

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Caracterização do viroma de águas residuais urbanas e
avaliação do perigo para a saúde pública**

Jérôme De Carvalho Antunes

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Prof^a Doutora Maria Teresa Rebelo
Doutora Mónica Nunes

Agradecimentos

Gostaria de exprimir o meu mais sincero obrigado a quem sempre me apoiou e acompanhou ao longo deste ano.

À minha orientadora externa Doutora Mónica Nunes que me acolheu no laboratório *Food Safety and Microbiology* do iBET e orientou o trabalho conducente à dissertação, por toda a disponibilidade, apoio e confiança. Agradeço também o permanente incentivo nos momentos mais complicados.

À minha orientadora interna Prof^a Doutora Maria Teresa Rebelo por ter aceite acompanhar-me neste percurso. O meu sincero agradecimento pela sua disponibilidade e paciência.

À Mestre Andreia Silva, à Mestre Micaela Oliveira e à Mestre Inês Leonardo pelo apoio, companheirismo e por todos os ensinamentos transmitidos na minha passagem pelo laboratório *Food Safety and Microbiology* do iBET.

Aos meus pais e irmã por toda a força e amor que me deram. Por acreditarem sempre em mim e nas minhas capacidades.

À minha namorada e amigos pela amizade, carinho e preocupação. Sem vocês não seria possível alcançar este objetivo pessoal.

Resumo

A água é o recurso natural mais valioso do planeta, pelo que a sua conservação constitui um dos mais importantes pilares do desenvolvimento sustentável. Nas regiões em que a escassez de recursos hídricos constitui uma realidade natural e naquelas em que o crescimento demográfico e/ou as alterações climáticas perspetivam essa escassez, a gestão sustentável dos recursos hídricos implica a sua conservação e inclui, por conseguinte, a reutilização da água. Um exemplo é a reutilização de águas residuais (AR's) na irrigação na agricultura, sendo uma alternativa sustentável, promovendo a redução da captação de água e das descargas de efluentes no meio ambiente.

No entanto, este tipo de água pode estar contaminada com microrganismos resistentes aos tratamentos de desinfecção convencionais aplicados em estações de tratamento de águas residuais (ETAR's), como por exemplo vírus patogénicos tais como, Norovírus (NoV), vírus da Hepatite A (HAV), vírus da Hepatite E (HEV), Adenovírus (AdV) e Polyomavírus (PyV), constituindo um risco para a saúde humana. Mais ainda a avaliação da qualidade microbiológica das AR's é realizada com recurso a microrganismos indicadores, sendo o mais comumente usado para a indicação de poluição fecal, os coliformes fecais, como por exemplo: *Escherichia coli*, da família *Enterobacteriaceae*, que não são os adequados para a deteção da presença/concentração de partículas virais.

Desta forma, este estudo teve como principal objetivo detetar e quantificar a existência de seis genomas virais (NoV GI e GII, HAV, HEV, AdV e PyV) presentes em amostras de AR colhidas em diferentes pontos de duas ETAR'S de Lisboa (ETAR X e ETAR Y), através de técnicas moleculares de amplificação dirigida (qPCR) e amplificação não-dirigida (NGS – do inglês, *next generation sequencing*).

Foram amostrados quatro pontos ao longo de cada uma das ETAR's em estudo em duas estações do ano distintas, outono e primavera. De um modo geral todos os genomas virais em estudo foram detetados em concentrações elevadas (acima de 10^6 cópias de genoma/L) nos influentes e nos respetivos efluentes reutilizáveis, com algumas exceções. Para o caso do genoma de AdV e de HEV estes apresentaram variações nas suas concentrações consoante a estação do ano estudada, estando presentes na primavera, mas não no outono.

Da avaliação por sequenciação de próxima geração verifica-se que há uma maior diversidade de famílias virais no influente da ETAR X comparativamente ao influente da ETAR Y, estando este facto provavelmente associado ao tipo de AR que cada ETAR trata. Mais ainda, observou-se um aumento da diversidade de famílias virais no efluente após o tratamento secundário em ambas as ETAR's, sendo maioritariamente famílias associadas a bacteriófagos.

Apesar da evolução dos métodos de tratamento das ETAR's, a sua eficiência na remoção/inativação dos vírus é ainda baixa, o que poderá contribuir para um risco de saúde pública, uma vez que os efluentes tratados destas ETAR's são lançados nos recursos hídricos para reutilização, podendo ser uma via de transporte destes vírus para população.

Mais ainda este estudo veio corroborar a importância de se começar a utilizar vírus como indicadores de contaminação fecal nas águas, sendo que os indicadores bacterianos, não conseguem retratar com precisão os riscos para a saúde humana. Desta forma, apesar de ser impraticável monitorizar a presença de todos os agentes patogénicos virais relacionados com a poluição das AR's, o desenvolvimento de um indicador viral preciso da contaminação dos esgotos é necessário para uma monitorização melhorada da qualidade da água.

Palavras-chave: Caracterização viral de AR's, NGS, qPCR, disseminação de vírus patogénicos

Abstract

Water is the most valuable natural resource on the planet, so its conservation is one of the most important pillars of sustainable development. In regions where water scarcity is a natural reality and where population growth and/or climate change prospect that scarcity, sustainable management of water resources involves the conservation of these resources and therefore includes water reuse. An example of water reuse is wastewater (WW) reuse in agriculture irrigation, being a sustainable alter-native, promoting the reduction of water collection and discharges of effluents into the environment.

However, this type of water may be contaminated with microorganisms resistant to conventional disinfection treatments applied in wastewater treatment plants (WWTP's), such as pathogenic viruses like Norovirus (NoV), Hepatitis A virus (HAV), Hepatitis E virus (HEV), Adenovirus (AdV) and Polyomavirus (PyV), constituting a risk to human health. Furthermore, the assessment of the microbiological quality of WW is carried out using indicator microorganisms, the most commonly used for the indication of faecal pollution, is faecal coliforms, such as: *Escherichia coli*, from the *Enterobacteriaceae* family, which are not suitable for detection of the presence / concentration of viral particles.

Thus, this study aimed to detect and quantify the presence of six viral genomes (NoV GI and GII, HAV, HEV, AdV and PyV) present in samples of residual water collected at different points of two WWTP's in Lisbon (WWTP X and WWTP Y), using molecular techniques of directed amplification (qPCR) and non-directed amplification (next generation sequencing - NGS).

Four points were sampled along each WWTP under study in two different seasons of the year, autumn and spring. In general, all studied viral genomes were detected in high concentrations (above 10^6 copies of genome/L) in the influents and in the respective reused effluents, with some exceptions. For AdV and HEV genomes case, these showed variations in their concentrations according to the season in study, being present in the spring, but not in the autumn.

From the next generation sequencing assessment, it appears that there is a greater diversity of viral families in the influent of WWTP X compared to the influent of WWTP Y, this fact is probably associated with the type of WW that each WWTP treats. In addition, there was an increase in the viral families diversity in the effluent after secondary treatment of both WWTP's, being most families associated with bacteriophages.

Despite the evolution of treatment methods of the WWTPs, their efficiency in removing/ inactivating viruses is still low, which may contribute to a public health risk, since the treated effluents from these WWTPs are released in the water resources for reuse, which can be a way of bringing these viruses to the population.

Furthermore, this study corroborates the importance of starting to use viruses as indicators of faecal contamination in waters, since bacterial indicators are not able to accurately portray the risks to human health. Thus, although it is impractical to monitor the presence of all viral pathogens related to WW pollution, the development of an accurate viral indicator of sewage contamination is necessary for an improved monitoring of water quality.

Key words: Wastewater virome characterization, NGS, qPCR, pathogenic virus dissemination

O trabalho da presente dissertação foi desenvolvido no âmbito dos projetos:

- AgriWWater: “Reclaimed wastewater for agriculture irrigation: mitigating microbiological hazards for a safer food production”. Refª PTDC/CTA-AMB/29586/2017, Projetos de IC&DT em todos os Domínios Científicos da Fundação para a Ciência da Tecnologia (FCT).
- VirusFreeWater: “Reclaimed water for agricultural irrigation: overcoming the silent threat of waterborne viral infections”. Refª 706, Projeto interno IBETXplore 2017.

Parte do trabalho da presente dissertação foi apresentado sob a forma de poster e comunicação oral no congresso nacional MicroBiotec19, que teve lugar nos dias 5 a 7 de Dezembro de 2019, na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra.

