baixo, um falso positivo ou falso negativo. Em ambas as situações os analistas foram capazes de identificar os pontos críticos (tabela 11), obtendo-se, portanto, conformidade nos dois pontos.

Tabela 11: Tópico da auditoria ao método relacionado com o princípio do método e respetivos comentários

Item	C	NC	NA	Comentários	Ação
Os Analistas conseguem identificar os pontos críticos do método?	X	-	-	Contaminações cruzadas; Má desinfecção da rampa de filtração; Criação de bolhas de ar no meio MEVAG.	-
O Analista consegue identificar os passos críticos que podem causar: 1) um resultado elevado 2) resultado baixo, 3) um falso positivo ou 4) um falso negativo	X	-	-	1) Resultado elevado: Contaminações cruzadas; filtrar mais que 100 ml; 2) Resultado baixo: Não agitar amostra; Filtrar menos que 100 ml; 3) Um falso positivo: Contaminações cruzadas; 4) Um falso negativo: Má interpretação na observação da coloração de Gram ao microscópio	-

- C – Conforme; NC – Não conforme; NA – Não aplicável

▪ Reclamações dos clientes

Neste tópico da auditoria (tabela 12), todos os itens analisados estavam em conformidade, visto não ter sido identificada nenhuma reclamação ou não conformidade relacionada com o método nos últimos 12 meses e considerando o laboratório ter definido um responsável pela retoma do trabalho em caso da ocorrência de não conformidades ou reclamações que afetem a precisão dos resultados.

Tabela 12: Tópico da auditoria ao método relacionado com as reclamações dos clientes e respetivos comentários

Item	C	NC	NA	Comentários	Ação
Houve alguma não conformidade ou reclamação de Cliente relacionada com o método auditado nos últimos 12 meses? Se sim a investigação foi realizada de acordo com os requisitos legais? Foi determinado a análise de causas? Foi implementado uma correção e/ou ação corretiva apropriada? Houve um acompanhamento eficaz?	-	-	X	Não houve nenhuma reclamação ou não conformidade nos últimos 12 meses relacionadas com o método auditado.	-
Foram identificados problemas durante a investigação que colocassem em dúvida a validação dos resultados, incluindo invalidados, tratados de forma eficaz e os Clientes notificados de uma forma adequada?	-	-	X	-	-
No caso de uma recolha de resultados, o Diretor Técnico Regional foi notificado imediatamente (24h)?	-	-	X	-	-
O laboratório tem definido, no caso de uma não conformidade ou Reclamação de Cliente, que ponha em causa a precisão dos resultados, quem é o responsável pela retoma do trabalho?	X	-	-	Diretora Geral da Empresa	-

▪ **C** – Conforme; **NC** – Não conforme; **NA** – Não aplicável

▪ Teste ao método

Em relação ao teste ao método, não foram verificadas não conformidades (tabela 13). A norma encontra-se atualizada e os analistas possuem acesso à mesma e a todos os documentos associados. Os resultados da validação e as respetivas conclusões foram registadas num relatório de validação juntamente com o cálculo da incerteza do método.

Tabela 13: Tópico da auditoria ao método relacionado com o teste ao método e respetivos comentários

Item	C	NC	NA	Comentários	Ação
Método/norma: Existe e está devidamente controlado?	X	-	-	A norma existe e está devidamente controlada (NP4343:1998).	-
O método/norma está atualizado?	X	-	-	-	-
As analistas têm acesso a uma cópia integral?	X	-	-	Os analistas têm acesso a uma cópia integral na plataforma digital da empresa.	-
O procedimento é seguido pelas analistas?	X	-	-	-	-
Quando aplicável, o método encontra-se no formato global?	-	-	X	-	-
O Analista tem acesso à mais corrente versão do procedimento e documentos associados?	X	-	-	Os analistas têm acesso à mais corrente versão na plataforma digital da empresa.	-
O documento local é consistente com o método referenciado?	X	-	-	-	-
Se o método for um método fornecido pelo cliente, o laboratório possui os requisitos globais da última versão?	-	-	X	-	-
O âmbito de aplicação da validação/verificação inclui as amostras a serem testadas?	X	-	-	A norma é principalmente para águas de piscinas.	-
Se a matriz estiver fora do âmbito de aplicação original, o laboratório procedeu à validação/verificação do método para a matriz fornecida?	-	-	X	-	-
Os resultados da validação/verificação foram registados e determinadas as conclusões dos resultados (válido/inválido)?	X	-	-	Os resultados foram registados no relatório de validação.	-
O cálculo da incerteza foi identificado e documentado para os métodos acreditados?	X	-	-	O cálculo da incerteza foi registado no relatório de validação.	-