“Environmental monitoring of enteric viruses in wastewater from two Portuguese wastewater treatment plants” - Poster

Jérôme Antunes, Maria Teresa Barreto Crespo, Ana Filipa Silva, Mónica Nunes

“The study of viruses in urban sewage by metagenomics: a tool for public health surveillance”
– Comunicação Oral

Mónica Nunes, Andreia Filipa Silva, Ricardo Parreira, Ana Filipa Silva, Maria Teresa Barreto Crespo

Índice

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract	IV
Índice.....	VI
Lista de figuras	IX
Lista de tabelas.....	XI
Lista de siglas, abreviaturas e símbolos	XII
1. Introdução.....	1
1.1. Necessidade de reutilização de águas residuais.....	1
1.1.1. A origem, constituição e caracterização das águas residuais e das estações de tratamentos de águas residuais.....	1
1.1.2. Principais etapas de tratamento de águas residuais	2
1.2. Microrganismos patogénicos associados a águas residuais.....	4
1.2.1. Vírus patogénicos presentes em águas residuais	5
1.2.1.1. Género <i>Norovírus</i>	7
1.2.1.2. Género <i>Hepatovírus</i>	7
1.2.1.3. Género <i>Orthohepevírus</i>	8
1.2.1.4. Género <i>Mastadenovírus</i>	9
1.2.1.5. Género <i>Betapolyomavírus</i>	10
1.3. Métodos de concentração e extração de partículas virais	11
1.4. Detecção viral em águas residuais	12
1.4.1. Método clássico.....	12
1.4.2. Técnicas moleculares de amplificação de sequências genómicas virais	12
1.4.2.1. Amplificações dirigidas.....	12
1.4.2.2. Amplificações não dirigidas	15
1.5. Objetivos	15
2. Material e métodos	17
2.1. Caracterização das estações de tratamento de águas residuais em estudo e recolha de amostras de água residual	17
2.2. Concentração de partículas virais por floculação orgânica	18
2.2.1. Preparação da solução de leite em pó para floculação	18
2.2.2. Floculação orgânica.....	18
2.3. Detecção e quantificação dos genomas virais alvo por protocolos qPCR <i>TaqMan</i>	19
2.3.1. Extração de ácidos nucleicos a partir dos concentrados virais	19

2.3.2.	Síntese de cDNA por RT-PCR a partir de RNA	19
2.3.3.	Preparação e otimização das curvas padrão para o <i>multiplex TaqMan</i> qPCR.....	20
2.3.3.1.	Amplificação de DNA genómico de AdV e PyV por PCR	20
2.3.3.1.1.	Análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose	21
2.3.3.2.	Purificação dos produtos de amplificação por PCR	21
2.3.3.3.	Clonagem molecular.....	21
2.3.3.3.1.	Obtenção de células <i>Escherichia coli</i> competentes e sua transformação	22
2.3.3.4.	Extração de DNA plasmídico	23
2.3.4.	Desenvolvimento e otimização das reações de <i>TaqMan</i> qPCR em <i>multiplex</i>	24
2.3.4.1.	Desenvolvimento e otimização do protocolo <i>duplex</i> qPCR <i>TaqMan</i> para detecção dos genomas virais de AdV e PyV	24
2.3.5.	Protocolo <i>tetraplex</i> qPCR <i>TaqMan</i> para detecção dos genomas virais de NoV GI, NoV GII, HAV e HEV.....	25
2.4.	Avaliação da comunidade viral por análise metagenómica por sequenciação de próxima geração	27
2.4.1.	Amostras analisadas e extração do RNA viral	27
2.4.2.	Sequenciação de próxima geração.....	27
3.	Resultados e discussão	28
3.1.	Caracterização das estações de tratamento de águas residuais em estudo e recolha de amostras de águas residuais.....	28
3.2.	Concentração de partículas virais por floculação orgânica	28
3.3.	Deteção e quantificação dos genomas virais por protocolos <i>TaqMan</i> qPCR.....	29
3.3.1.	Extração de ácidos nucleicos a partir dos concentrados virais	29
3.3.2.	Preparação e otimização das curvas padrão para o protocolo <i>duplex TaqMan</i> qPCR... ..	29
3.3.2.1.	Clonagem molecular das sequências amplificadas de AdV e PyV	30
3.3.3.	Desenvolvimento e otimização do protocolo de <i>duplex TaqMan</i> qPCR para pesquisa simultânea de genomas de AdV e PyV	31
3.3.4.	Protocolo <i>tetraplex</i> qPCR <i>TaqMan</i> para detecção dos genomas virais de NoV GI, NoV GII, HAV e HEV.....	35
3.4.	Avaliação da comunidade viral por análise metagenómica por sequenciação de próxima geração	37
4.	Conclusão.....	41
5.	Referências bibliográficas	42
6.	Anexos.....	51
6.1.	Sistema comercial <i>QIAamp® Viral RNA Mini Kit</i> (QIAGEN®).....	51
6.2.	Sistema comercial <i>NZYGelpure kit</i> (NZYTech).....	51

6.3. Quantificação e ácidos nucleicos extraídos a partir dos concentrados virais para qPCR <i>TaqMan</i>	51
6.4. Quantificação de ácido desoxirribonucleico plasmídico	52
6.5. Quantificação de ácidos nucleicos extraídos a partir dos concentrados virais para NGS	53

Lista de figuras

Figura 1.1 - Índice da exploração de água na Europa. (adaptado de Sanz & Gawlik, 2014 [3]).	1
Figura 1.2 - Etapas/comboio de tratamento de uma ETAR.	2
Figura 1.3 - Operação de gradagem. (https://aosts.com/types-wastewater-screening/ [16]).	3
Figura 1.4 - Decantador. (Simões <i>et al.</i> , 2008 [15]).	3
Figura 1.5 - Sistema de tratamento biológico por lamas ativadas. (Simões <i>et al.</i> , 2008 [15]).	4
Figura 1.6 - Estrutura viral. (adaptado de Kayser <i>et al.</i> , 2005 [23]).	5
Figura 1.7 - Imagem obtida por microscopia eletrónica de partículas virais de Norovírus. (Le Pendu <i>et al.</i> , 2006 [37]).	7
Figura 1.8 - Imagem obtida por microscopia eletrónica de partículas virais de Hepatite A. (https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2739 [41]).	8
Figura 1.9 - Imagem obtida por microscopia eletrónica de partículas virais de Hepatite E. (https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=5605 [45]).	9
Figura 1.10 - Imagem obtida por microscopia eletrónica de partículas virais de Adenovírus. (Goldsmith & Miller, 2009 [48]).	10
Figura 1.11 - Imagem obtida por microscopia eletrónica de partículas virais de Polyomavírus. (Goldsmith & Miller, 2009 [48]).	11
Figura 1.12 - Esquema da técnica PCR. (adaptado de Kubista <i>et al.</i> , 2006 [68]).	13
Figura 1.13 - Representação gráfica das fases da reação de qPCR. Ct – interceção da curva de amplificação da amostra com o <i>threshold</i> (adaptado de Kubista <i>et al.</i> , 2006 [68]).	14
Figura 1.14 - Gráfico da curva padrão com concentrações de DNA conhecidas nos pontos de A - E. (adaptado de Butler, 2005 [88]).	14
Figura 2.1 - Recolha do efluente após o tratamento secundário na ETAR X. (Fotografia do autor). ..	17
Figura 2.2 - Floculação com leite em pó – amostras de AR sob agitação constante durante 8 h. (Fotografia do autor).	18
Figura 2.3 - Esquema representativo do vetor plasmídico <i>pGEM®-T Easy</i> . (https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf [99]).	22
Figura 3.1 - Observação dos produtos de amplificação obtidos para o genoma de Adenovírus e Polyomavírus após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. (A) fragmento de Adenovírus; (B) fragmento de Polyomavírus. M – Marcador molecular: <i>NZYDNA Ladder IV</i> (NZYTech). C⁻ - Controlo negativo de amplificação.	30
Figura 3.2 - Observação do resultado da clonagem com os fragmentos do genoma de Adenovírus (A) e Polyomavírus (B) . Colónias brancas - <i>E.coli</i> cujo plasmídeo tem inserido o fragmento de interesse (inserto); Colónias azuis - <i>E.coli</i> cujo plasmídeo não tem o inserto.	30
Figura 3.3 - Observação dos produtos amplificação obtidos para Adenovírus (A) e Polyomavírus (B) , após clonagem molecular para confirmação do inserto no plasmídeo das colónias brancas de <i>E. coli</i> . M – Marcador molecular: <i>NZYDNA Ladder IV</i> (NZYTech). C⁻ - Controlo negativo de amplificação.	31
Figura 3.4 - Ilustração da curva padrão obtida para o protocolo de <i>singleplex</i> qPCR direcionado ao genoma de Adenovírus. (A) Diluições de DNA de Adenovírus seriadas de 10 ⁶ a 1 cópias de genoma; (B) respetiva relação entre o logaritmo da concentração inicial de DNA e os valores de Ct de amplificação. Neg – controlo negativo da reação de qPCR cujo <i>template</i> corresponde a água e RNA <i>free</i> ; Ct – interceção da curva de amplificação da amostra com o <i>threshold</i> .	32
Figura 3.5 - Ilustração da curva padrão obtida para o protocolo de <i>singleplex</i> qPCR direcionado ao genoma de Polyomavírus, e (A) Diluições de DNA de Polyomavírus seriadas de 10 ⁶ a 1 cópias de	

genoma; (B) respetiva relação entre o logaritmo da concentração inicial de DNA e os valores de Ct de amplificação. Neg – controlo negativo da reação de qPCR cujo <i>template</i> corresponde a água DNA e RNA free; Ct – interceção da curva de amplificação da amostra com o <i>threshold</i>	32
Figura 3.6 - Ilustração da relação linear entre o logaritmo da concentração inicial de DNA e os valores de amplificação entre 10^6 e 1 cópias de genoma para o protocolo de <i>duplex</i> qPCR e para cada um dos protocolos de qPCR em <i>singleplex</i> para os genomas de Adenovírus (A) e Polyomavírus (B) . Ct – interceção da curva de amplificação da amostra com o <i>threshold</i>	33
Figura 3.7 - Representação gráfica das quantificações obtidas para os genomas de Adenovírus e Polyomavírus na ETAR X (A) e na ETAR Y (B) , nos diferentes pontos de amostragem das recolhas de Outono de 2018 e Primavera de 2019. PA – Pontos amostrados na ETAR X: I - Influyente após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; II - efluente que segue para o rio Tejo após o tratamento secundário (biofiltração); III - efluente após passagem por um sistema de filtração por membrana; IV - efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%. Na ETAR Y os pontos amostrados foram: I - influente após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; II - efluente após o tratamento secundário (lamas ativadas); III - efluente que segue para o rio Tejo após passagem por um filtro de areia; IV - efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%.	33
Figura 3.8 - Representação gráfica das quantificações obtidas para os genomas de Norovírus GI, Norovírus GII, vírus da Hepatite A e E na ETAR X (A) e na ETAR Y (B) , nos diferentes pontos de amostragem das recolhas de Outono de 2018 e Primavera de 2019. PA – Pontos amostrados na ETAR X: I - Influyente após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; II - efluente que segue para o rio Tejo após o tratamento secundário (biofiltração); III - efluente após passagem por um sistema de filtração por membrana; IV - efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%. Na ETAR Y os pontos amostrados foram: I - influente após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; II - efluente após o tratamento secundário (lamas ativadas); III - efluente que segue para o rio Tejo após passagem por um filtro de areia; IV - efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%.	35
Figura 3.9 - Ilustração da percentagem de cada uma das famílias virais identificadas por sequenciação de próxima geração, nos quatro pontos amostrados na Primavera na ETAR X (A) e na ETAR Y (B) . * - famílias associadas a vírus patogénicos.	38
Figura 6.1 - Concentrações de RNA e grau de pureza obtidos da extração de ácidos nucleicos a partir dos concentrados virais das amostras das ETAR's X e Y, recolhidas no Outono de 2018 e na Primavera de 2019 (Abril).	52
Figura 6.2 - Concentrações de DNA plasmídico e grau de pureza obtidos da sua extração a partir de clones com fragmentos de Adenovírus (AdV) e Polyomavírus (PyV).	52
Figura 6.3 - Concentrações de RNA e grau de pureza obtidos da extração de ácidos nucleicos a partir dos concentrados virais das amostras das ETAR's X e Y, recolhidas na Primavera de 2019 (Abril)...	53

Lista de tabelas

Tabela 1.1 - Principais vírus responsáveis por causarem doenças através do contato com água. (adaptado de Rusiñol & Girones, 2017 [12]).....	6
Tabela 1.2 - Variação da concentração de alguns vírus patogênicos humanos ao longo de uma ETAR. (adaptado de Zhang <i>et al.</i> , 2016 [28]).....	6
Tabela 2.1 - Características das Estações de tratamento de água residual analisadas. UV - Ultravioleta (adaptado de Rodrigues, 2015 [98]).....	17
Tabela 2.2 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação de sequências genômicas virais em estudo. AdV – Adenovírus; PyV – Polyomavírus.....	20
Tabela 2.3 - Reagentes e volumes utilizados para ligação de DNA ao vetor <i>pGEM®-T Easy</i> (Promega).	23
Tabela 2.4 - Sequências de <i>primers</i> e sondas utilizados para os protocolos de <i>duplex</i> qPCR <i>TaqMan</i> . AdV – Adenovírus; PyV – Polyomavírus.....	24
Tabela 2.5 - Concentrações finais usadas para a quantificação de genomas virais por qPCR <i>singleplex</i> dirigido para os genomas alvo: AdV – Adenovírus e PyV – Polyomavírus.	25
Tabela 2.6 - Sequências de <i>primers</i> e sondas utilizadas para os protocolos de <i>tetraplex</i> qPCR <i>TaqMan</i> . NoV GI – Norovírus GI; NoV GII – Norovírus GII; HAV – Vírus da Hepatite A; HEV - Vírus da Hepatite E.....	26
Tabela 2.7 - Concentrações finais usadas para quantificação viral por qPCR <i>tetraplex</i> dirigido para os genomas alvo. NoV GI – Norovírus GI; NoV GII – Norovírus GII; HAV – Vírus da Hepatite A; HEV - Vírus da Hepatite E.....	26

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

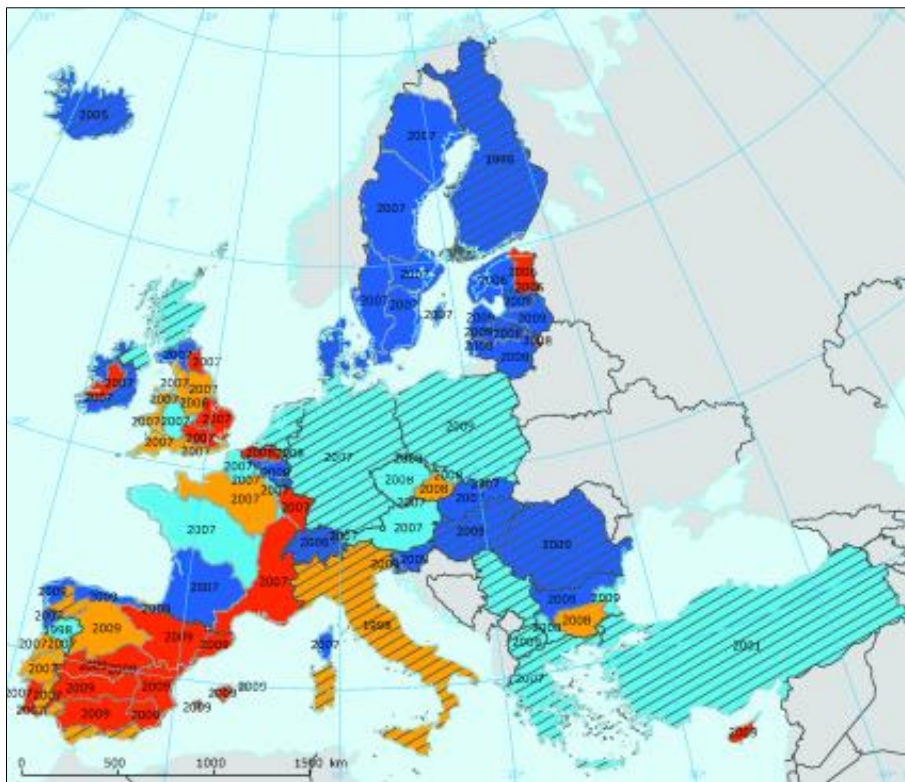
AdV – Adenovírus
AR – Água residual
BHQ1 – Do inglês, *black hole quencher 1*
BHQ2 – Do inglês, *black hole quencher 2*
BKPyV – BK Polyomavírus
cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
CO₂ – Dióxido de carbono
Ct – Do inglês, *threshold cyclor*
Da – Dalton
DABCYL – *4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride*
DNA – Do inglês, *deoxyribonucleic acid*
DNase – Desoxirribonuclease
dNTP – Desoxirribonucleotídeo fosfatado
E. coli – *Escherichia coli*
EDTA – Do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*
ETAR – Estação de tratamento de água residual
FAM – Do inglês, *fluorescein amidite*
FRET – Do inglês, *fluorescence resonance energy transfer*
g – Grama
H – Hora
HAdV – Adenovírus humanos
HAdV-40 – Adenovírus humanos tipo 40
HAV – Do inglês, *hepatitis A vírus*
HCL – Ácido clorídrico
HEV – Do inglês, *hepatitis E vírus*
HEX – Do inglês, *hexachloro-fluorescein*
HIV – Do inglês, *human immunodeficiency virus*
H₂O – Água
iBET – Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica
Inc – Do inglês, *incorporation*
IPTG – Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
ITR – Do inglês, *inverted terminal repeats*
JCPyV – John Cunningham polyomavírus
Kb – Quilo base
L – Litro
LB – Luria-Bertani
Log₁₀ – Logaritmo de base 10
M – Molar
m – Massa
min – Minuto
mL – Mililitro
mM – Milimolar
mol – Mole
N – Azoto

Na₂HPO₄ – Hidrogenofosfato de sódio
NaH₂PO₄ – Di-hidrogenofosfato de sódio
NCCR – Do inglês, *non-coding control region*
NCR – Do inglês, *noncoding region*
ng – Nanograma
NGS – Do inglês, *next generation sequencing*
nM – Nanomolar
nm – Nanómetro
NO₃⁻ – Nitrato
NoV – Norovírus
NoV GI – Norovírus genótipo I
NoV GII – Norovírus genótipo II
ORF – Do inglês, *open reading frame*
ORF1 – Do inglês, *open reading frame1*
ORF2 – Do inglês, *open reading frame2*
ORF3 – Do inglês, *open reading frame3*
P – Fósforo
PA – Pontos amostrados
bp – Do inglês, *base pair*
PCR – Do inglês, *polymerase chain reaction*
PEG – Polietileno glicol
pH – Potencial de Hidrogénio
poly-A – Do inglês, *polynucleotide adenylyltransferase*
Prof^a – Professora
PyV – Polyomavírus
qPCR – Do inglês, *polymerase chain reaction quantitative real time*
RCF – Do inglês, *relative centrifugal force*
RNA – Do inglês, *ribonucleic acid*
RNases – Ribonuclease
rpm – Rotação por minuto
RT-PCR – Do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*
s – Segundo
SISPA – Do inglês, *Sequence-Independent Single Primer Amplification*
SMF – Do inglês, *skimmed milk flocculation*
SOB – Do inglês, *super optimal broth*
TAE – Tris-Acetato-EDTA
TAMRA – Do inglês, *carboxytetramethylrhodamine*
Tris – Do inglês, *tris(hydroxymethyl)aminomethane*
µg – Micrograma
USA – Do inglês, *United States of America*
µL – Microlitro
UV – Ultravioleta
V – Volt
v – Volume
X-gal – 5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
°C – Grau Celsius

1. Introdução

1.1. Necessidade de reutilização de águas residuais

Atualmente, a disponibilidade dos recursos hídricos tem escasseado e a sua qualidade tem vindo a degradar-se devido a vários fatores tais como: as alterações climáticas, o crescimento demográfico, o desenvolvimento industrial e da agricultura, o controlo insuficiente da poluição, entre outras¹⁻³. Assim, há uma sobre-exploração deste recurso em relação à sua disponibilidade, causando situações de stress hídrico como representado na figura 1.1³. Desta forma, surgiu a necessidade de gerir de forma sustentável este recurso, através, por exemplo, da reutilização de águas residuais (AR's) para diversos fins, tais como: rega agrícola e urbana (jardins/parques), atividades industriais, usos recreativos e ambientais, usos urbanos não-potáveis e, em alguns países, até o seu uso potável^{1,2,4-6}.