▪ C – Conforme; NC – Não conforme; NA – Não aplicável

▪ Execução do método

Neste tópico da auditoria (tabela 14), recorreu-se ao documento de rastreabilidade (IQ.40) de modo a verificar que nenhum dos prazos de validade dos meios, reagentes e kit foram excedidos, que possuíam completa rastreabilidade e se encontravam armazenados adequadamente. Foram também verificadas as temperaturas dos frigoríficos e da estufa utilizados, 5 °C e 37 °C respetivamente. Por fim, analisou-se a execução do método pelos analistas, concluindo-se que o mesmo era executado na íntegra e de acordo com a norma.

Tabela 14: Tópico da auditoria ao método relacionado com a execução do método e respetivos comentários

Item	C	NC	NA	Comentários	Ação
A validade de todos os kits/reagentes/suplementos/meios não foi excedida?	X	-	-	Verificado no IQ.40. Todos os kits/reagentes/meios encontravam-se dentro da validade.	-
As tolerâncias de temperaturas são respeitadas?	X	-	-	Verificadas temperaturas, todas se encontravam dentro dos limites estabelecidos.	-
Os meios/suplementos são armazenados adequadamente?	X	-	-	Todos os meios e suplementos encontravam-se armazenados de acordo com os fornecedores.	-
O controlo de qualidade dos meios é aceitável e com completa rastreabilidade?	X	-	-	Verificado no IQ.40, completa rastreabilidade dos meios.	-
O analista segue o método? Enumere todos os pontos revistos e identifique se atende/não atende ao requisito.					
1) Filtração de 100 ml e incubação da placa de MSA a 37 °C, durante 48h;					
2) Leitura e contagem das colónias suspeitas; Transferência das colónias suspeitas para meio NA e incubação a 37 °C durante 24h;					
3) Execução da coloração de Gram;	X	-	-	Todos os pontos revistos atenderam aos requisitos.	-
4) Pesquisa da Catalase;					
5) Determinação do tipo respiratório;					
6) Pesquisa da coagulase;					
7) Registo dos resultados.					
No caso de testes quantitativos, os retests foram devidamente configurados? A concordância entre os resultados foi calculada adequadamente?	-	-	X	-	-

▪ **C** – Conforme; **NC** – Não conforme; **NA** – Não aplicável

▪ Rastreabilidade

Nesta parte da auditoria, foi executada uma auditoria vertical na medida em que foi analisado um boletim analítico que permitiu verificar a rastreabilidade de uma amostra desde a sua receção até à emissão dos resultados. Foi verificado uma completa rastreabilidade de todos os reagentes, kits e meios utilizados, tendo esta sido vista no boletim e no documento IQ.46 referente à rastreabilidade dos meios de cultura. Para além disso, confirmou-se também uma completa rastreabilidade dos registos de equipamentos usados no procedimento e na preparação dos meios de cultura. Todos os itens deste tópico encontravam-se, portanto, em conformidade (tabela 15).