Índice de Exploração de Água (%)

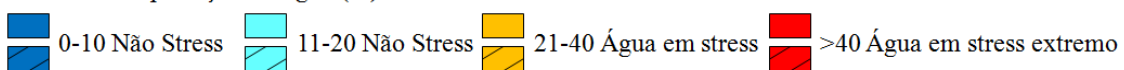


Figura 1.1 - Índice da exploração de água na Europa. (adaptado de Sanz & Gawlik, 2014 [3]).

1.1.1.A origem, constituição e caracterização das águas residuais e das estações de tratamentos de águas residuais

As AR's são constituídas por sólidos suspensos, material orgânico biodegradável, nutrientes, metais pesados, microrganismos patogénicos, e material inorgânico dissolvido proveniente de atividades antropogénicas de origem doméstica, hospitalar e industrial, diluídas ou não, em águas pluviais, subterrâneas e superficiais^{7,8}. São caracterizadas qualitativamente ao nível das alterações físicas

(coloração, temperatura, odor, sólidos), químicas (matéria orgânica, pH, nutrientes, entre outras) e biológicas (organismos coliformes, microrganismos específicos), e quantitativamente pela variação do caudal, de carga poluente afluente à estação de tratamento de águas residuais (ETAR), e caudal de dimensionamento^{1,2,7-9}.

As AR's chegam à rede de esgotos municipal, sendo direcionadas para ETAR's, cujo objetivo consiste na diminuição da concentração de contaminantes/carga poluente, através processos unitários químicos, físicos e biológicos, possibilitando descargas com valores limites estabelecidos de acordo com o meio recetor, garantindo a proteção ambiental^{2,8-10}. As ETAR's desempenham um papel crucial na mitigação dos microrganismos e na redução do risco de transmissão de agentes patogénicos responsáveis por doenças infecciosas virais associadas ao consumo ou contato com água contaminada^{11,12}. Caso não se realizem tratamentos às AR's antes da sua descarga em lençóis hídricos naturais, estes podem causar efeitos ambientais e na saúde humana/pública, como por exemplo: criação de maus odores, esgotamento de oxigénio dissolvido, libertação de nutrientes, contaminantes tóxicos e patogénicos, com possibilidade de causar surtos de doenças infecciosas virais^{2,7,9,13,14}.

1.1.2.Principais etapas de tratamento de águas residuais

As AR's quando da sua receção nas ETAR's sofrem um conjunto de tratamentos sequenciais, tal como elucidado na figura 1.2, constituídos por operações e processos conceptualizados segundo a caracterização qualitativa e quantitativa, entre outros^{9,15}.



Figura 1.2 - Etapas/comboio de tratamento de uma ETAR.

O tratamento preliminar tem como objetivo eliminar ou reduzir resíduos de grandes dimensões, areias e gorduras pelas seguintes operações físicas: gradagem, tamisação, desarenação e desgorduramento de forma a preservar os equipamentos mecânicos e evitar obstruções ou entupimentos nos restantes tratamentos^{8,9,15}. A gradagem retém os resíduos sólidos em suspensão e flutuantes, sendo estes retidos à passagem por grelhas com determinado espaçamento (figura 1.3). A tamisação é um complemento da gradagem por possuir uma grelha com malha mais fina. A desarenação retira areias através da sua deposição no fundo de um tanque, e o desgorduramento retira óleos e gorduras, sendo efetuado por flotação que consiste na injeção de um fluxo de ar ascendente no interior do tanque resultando na acumulação de gorduras na superfície^{9,15}.



Figura 1.3 - Operação de gradagem. (<https://aosts.com/types-wastewater-screening/> [16]).

O tratamento primário tem como objetivo remover sólidos em suspensão facilmente sedimentáveis por decantação/sedimentação ou flotação. A operação de decantação retira os sólidos em suspensão decantáveis por ação da gravidade num decantador (figura 1.4). A operação de flotação é apenas aplicada para retirar partículas de reduzidas dimensões cuja sedimentação não é viável^{8,9,15}.



Figura 1.4 - Decantador. (Simões *et al.*, 2008 [15]).

O tratamento secundário tem como objetivo remover a matéria orgânica biodegradável dissolvida ou em suspensão, e nutrientes como por exemplo azoto (N) e fósforo (P), com recurso a processos biológicos^{8,9,15,17}. O sistema de tratamento biológico por lamas ativadas (figura 1.5) em condições aeróbias é o mais usado e eficaz para converter/degradar matéria orgânica biodegradável numa lama biológica, no entanto também pode ser utilizado em condições anóxicas, como por exemplo: no processo biológico de remoção de N , na fase de desnitrificação (nitrato (NO_3^-) é reduzido a N), ou em condições anaeróbias para remoção de P ^{8,15}. Este tipo de tratamento recorre a diversos microrganismos, tais como bactérias e protozoários, mantidos em suspensão no tanque de arejamento ou num reator biológico em conjunto com as AR's, definindo-se como processo de biomassa suspensa. Esta biomassa perante a injeção de oxigénio adsorve a matéria orgânica dissolvida das AR's, mantida em agitação, convertendo-a, por síntese e oxidação, em produtos finais, tais como dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O), compostos azotados, e resíduos orgânicos. Estes resíduos agregam/floculam formando flocos biológicos devido à segregação de uma cadeia polimérica criando uma camada em

redor das células^{8,15,18}. Através da decantação, os flocos biológicos depositam-se no fundo do tanque de sedimentação permitindo a separação sólido-líquido. Parte das lamas ativadas são recicladas, de forma a manter a concentração desejada de microrganismos no tanque de arejamento ou reator biológico^{8,17}. Em alternativa existe o processo de biomassa fixa em que os microrganismos aderem a um meio inerte, imóvel e filtrante constituído por rochas, areia ou plásticos no interior do tanque de arejamento ou reator biológico. Exemplo deste tipo de processo é o sistema de tratamento por biofiltração, em que biofiltros na qual passam as AR's, degradam a matéria orgânica formando um biofilme constituído, maioritariamente, por bactérias^{8,15}.



Figura 1.5 - Sistema de tratamento biológico por lamas ativadas. (Simões *et al.*, 2008 [15]).

O tratamento terciário é um complemento aos tratamentos anteriores, de forma a garantir a qualidade exigida do meio recetor, mas também removendo determinados poluentes que ainda permaneçam nas AR's, como por exemplo: microrganismos patogénicos, partículas difíceis de decantar e nutrientes^{9,15}. Neste tipo de tratamento o processo unitário de desinfecção tem por objetivo a inativação/eliminação de microrganismos patogénicos e atua ao nível da parede celular, da permeabilidade celular, da natureza coloidal do protoplasma e dos ácidos nucleicos do microrganismo^{8,9,15,17}. Para tal, recorre-se à desinfecção por cloragem, ou seja, por adição de cloro molecular ou de compostos clorados, como por exemplo, cloro gasoso e hipoclorito de sódio, sendo um processo económico que permite inativar os microrganismos pelo comprometimento das membranas celulares que, por consequência, altera a atividade de síntese do DNA. Em alternativa, tem surgido uma opção menos poluente e mais eficiente na eliminação/inativação dos microrganismos, nomeadamente a desinfecção com recurso à radiação ultravioleta (UV). O alvo principal deste tipo de desinfecção é o material genético, onde os microrganismos são comprometidos quando a luz penetra na célula e é absorvida pelo ácido nucleico. Esta absorção provoca um rearranjo da informação genética que interfere com a capacidade de reprodução da célula. Assim, os microrganismos são então inativados pela luz UV devido a danos fotoquímicos ao nível dos ácidos nucleicos^{2,8,9,17,19}.

1.2. Microrganismos patogénicos associados a águas residuais

Uma das principais preocupações na reutilização de AR's é a sua qualidade no que diz respeito aos microrganismos patogénicos, que podem ser disseminados no ambiente com retorno à população humana e animal provocando problemas de saúde pública e socioeconómicas, caso estas AR's não sejam eficazmente tratadas^{2,9,13,14,17,20}. Estes microrganismos podem ser vírus, bactérias, helmíntias, fungos e

protozoários, provenientes de excreções (fezes e urina) de indivíduos infetados, que estão presentes nas AR's na ordem dos milhões/grama de fezes, constituindo um veículo de transmissão destes agentes que poderão causar doenças em humanos, sendo por isso um potencial risco de saúde pública^{2,7-9,14,17,20}. O tipo e a concentração de microrganismos em AR's variam consoante o tipo de população, ao longo dos meses e até dos dias, estando estes dependentes da capacidade de sobrevivência e resistência demonstrada aos tratamentos submetidos e do estado geral de saúde da população^{2,6,14,21}.

O risco para a saúde humana na reutilização de AR's tratadas depende:

- a) da concentração de microrganismos patogénicos presentes, que varia e está dependente da eficiência dos tratamentos aplicados pelas ETAR's;
- b) das características epidemiológicas (persistência, latência e dose infetante) dos microrganismos patogénicos presentes na sua constituição;
- c) e da exposição da população ao contato com esta água.

Tendo em conta os objetivos da presente dissertação irão apenas ser abordados os vírus como exemplo de microrganismos patogénicos presentes nas AR's.

1.2.1. Vírus patogénicos presentes em águas residuais

Os vírus são partículas com um diâmetro compreendido entre 10 e 500 nm, constituídos por um genoma circular, linear ou segmentado de DNA ou RNA de cadeia simples ou dupla, envolvidos por uma camada de proteínas e glicoproteínas (cápside) cujo objetivo é de proteger o genoma da degradação. A cápside pode ainda ser envolvida por uma membrana ou invólucro lipídico (figura 1.6). São também considerados parasitas intracelulares obrigatórios, pois não possuem capacidade de se reproduzirem fora de uma célula hospedeira^{2,8,17,22-24}.

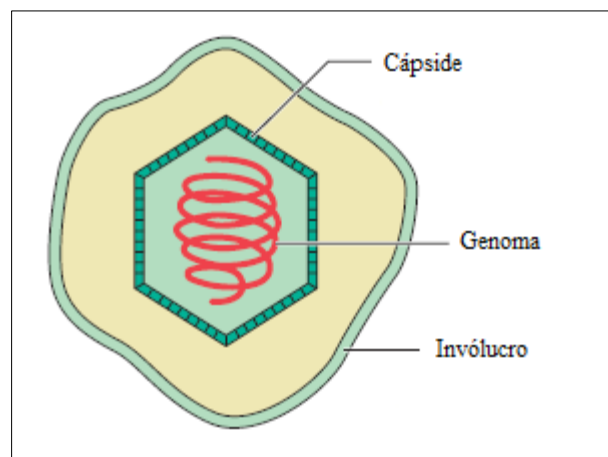


Figura 1.6 - Estrutura viral. (adaptado de Kayser *et al.*, 2005 [23]).

Os vírus podem ser patogénicos apresentando um maior poder de infetividade, tornando-se um risco para a saúde pública^{2,21,22,25,26}. O tipo de vírus mais detetados em AR's são os vírus entéricos (Tabela 1.1), os quais são excretados a níveis elevados atingindo 10^{12} microrganismos/grama de fezes, e estão associados a doenças tais como: gastroenterite, meningite, hepatite e doenças respiratórias, todas elas transmitidas através da água por diversas formas^{12,14,27}. Neste ambiente aquático, estes conseguem sobreviver por longos períodos incluindo várias semanas, ou até meses^{10,21}, onde por exemplo o Adenovírus consegue sobreviver por mais de 80 dias em água a 25 °C²¹.

Tabela 1.1 - Principais vírus responsáveis por causarem doenças através do contato com a água. (adaptado de Rusiñol & Girones, 2017 [12]).

Família	Gênero	Patogênicos humanos mais importantes	Patologias relacionadas
<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovírus	Adenovírus humano A-G	Gastroenterite, doenças respiratórias, conjuntivite
<i>Astroviridae</i>	Mamastrovírus	Astrovírus 1-9	Gastroenterite, infecções respiratórias
<i>Caliciviridae</i>	Norovírus	Norovírus GI, GII	Gastroenterite
	Sapovírus	Sapovírus GI, GII, GIV, GV	Gastroenterite
<i>Hepeviridae</i>	Orthohepevírus	Vírus da Hepatite E, G1, 2, 3, 4, 7	Hepatite aguda
<i>Picornaviridae</i>	Enterovírus	Enterovírus A-D, Rhinovírus A-C, Poliovírus 1-3, Cocksakievírus A-B	Meningite, anomalias de coração
	Hepatovírus	Vírus da Hepatite A GI-III	Hepatite aguda
	Kobuvírus	Aichivírus A-C	Gastroenterite
	Parechovírus	Parechovírus 1-16	Gastroenterite, infecções respiratórias, meningite
<i>Reoviridae</i>	Rotavírus	Rotavírus A-G	Gastroenterite

A concentração destes agentes nos influentes das ETAR's pode atingir valores de 10^9 cópias/L de AR's. Mais ainda, diversos estudos demonstram também que estes vírus conseguem persistir nos diversos efluentes das ETAR's, inclusive nas AR's reutilizáveis, sendo os mais resistentes os vírus representados na Tabela 1.2^{12,20,21,26,28}.

Tabela 1.2 - Variação da concentração de alguns vírus patogênicos humanos ao longo de uma ETAR. (adaptado de Zhang *et al.*, 2016 [28]).

Vírus	Influente (Cópias/L)	Efluente secundário (Cópias/L)	Após desinfecção
Enterovírus	$2.2 \times 10^3 - 7.9 \times 10^3$	6.8-250	36-67
	$2.2 \times 10^2 - 2.9 \times 10^5$		
Adenovírus	$10^6 - 10^7$	$9.3 \times 10^4 - 2 \times 10^5$	6.2-39
	$5.6 \times 10^2 - 1.7 \times 10^4$		
Rotavírus	$10^6 - 8.9 \times 10^6$	$5.5 \times 10^4 - 7 \times 10^5$	36-67
Norovírus	$5.6 \times 10^2 - 8.3 \times 10^3$		
	$5.5 \times 10^5 - 6 \times 10^6$		

1.2.1.1. Gênero *Norovírus*

Pertencente à família *Caliciviridae*, são vírus sem invólucro, de aproximadamente 35 nm de diâmetro e contendo um genoma de RNA de cadeia simples, de sentido positivo, entre 7,4 a 8,3 Kb com três grelhas abertas de leitura (ORF's – do inglês, *open reading frames*), dos quais a ORF1 codifica as proteínas não estruturais, enquanto que a ORF2 e ORF3 codificam as proteínas estruturais da cápside (VP1, VP2)^{24,29-31}. Estes vírus são classificados em dez genogrupos, sendo os membros pertencentes aos genogrupos I, II, IV, VIII e XIX capazes de infectar humanos³².

Os norovírus (NoV) (figura 1.7) podem ser excretados entre 10^7 e 10^9 cópias de genoma/g de fezes para as AR's, apresentando uma maior prevalência em meses frios^{12,19}. São considerados os principais causadores de surtos de gastroenterite aguda, associada normalmente ao genogrupo II, genótipo 4^{11,33,34}.

Os NoV podem ser transmitidos através do contato pessoa-a-pessoa, pelo consumo de alimentos ou água diretamente contaminados por matéria fecal³⁵. Estima-se que a dose infecciosa seja de 10 a 100 partículas virais³⁶.

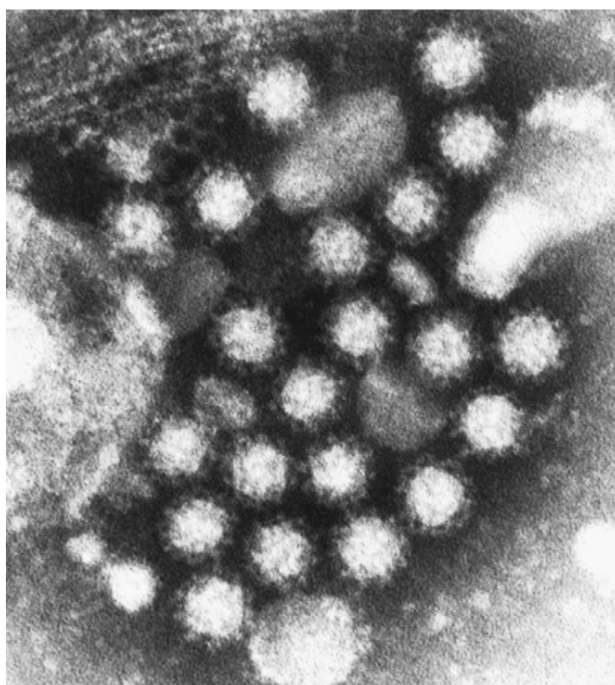


Figura 1.7 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de partículas virais de Norovírus. (Le Pendu *et al.*, 2006 [37]).

1.2.1.2. Gênero *Hepatovírus*

Pertencente à família *Picornaviridae*, são vírus sem invólucro, de 25 a 28 nm de diâmetro com um genoma de RNA de cadeia simples e sentido positivo, de aproximadamente 7,5 Kb com uma ORF que codifica uma poliproteína, subdividida em três regiões, dos quais P1 codifica proteínas estruturais (VP1 a VP4), enquanto P2 e P3 codificam as proteínas não estruturais^{24,38-40}. O vírus da hepatite A (HAV – do inglês, *hepatitis A virus*) (figura 1.8) apresenta seis genótipos, sendo os membros pertencentes aos genótipos I, II, III os mais prevalentes na infecção de humanos, e o genótipo I o mais prevalente mundialmente^{38,40}.

As regiões do Mundo em desenvolvimento com ETAR's precárias/deficitárias, ou com poucas condições sanitárias revelam uma maior prevalência deste vírus, sendo o principal causador de surtos

de hepatite aguda^{12,38,40}. As partículas virais podem ser excretadas na ordem das 10^7 cópias de genoma/g de fezes, sem sazonalidades, e revelando uma elevada estabilidade e resistência no ambiente, particularmente aos tratamentos impostos pelas ETAR's^{12,34,40}.

A transmissão é realizada por via fecal-oral, através do contato pessoa-a-pessoa ou através do consumo de água ou alimentos contaminados^{12,24,34,40}. Presume-se que a dose infecciosa do HAV seja 10 a 100 partículas virais³⁶.