Tabela 15: Tópico da auditoria ao método relacionado com a rastreabilidade e respetivos comentários

Item	C	NC	NA	Comentários	Ação
Existe uma completa rastreabilidade das amostras no programa de laboratório?	X	-	-	Visto boletim analítico. Existe completa rastreabilidade da amostra.	-
Existe uma completa rastreabilidade de todos os reagentes, kits, meios, suplementos?	X	-	-	Visto boletim analítico, onde se verificou o lote do meio MSA Restantes meios verificados no IQ.46 (rastreabilidade dos meios de cultura).	-
Existe uma completa rastreabilidade das leituras/repicagens?	X	-	-	Visto boletim analítico. Completa rastreabilidade das leituras.	-
Existe uma completa rastreabilidade dos registos de equipamentos?	X	-	-	Visto boletim analítico. Completa rastreabilidade dos registos de equipamentos.	-
Existe uma completa rastreabilidade da preparação dos meios de cultura?	X	-	-	Visto no IQ.40.	-

- **C** – Conforme; **NC** – Não conforme; **NA** – Não aplicável

▪ Equipamentos, temperaturas, massas e volumes

Os equipamentos utilizados no método, nomeadamente, balança, pipetas, frigorífico e estufa, foram verificados através das cartas de controlo e das etiquetas de identificação, calibração e verificação. Todos os equipamentos estavam atualizados, nomeadamente com as datas das calibrações efetuadas e as próximas datas previstas. As temperaturas foram medidas com o auxílio de um termómetro, as quais se confirmaram estar dentro dos valores desejados. Não se verificou qualquer não conformidade nestes itens (tabela 16).

Tabela 16: Tópico da auditoria ao método relacionado com a lista de verificação ao analista e respetivos comentários

Item	C	NC	NA	Comentários	Ação
Os registos dos equipamentos usados estão atualizados? Ver se existem etiquetas de identificação, calibração e verificação (se aplicável).	X	-	-	Registos encontravam-se atualizados.	-
Temperaturas: Os registos das calibrações, verificações e manutenções (se aplicável) estão atualizados?	X	-	-	Registos encontravam-se atualizados.	-
Volumes: Os registos das calibrações, verificações e manutenções (se aplicável) estão atualizados?	X	-	-	Registos encontravam-se atualizados.	-
Massas: Os registos das calibrações, verificações e manutenções (se aplicável) estão atualizados?	X	-	-	Registos encontravam-se atualizados.	-
Outros: Os registos das calibrações, verificações e manutenções (se aplicável) estão atualizados?	-	-	X	-	-

C - Conforme; **NC** – Não conforme; **NA** – Não aplicável

▪ Registos e documentação

Relativamente aos registos e documentação relacionados com o método, todos os itens presentes na tabela 17 foram verificados, recorrendo-se a documentos como o IQ.257 e a outros existentes na plataforma digital da empresa. Concluiu-se que todos os documentos e registos se encontravam em conformidade com o pretendido.

Tabela 17: Tópico da auditoria ao método relacionado com os registos e documentação e respetivos comentários

Item	C	NC	NA	Comentários	Ação
A fórmula de cálculo está de acordo com a norma?	X	-	-	-	-
Apresentação dos resultados (de acordo com a ISO 7218 ou outra norma).	X	-	-	Resultados apresentados segundo ISO 8199	-
Registos da qualificação das analistas e descrição das funções.	X	-	-	O registo da qualificação das analistas foi verificado no IQ.257 (Quantificação das competências em microbiologia)	-
A documentação dos recursos humanos está atualizada, para a analista em questão?	X	-	-	Foi verificado a documentação dos recursos humanos para as analistas auditadas, estando esta atualizada.	-
Existem amostras diárias de controlo de processo (DPCS)? Registos são corretamente efetuados?	X	-	-	No caso de amostras de águas de piscinas estas ocorrem semanalmente de acordo com PCQ25.	-
As não conformidades geradas por DPCS fora de limites/tendências estão registadas e tratadas?	-	-	X	-	-
Existem ensaios de comparação interlaboratorial (ECI's)? Duas participações por ano?	X	-	-	-	-
As não conformidades geradas por ECI fora de limites estão registadas e tratadas?	-	-	X	Não foram geradas não conformidades	-

- **C** – Conforme; **NC** – Não conforme; **NA** – Não aplicável

Resumidamente, na auditoria interna ao método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva não foram detetadas quaisquer não conformidades, o que permitiu concluir que o método se encontra eficazmente implementado e a ser executado na íntegra de acordo com a norma NP4343.