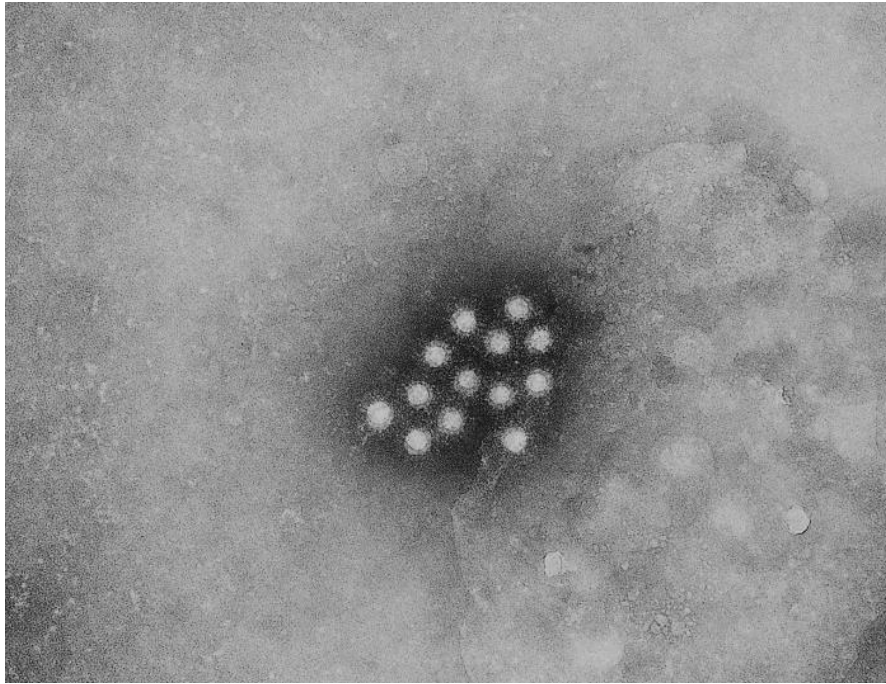


Figura 1.8 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de partículas virais de Hepatite A. (<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2739> [41]).

1.2.1.3. Gênero *Orthohepevirus*

Pertencente à família *Hepeviridae*, são vírus sem invólucro, de 30 nm de diâmetro com um genoma de RNA de cadeia simples de sentido positivo, de aproximadamente 7,2 Kb com três ORF's, dos quais ORF1 codifica uma poliproteína não estrutural, ORF2 codifica a proteína da cápside e ORF3 codifica uma pequena proteína multifuncional^{24,42-44}. O vírus da hepatite E (HEV – do inglês, *hepatitis E virus*) (figura 1.9) apresenta 4 genótipos, capazes de infectar humanos, sendo o principal causador de surtos de hepatite E aguda e crônica, essencialmente grave em mulheres grávidas e em imunocomprometidos^{42,43}. Pode ser excretado entre 10^3 a 10^7 cópias de genoma/g de fezes, com maior prevalência no Inverno. A transmissão é realizada pela via fecal-oral ou através do consumo de alimentos ou água contaminada, sendo a dose infecciosa desconhecida^{12,23,24}.

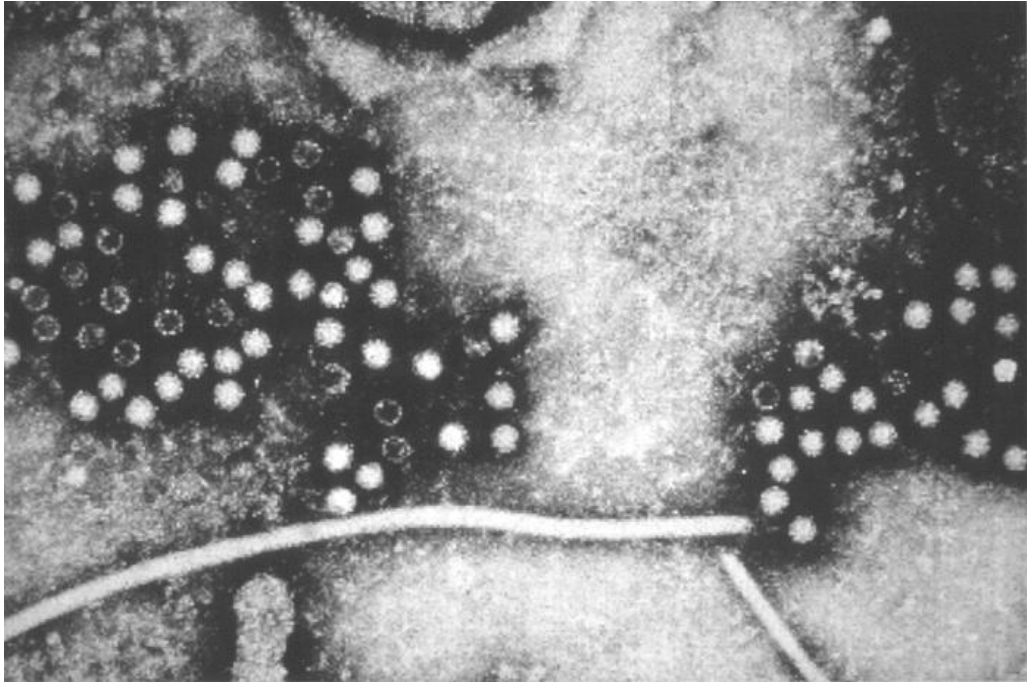


Figura 1.9 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de partículas virais de Hepatite E. (<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=5605> [45]).

1.2.1.4. Gênero *Mastadenovirus*

Pertencente à família *Adenoviridae*, são vírus sem invólucro, de 70 a 100 nm de diâmetro com um genoma de DNA de cadeia dupla, entre 34 a 37 Kb com regiões de repetições terminais invertidas (ITR's – do inglês, *inverted terminal repeats*), constituído por sequências conservadas, nas extremidades 3' e 5' na qual surge a replicação do genoma viral, por regiões funcionais correspondentes à fase de replicação em que são expressas: a região precoce que codifica proteínas, e a região tardia que codifica proteínas estruturais^{24,39,46,47}. Existem sete espécies de adenovírus (AdV) capazes de infectar humanos, de A a G, e 69 genótipos descritos até à data³⁹.

Os AdV (figura 1.10) podem ser excretados entre 10^7 e 10^{11} cópias de genoma/g de fezes, sem sazonalidade, sendo causadores de gastroenterite, conjuntivite e doenças respiratórias, como por exemplo, a pneumonia^{11,12,24}.

A transmissão é realizada por via fecal-oral, através do contato pessoa-a-pessoa, do consumo de alimentos e água contaminados ou via aérea através de secreções respiratórias¹².

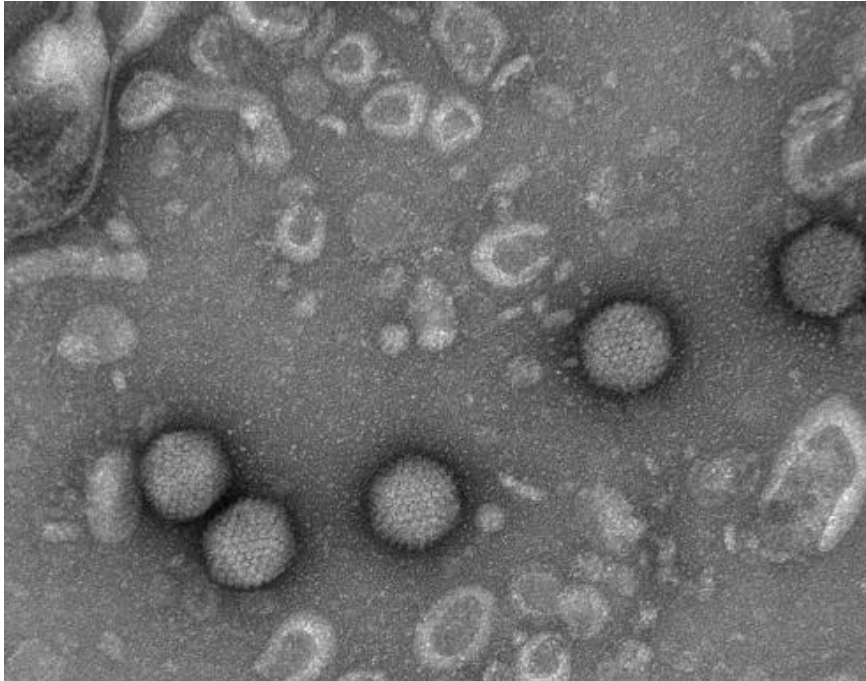


Figura 1.10 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de partículas virais de Adenovírus. (Goldsmith & Miller, 2009 [48]).

1.2.1.5. Gênero *Betapolyomavírus*

Pertencente à família *Polyomaviridae*, são vírus sem envólucro, de 40 a 45 nm de diâmetro com um genoma de DNA de cadeia dupla, de aproximadamente 5 Kb com três regiões funcionais: a região inicial que codifica proteínas da cápside viral (TAg e tAg), a região tardia que codifica proteínas do envólucro viral (VP1 a VP3), e a região de controle não codificado (NCCR – do inglês, *non-coding control region*) que contém a origem da replicação do DNA e elementos promotores e controladores da transcrição⁴⁹⁻⁵². Estão descritas mais de 30 espécies, sendo que destas cerca de 10 podem infectar humanos, tal com o JC polyomavírus (JCPyV) e BK polyomavírus (BKPyV) que são os mais prevalentes, causando leucoencefalopatia multifocal progressiva e nefropatia ou cistite hemorrágica, respectivamente^{11,12,49-51}. A maioria da população tem contato com estes vírus durante a infância, causando uma infecção em que os sintomas são escassos ou até mesmo inexistentes. Estes vírus permanecem latentes até idade adulta, na qual podem originar complicações em casos de imunodepressão, por exemplo, em doentes transplantados ou portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV – do inglês, *human immunodeficiency virus*)^{51,53}.

Os betapolyomavírus (figura 1.11) podem ser excretados na ordem das 10^5 cópias de genoma/mL de urina, onde diversos estudos demonstraram que estes vírus são prevalentes em AR's e outros ambientes aquáticos sem sazonalidade^{12,50}. A transmissão de JCPyV e BKPyV pode ser via fecal-oral, respiratória, transfusões de sangue, transplantes de órgãos, transplacentária ou através de fluido seminal^{49,51}.

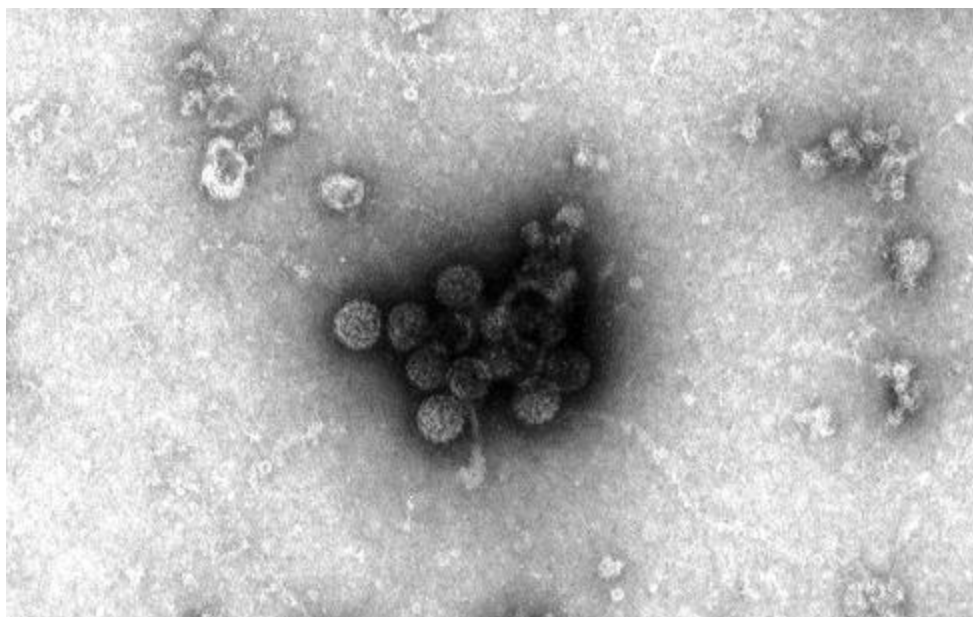


Figura 1.11 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de partículas virais de Polyomavírus. (Goldsmith & Miller, 2009 [48]).

1.3. Métodos de concentração e extração de partículas virais

Os vírus geralmente estão presentes em baixas concentrações nas amostras de águas ambientais, sendo necessário concentrá-los em menores volumes, de forma a aumentar a sensibilidade dos posteriores ensaios, essencialmente na sua detecção e quantificação. Diversos métodos de concentração viral foram desenvolvidos e aplicados em diversos tipos de águas ambientais, contribuindo para uma melhor detecção dos ácidos nucleicos virais em ensaios moleculares⁵⁴⁻⁵⁶.

A concentração viral varia consoante o tipo de água, por exemplo: em AR's, as partículas virais podem ser detetadas em altas concentrações a partir de pequenos volumes (<100 mL), enquanto que em água potável são necessários maiores volumes (10-1000 L ou mais) devido a estas estarem em concentrações mais baixas. A qualidade da água e o volume da amostra são fatores que afetam a eficiência das técnicas de concentração e posteriormente, as técnicas moleculares de detecção viral. Cada técnica apresenta eficiências diferentes consoante os vírus a concentrar, sendo essencial determinar qual a melhor técnica para cada tipo de amostra de forma a se obter a melhor concentração possível, tendo em conta que nenhuma técnica é totalmente eficaz⁵⁵.

Existem diversos métodos de concentração de partículas virais em amostras de água tais como: adsorção e eluição, ultracentrifugação, floculação orgânica com leite em pó (SMF - do inglês, *skimmed milk flocculation*) e precipitação com polietileno glicol (PEG)^{24,55,57}. No entanto, para os objetivos da presente dissertação irá ser abordado o método de concentração por floculação orgânica com leite em pó, que foi o método selecionado para o desenvolvimento do presente trabalho.

O método de concentração por floculação orgânica é eficiente e de baixo custo, sendo um protocolo simples e reprodutível, permitindo processar grandes volumes de amostras. Este consiste na floculação das partículas virais através da acidificação da água (pH 3,5) e adição do leite em pó sendo empregue em diversas matrizes de águas ambientais demonstrando boas recuperações^{55,56}.

Posteriormente à concentração das partículas virais segue-se a extração dos ácidos nucleicos virais. Estes métodos são normalmente sistemas comerciais pois permitem a reprodutibilidade e qualidade de laboratório para laboratório, e providenciam uma eficiente remoção de inibidores para posterior detecção e quantificação molecular⁵⁸. Iniciam-se com uma lise da cápside, seguido de uma

remoção de proteínas, resíduos celulares e polissacarídeos e uma purificação pelo sistema coluna/filtro, esferas magnéticas, ou por precipitação. A escolha do sistema comercial é determinante nos resultados finais, dado que uns favorecem a extração de RNA, tratando os ácidos nucleicos extraídos com a proteína DNase que degrada o DNA, e outros favorecem a extração de DNA onde se utiliza RNases que degradam o RNA²².

1.4. Detecção viral em águas residuais

Os métodos de deteção de vírus entéricos em amostras ambientais requerem precisão e especificidade, sendo os mais utilizados o método clássico por propagação em cultura de células, e os métodos moleculares para a deteção dos genomas virais alvo por técnicas de biologia molecular⁵⁹.

1.4.1. Método clássico

O método clássico para a deteção de vírus é a cultura celular na qual se utiliza células do tecido de interesse ou uma linha celular, sendo propagadas num ambiente favorável, que permite a sua multiplicação^{23,60}.

A principal limitação deste método deve-se ao facto de certos vírus não serem cultiváveis e da sua vagarosidade na obtenção de resultados, o que impossibilita a aplicação para avaliação da qualidade microbiológica das AR's numa ETAR^{28,61-64}.

1.4.2. Técnicas moleculares de amplificação de sequências genómicas virais

As evoluções nas tecnologias moleculares trazem inúmeras possibilidades à virologia. As sequências genómicas têm sido amplificadas e sequenciadas surgindo novas formas de identificar e caraterizar os vírus⁶⁵.

Na década de 80, Kary Mullis desenvolveu a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *polymerase chain reaction*) que permite a amplificação de sequências específicas de DNA, no que resulta num grande número de cópias idênticas e que serão posteriormente submetidos a eletroforese em gel de agarose na presença de um corante intercalador e detetados por irradiação de luz UV⁶⁶⁻⁷⁰.

Atualmente recorre-se, em regra geral a protocolos de amplificação de fragmentos do genoma para analisar, caraterizar e detetar novos vírus, ainda que seja possível a amplificação total. Existem dois principais tipos de protocolos: as amplificações dirigidas e as não-dirigidas que são dependentes ou não de um conhecimento *à priori* das sequências virais a amplificar⁷¹.

1.4.2.1. Amplificações dirigidas

As amplificações dirigidas baseiam-se na técnica de PCR, demonstrada na figura 1.12. Esta inclui a desnaturação do DNA, a hibridação de duas sequências oligonucleotídicas iniciadores da reação de polimerase ou *primers* (direto e complementar reverso), tendo em conta as suas temperaturas de desnaturação que devem ser semelhantes para a formação de complexos estáveis aos alvos complementares; e a sua extensão por ação da polimerase de DNA termoestável, através de

determinados ciclos de temperatura que dependem da quantidade de sequência alvo e da eficiência da reação⁶⁶⁻⁶⁹.

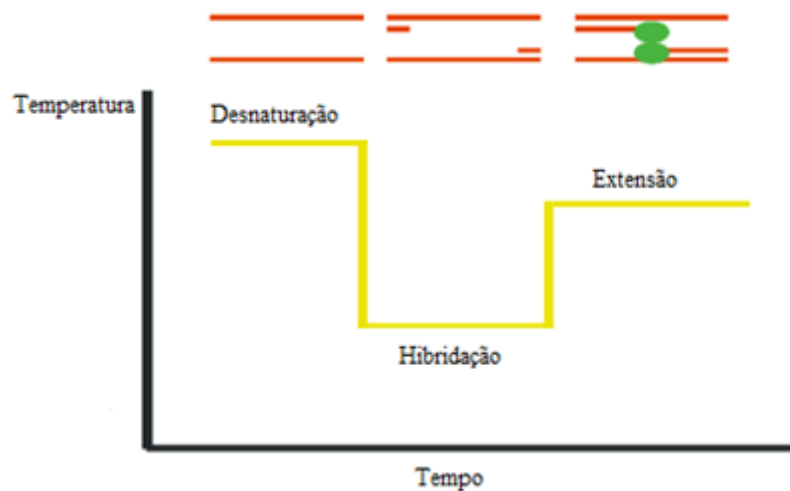


Figura 1.12 - Esquema da técnica PCR. (adaptado de Kubista *et al.*, 2006 [68]).

Este tipo de protocolo contém derivações, nomeadamente: PCR associado à reação de transcrição reversa (RT-PCR – do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction*) e PCR em tempo real (qPCR – do inglês, *polymerase chain reaction quantitative real time*), sendo estas as mais utilizadas na detecção e quantificação de segmentos específicos dos genomas virais em amostras de água devido à rapidez de execução, alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade^{8,24,55,64,68,69}.