4. Conclusão

O objetivo deste trabalho incidiu sobre a validação secundária do método de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em águas e a sua auditoria interna. Foram analisados diversos parâmetros, entre os quais, as características de desempenho do método (especificidade, sensibilidade, taxa de falsos positivos, taxa de falsos negativos, seletividade), a produtividade, o critério de precisão, a exatidão e a incerteza do método. Todos estes parâmetros tiveram valores satisfatórios, de acordo com as normas e com os critérios do laboratório, permitindo assim concluir que os resultados derivados deste método possuem uma elevada credibilidade e qualidade. Relativamente à auditoria interna ao mesmo, não foram detetadas quaisquer não conformidades, significando, portanto, que o método se encontra a ser realizado na íntegra de acordo com o imposto na norma. Posto isto, pode-se afirmar que o objetivo do trabalho foi cumprido, na medida em que tanto a validação como a auditoria interna ao método foram bem-sucedidas.

Em suma, este trabalho realça a importância da validação de métodos e das suas auditorias internas, de modo a garantir resultados credíveis, fiáveis e uma constante melhoria do sistema de gestão da qualidade. Demonstra também a relevância da execução de análises microbiológicas de modo a detetar microrganismos patogénicos como *S. aureus* e outros microrganismos que quando presentes nas águas podem colocar em risco a saúde dos utilizadores. Estas análises têm, portanto, como objetivo minimizar os riscos associados à prática da natação, garantindo nomeadamente a qualidade das águas, a segurança dos banhistas e a eficácia dos tratamentos efetuados nas águas das instalações recreativas.

5.Referências Bibliográficas

- Adams, M., & Moss, M. (2008). Chapter 7: Bacterial Agents of Foodborne Illness. In *Food Microbiology* (3rd ed., pp. 182–269).
- Al-khatib, I. A., Bank, W., & Ghannam, R. S. (2011). *Microbiological water quality and sampling policy of public swimming pools*. 3(2), 192–204.
- Anversa, L., Stancari, R. C. A., Garbelotti, M., Ruiz, L. da S., Pereira, V. B. R., Nascentes, G. A. N., Dantas, S. T. A., & Rall, V. L. M. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* in public water supply. *Water Practice and Technology*, 14(3), 732–737. <https://doi.org/10.2166/wpt.2019.057>
- Araştırılması, M. K. (2019). *Investigation of the Physical, Chemical Characteristics and Microbial Contamination of the Indoor Swimming Pools*. 43(3), 130–134. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.6112>
- ASAE. (2021). *Staphylococcus aureus*. <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/staphylococcus-aureus.aspx> (acedido em 6/06/2021)
- Barrell, R. A. E., Hunter, P. R., Nichols, G., Barrell, R. A. E., & Hunter, P. R. (2000). *Microbiological standards for water and their relationship to health risk*. 3(1), 8–13.
- Bartram, J., Cotruvo, J., Exner, M., Fricker, C., & Glasmacher, A. (2004). Heterotrophic plate count measurement in drinking water safety management: Report of an Expert Meeting Geneva, 24-25 April 2002. *International Journal of Food Microbiology*, 92(3), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.005>
- Bello, O., & Temitope, B. K. (2012). Microbial Qualities of Swimming Pools in Lagos , Nigeria Microbial Qualities of Swimming Pools in Lagos , Nigeria. *International Journal of Applied Science and Technology*, October.
- Biokar. (2010). *Mannitol salt agar*.
- Bristow, Z., Mena, K. D., Ph, D., Gibbs, S. G., Ph, D., Gurian, L., Mulla, P. D. Z. D., Ph, D., & Byrd, T. L. (2004). *Risk Assessment of Heterotrophic Plate Count (HPC) Bacteria in Potable Water Sources*. 60(4).

- Brito, A. G., Oliveira, J. M., & Peixoto, J. M. (2014). *Tratamento de água para Consumo Humano e Uso Industrial: Elementos Teórico-Práticos* (2nd ed.). Publindústria.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2013a). Chapter 13: The Staphylococci. In *Medical Microbiology* (26th ed., pp. 199–205).
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2013b). Chapter 14: The Streptococci, Enterococci and Related Genera. In *Medical Microbiology* (pp. 209–225).
- Cabral, J. P. S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). *E. coli (Escherichia coli)*. <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html> (Acedido em 11/08/2021)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2016). *Health Benefits of Water-Based Exercise*. https://www.cdc.gov/healthywater/swimming/swimmers/health_benefits_water_exercise.html (Acedido em 11/08/2021)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). *Legionella (Legionnaires's Disease and Pontiac Fever)*. <https://www.cdc.gov/legionella/about/signs-symptoms.html> (Acedido em 12/08/2021)
- Chauhan, A., & Jindal, T. (2020). *Microbiological Methods for Environment , Food and Pharmaceutical Analysis*.
- Cho, S., Hiott, L. M., McDonald, J. M., Barrett, J. B., McMillan, E. A., House, S. L., Adams, E. S., Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2020). Diversity and antimicrobial resistance of Enterococcus from the Upper Oconee Watershed, Georgia. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 1221–1233. <https://doi.org/10.1111/jam.14550>
- Conselho Nacional da Qualidade. (1993). *Directiva CNQ N° 23/93: A qualidade nas piscinas de uso público*.
- Devane, M. L., Moriarty, E., Weaver, L., Cookson, A., & Gilpin, B. (2020). Fecal indicator bacteria from environmental sources; strategies for identification to improve water

quality monitoring. *Water Research*, 185, 116204.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116204>

Direção Geral de Saúde. (2009). *Circular Normativa N°14/DA: Programa de Vigilância Sanitária de Piscinas*.

El-Salam, M. M. A. (2012). Assessment of water quality of some swimming pools: A case study in Alexandria, Egypt. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(12), 7395–7406. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2508-6>

Environmental Health Intelligence New Zealand. (2021). *About recreational water quality and health*. <https://www.ehinz.ac.nz/indicators/water/recreational-water/about-recreational-water-quality-and-health/> (Acedido em 15/06/2021)

Fadaei, A., & Amiri, M. (2015). Comparison of chemical, biological and physical quality assessment of indoor swimming pools in Shahrekord City, Iran in 2013. *Global Journal of Health Science*, 7(3), 240–248. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v7n3p240>

Fields, B., Robert, B., & Besser, R. (2002). *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation - Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *Journal of Clinical Microbiology*, 15(3), 697–699. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.506>

Font-Ribera, L., Kogevinas, M., Schmalz, C., Zwiener, C., Marco, E., Grimalt, J. O., Liu, J., Zhang, X., Mitch, W., Critelli, R., Naccarati, A., Heederik, D., Spithoven, J., Arjona, L., de Bont, J., Gracia-Lavedan, E., & Villanueva, C. M. (2016). Environmental and personal determinants of the uptake of disinfection by-products during swimming. *Environmental Research*, 149, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.013>

Giampaoli, S., & Spica, V. R. (2014). Health and safety in recreational waters. *Bulletin of the World Health Organization*, 92(2), 79. <https://doi.org/10.2471/BLT.13.126391>

Gracenea, M., Castaño, S., Méndez, J., Lucena, F., & Gómez, M. S. (2018). Faecal contamination in public pools in Barcelona province: *Cryptosporidium* spp. and bacterial indicators. *Journal of Water and Health*, 16(5), 762–772. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.267>

Guida, M., Gallè, F., Mattei, M. L., Anastasi, D., & Liguori, G. (2009). Microbiological

- quality of the water of recreational and rehabilitation pools: a 2-year survey in Naples, Italy. *Public Health*, 123(6), 448–451. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2009.03.008>
- Hardalo, C., & Edberg, S. C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(1), 47–75. <https://doi.org/10.3109/10408419709115130>
- Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2020). The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>
- Ibarluzea, J., Moreno, B., Zigorraga, C., Castilla, T., Martinez, M., & Santamaria, J. (1998). Determinants of the microbiological water quality of indoor swimming-pools in relation to disinfection. *Water Research*, 32(3), 865–871. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00290-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00290-X)
- Instituto Português da Qualidade. (1998). *NP 4343 - Qualidade da água: Pesquisa e Quantificação de Estafilococos*.
- IPAC. (2018). *Guia Para a Aplicação Da NP EN ISO/IEC 17025*. 1–28.
- ISO. (1999). *ISO 6222: Water quality - Enumeration of culturable micro-organisms - Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*.
- ISO. (2000). *ISO 7899-2: Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci - Part 2: Membrane filtration method*.
- ISO. (2012). *ISO 29101 - Water quality: The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods*.
- ISO. (2015). *ISO 9000 - Quality Management Systems: Fundamentals and Vocabulary*.
- ISO. (2015). *ISO 9001 - Quality Management Systems: Requirements*.
- ISO. (2016). *ISO 9308 - 1: Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora*.
- ISO. (2017). *ISO 13843 - Water quality: Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods*.

- ISO. (2018). *ISO 19011 - Guidelines for auditing management systems*.
- Khalifa, M., & Bidaisee, S. (2018). The Importance of Clean Water. *Scholar Journal of Applied Sciences and Research*.
- Lagière, J., Labarthe, S., Dubourg, K., & Bauduer, F. (2020). Influence of hydrotherapy pool water recirculation regime on *Staphylococcus* species concentration at subsurface: Preliminary experimental data from a pilot. *Environment International*, 136(December 2019), 105382. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105382>
- Lakind, J. S., Richardson, S. D., & Blount, B. C. (2010). The good, the bad, and the volatile: Can we have both healthy pools and healthy people? *Environmental Science and Technology*, 44(9), 3205–3210. <https://doi.org/10.1021/es903241k>
- Leon, S., Meacham, S., & Claudio, V. (2003). Chapter 2: Water Safety. In *Global Handbook on Food and Water Safety* (pp. 16–38).
- Leoni, E., Legnani, P. P., Bucci Sabattini, M. A., & Righi, F. (2001). Prevalence of *Legionella* spp. in swimming pool environment. *Water Research*, 35(15), 3749–3753. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00075-6)
- Leoni, Erica, Catalani, F., Marini, S., & Dallolio, L. (2018). Legionellosis associated with recreational waters: A systematic review of cases and outbreaks in swimming pools, spa pools, and similar environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(8), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijerph15081612>
- Licitra, G. (2013). *Etymologia: Staphylococcus*. Emerging Infectious Diseases. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3810938/> (Acedido em 12/07/2021)
- Masoud, G., Abbass, A., & Abaza, A. (2016). Bacteriological quality of some swimming pools in Alexandria with special reference to *Staphylococcus aureus*. *Environmental Monitoring and Assessment*. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5427-8>
- Ministério do Equipamento, do Planeamento e da Administração do território. (1997). Decreto de Lei nº5/97. In *Diário da República - I Série - B*.
- Monticelli, L. S., Decembrini, F., Bergamasco, A., & Caruso, G. (2019). Water quality assessment of transitional and coastal marine Sicilian waters (Italy): Ecological and epidemiological significance of multiple antimicrobial resistant *Enterococcus* spp.

Estuarine, Coastal and Shelf Science, 217, 173–184.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecss.2018.11.021>

Neves, M. C., Leal, Â. D., Camarada, M. A., Marques, M., Onofre, C. D. J., Morgado, H., Álvaro, J., Castelão, A., Marques, P., Ferreira, P., Gonçalves, F., & Morgado, R. (2016). Avaliação da contaminação microbiana da água e superfícies numa piscina coberta terapeutica. In *VI Congresso - Vertentes e Desafios da Segurança* (pp. 73–78).

Odonkor, S. T., & Ampofo, J. K. (2013). *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research*, 4(1), 2.
<https://doi.org/10.4081/mr.2013.e2>

Oviedo, L., Lopera, L., Lara, P. A., Castrillón, F., & Peñuela, G. A. (2021). *Monitoring of chlorine decay in public swimming pools in Medellín (Colombia)*.

Papadopoulou, C., Economou, V., & Sakkas, H. (2008). *Microbiological quality of indoor and outdoor swimming pools in Greece: Investigation of the antibiotic resistance of the bacterial isolates* *Microbiological quality of indoor and outdoor swimming pools in Greece: Investigation of the antibiotic resistance*. April 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.06.007>

Park, J. E., Ahn, T. S., Lee, H. J., & Lee, Y. O. (2006). Comparison of total and faecal coliforms as faecal indicator in eutrophicated surface water. *Water Science and Technology*, 54(3), 185–190. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.467>

Pasquarella, C., Veronesi, L., Napoli, C., Castaldi, S., Pasquarella, M. L., Saccani, E., Colucci, M. E., Auxilia, F., Gallè, F., Di Onofrio, V., Tafuri, S., Signorelli, C., & Liguori, G. (2013). Swimming pools and health-related behaviours: Results of an Italian multicentre study on showering habits among pool users. *Public Health*, 127(7), 614–619. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2013.01.014>

Pasquarella, C., Veronesi, L., Napoli, C., Castaldi, S., Pasquarella, M. L., Saccani, E., Colucci, M. E., Auxilia, F., Gallè, F., Di Onofrio, V., Tafuri, S., Signorelli, C., & Liguori, G. (2014). What about behaviours in swimming pools? Results of an Italian multicentre study. *Microchemical Journal*, 112, 190–195.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.09.024>

- Rabi, A., Khader, Y., Alkafajei, A., & Aqoulah, A. A. (2007). *Sanitary Conditions of Public Swimming Pools in Amman , Jordan*. 4(4), 301–306.
- Ramteke, P. W., Bhattacharjee, J. W., Pathak, S. P., & Kalra, N. (1992). Evaluation of coliforms as indicators of water quality in India. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(4), 352–356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01846.x>
- Relacre. (1996). *Guia 3: Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*.
- Relacre. (2000). *Guia 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*.
- Relacre. (2007). *Guia 6: Acreditação de Laboratórios de ensaios microbiológicos*.
- Sapra, A., & Tripathi, N. (2021). *Gram Staining*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/#article-22389.s2> (Acedido em 20/06/2021)
- Saxena, G., Bharagava, R. N., Kaithwas, G., & Raj, A. (2015). Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *Journal of Water and Health*, 13(2), 319–339. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.275>
- Seo, K., & Bohach, G. (2013). Chapter 21: *Staphylococcus aureus*. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (4th ed., pp. 547–573). <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch21>
- Silliker Portugal S.A. (2020). *Validação de métodos em análise microbiológica: Procedimento relativo ao controlo da qualidade (PCQ.33)*. 1–25.
- Silliker Portugal S.A. (2021a). *Merieux NutriSciences - Acreditação e Reconhecimentos*. <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/acreditacao-e-reconhecimentos> (Acedido 22/05/2021)
- Silliker Portugal S.A. (2021b). *Merieux NutriSciences - Silliker Portugal, S.A.* <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal> (Acedido em 22/05/2021)
- Sinclair, R. G., Jones, E. L., & Gerba, C. P. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1769–1780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x>
- Tolba, O., Loughrey, A., Goldsmith, C. E., Millar, B. C., Rooney, P. J., & Moore, J. E.

- (2008). Survival of epidemic strains of healthcare (HA-MRSA) and community-associated (CA-MRSA) meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in river-, sea- and swimming pool water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211(3–4), 398–402. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.06.003>
- Tyagi, S., Sharma, B., Singh, P., & Dobhal, R. (2020). Water Quality Assessment in Terms of Water Quality Index. *American Journal of Water Resources*, 1(3), 34–38. <https://doi.org/10.12691/ajwr-1-3-3>
- Unity Nations. (2010). *Resolution adopted by the General Assembly on 28 July 2010*.
- WHO. (2000). *Microbiological Aspects - WHO seminar pack for drinking-water quality*. 23.
- WHO. (2006). *Guidelines for safe recreational water environments* (Vol. 2).
- WHO. (2017). *Guidelines for Drinking-water quality*.
- Zhou, B., Ye, Q., Chen, M., Li, F., Xiang, X., Shang, Y., Wang, C., Zhang, J., Xue, L., Wang, J., Wu, S., Pang, R., Ding, Y., & Wu, Q. (2021). Novel species-specific targets for real-time PCR detection of four common pathogenic *Staphylococcus* spp. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108478>