A técnica RT-PCR recorre à transcrição reversa, ou seja, a enzima transcriptase reversa sintetiza DNA complementar (cDNA) a partir do molde de RNA que, posteriormente possibilita a amplificação através do protocolo da PCR^{69,72}.

A técnica qPCR é uma das mais utilizada para a detecção de vírus entéricos pois possibilita amplificar e detetar ou quantificar o produto simultaneamente e em tempo real através de fluorescência detetada por um termociclador com um *software* que extrapola os dados⁷³⁻⁷⁶. De forma a obter a melhor eficiência possível, a seleção da região de hibridação dos *primers* para amplificação de uma sequência específica deve resultar em fragmentos pequenos, idealmente, entre 50 a 150 bp (do inglês, *base pair*)⁷⁵. A reação inicia-se com fraco sinal de fluorescência, indistinguível do *background* contudo à medida que ocorre a desnaturação das cadeias de DNA e hibridação de *primers* que resultam na síntese dos produtos mediado pela polimerase, surge a detecção de fluorescência - *threshold cycle* (Ct) - e conforme o aumento de produtos sintetizados, aumenta a detecção de fluorescência exponencialmente - fase exponencial - até surgir a fase *plateau*, caracterizado pela estabilização do sinal derivado à limitação dos reagentes, inativação da polimerase, ou redução da eficiência da desnaturação, figura 1.13^{67,68,77-80}.

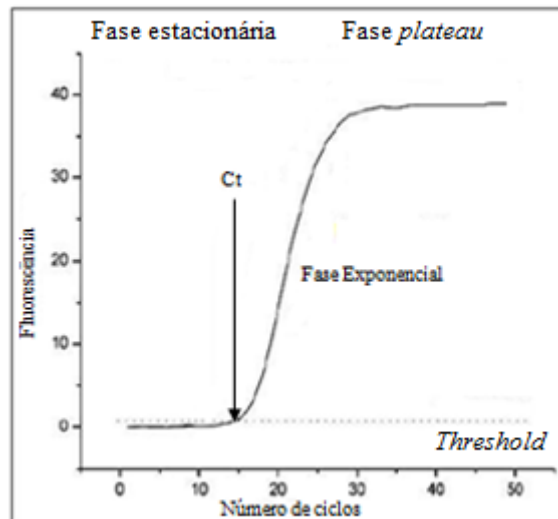


Figura 1.13 - Representação gráfica das fases da reação de qPCR. Ct – interseção da curva de amplificação da amostra com o *threshold* (adaptado de Kubista *et al.*, 2006 [68]).

Este tipo de método utiliza sondas, nomeadamente sondas *TaqMan* (5' Nuclease)⁷⁵. Estas detetam o produto amplificado de uma determinada sequência através da fluorescência gerada na amplificação, uma vez que são constituídas por uma molécula *reporter* na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade oposta 3'^{70,75,81-85}. Quando a sonda se liga à cadeia alvo complementar de DNA, o corante sofre uma transferência de energia de ressonância por fluorescência devido à proximidade física (FRET – do inglês, *fluorescence resonance energy transfer*), em que o *reporter* emite energia proporcionalmente à quantidade de DNA que está a ser amplificado para o *quencher* que a dissipa sob forma de calor^{75-77,81,82,86}. A deteção de amplificação é possível devido à clivagem das sondas marcadas com o *reporter* à sequência alvo a amplificar, pela atividade exonucleásica da DNA polimerase que provoca a interrupção do FRET^{75,77,81-83,85,87}.

A quantificação dos produtos resultantes da qPCR pode ser realizada de diversas formas. De acordo com os objetivos desta dissertação, aborda-se a quantificação absoluta que determina o número de cópias de DNA, essencialmente através do método da curva padrão, ou seja, uma representação gráfica previamente construída a partir de amostras com concentração conhecida e que por extrapolação determina-se a concentração inicial de uma amostra de concentração desconhecida (figura 1.14)^{69,75}.

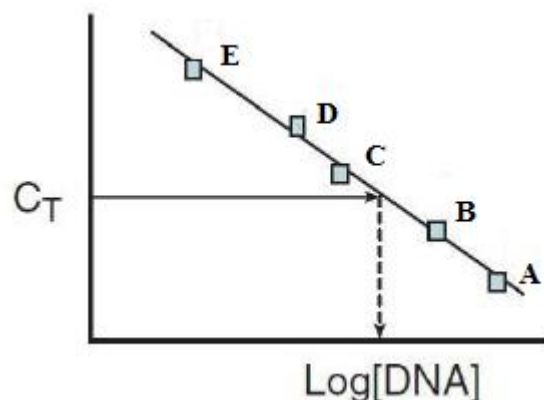


Figura 1.14 - Gráfico da curva padrão com concentrações de DNA conhecidas nos pontos de A - E. (adaptado de Butler, 2005 [88]).

Contudo estas técnicas baseadas em biologia molecular aplicadas a águas podem apresentar algumas limitações, tais como: a incapacidade de distinguir partículas virais viáveis ou infecciosas de inativas ou mortas, suscetibilidade a diversos inibidores normalmente presentes neste tipo de amostras de água, obtenção de resultados falsos positivos originados por contaminações, e a dependência da hibridação de *primers* ao alvo complementar que requer um conhecimento *à priori* das sequências a amplificar, o que impede detectar genomas virais que não estejam descritos^{8,19,22,55,89}.

1.4.2.2. Amplificações não dirigidas

As amplificações não-dirigidas permitem detectar novos vírus, uma vez que não requerem um conhecimento *à priori* das sequências a amplificar, o que permite a evolução da metagenômica^{65,71,89-91}.

Nos últimos anos uma das metodologias mais utilizadas para identificação de novos vírus em amostras ambientais, é a sequenciação de próxima geração (NGS – do inglês, *next generation sequencing*), sendo uma sequenciação de alto rendimento, que gera milhões de sequências simultaneamente a partir de uma amostra^{65,91-94}. Existem diversos equipamentos de sequenciação, mas nesta dissertação é apenas referenciado o *Miseq*, comercializado pela *Illumina, Inc.* sendo um dos equipamentos mais utilizados pelo seu reduzido custo, em comparação com as outras plataformas, rapidez, eficácia e alto rendimento⁹⁵.

Na presente dissertação para detectar o DNA ou RNA viral recorreu-se à técnica denominada de SISPA (do inglês – *Sequence-Independent Single Primer Amplification*)⁷¹. Nesta técnica é necessário um enriquecimento viral da amostra, na qual se combina métodos de filtração, deposição das partículas virais por ultracentrifugação e (eventualmente) purificação através de gradiente de densidade e digestão enzimática de ácidos nucleicos usando DNases e RNases, caso não possuam cápside⁹⁰. Perante genomas de RNA, é necessário converter as sequências virais em cDNA com uso de *primers* de sequência definida, associada a uma sequência de 6 a 8 bp degeneradas no extremo 3' ou em que esse extremo traduza uma região com múltiplos nucleótidos de desoxitimidina, o que possibilita uma hibridação dos *primers* a RNA's caudas de poly-A. A segunda cadeia de DNA é sintetizada mediante a utilização de uma polimerase parcialmente desprovida de atividade exonucleásica na presença dos *primers* anteriormente mencionados. Posteriormente, a dupla cadeia de DNA é amplificada por PCR com recurso de um *primer* complementar à região definida dos *primers* utilizados⁹⁶. A técnica possibilita identificar genomas virais desconhecidos presentes em qualquer amostra biológica em quantidades limitadas⁹⁷. Contudo, a identificação das sequências virais pode ser dificultada caso haja a presença de ácidos nucleicos contaminantes, pois estas podem ser amplificadas, o que proporciona dificuldades na identificação das sequências virais⁹⁰.

Tendo em conta esta contextualização, é imperativo assumir a metagenômica como uma ferramenta poderosa com inúmeras possibilidades aplicadas em virologia, essencialmente por NGS, tornando possível identificar novos vírus^{65,71,93}.

1.5. Objetivos

Estudos recentes demonstram que os métodos de tratamentos convencionais utilizados nas ETAR's não são eficazes na remoção dos vírus mais resistentes, e que a avaliação da qualidade microbiológica das AR's é realizada com recurso a microrganismos indicadores, sendo o mais comumente usado para a indicação de poluição fecal, os coliformes fecais, como por exemplo: *Escherichia coli*, da família *Enterobacteriaceae*, que não são os adequados para a deteção da presença/concentração de partículas virais^{4,6,9,11,14,56,64}.

Desta forma, este estudo teve como principal objetivo detetar e quantificar a existência de vírus presentes em amostras de água residual colhidas em diferentes pontos de duas ETAR'S de Lisboa, através de técnicas moleculares de amplificação dirigida (qPCR) e amplificação não-dirigida (NGS) de sequências genómicas virais. Para tal, foram propostos quatro objetivos específicos:

1. otimização da técnica de recuperação e concentração de partículas virais da matriz água;
2. otimização da extração de ácidos nucleicos virais (RNA e DNA);
3. otimização das técnicas moleculares de amplificação dirigida (*duplex* qPCR's);
4. caracterização do viroma através de metodologias não-dirigidas (NGS).

Este estudo irá providenciar ferramentas moleculares rápidas e eficazes para avaliar a eficiência dos tratamentos convencionais utilizados pelas ETAR's no que diz respeito à inativação/eliminação de vírus entéricos patogénicos humanos. Permitirá também monitorizar o viroma presente ao longo das duas ETAR's, de forma a melhor se compreender a variação e persistência deste em todo o processo de tratamento de águas residuais urbanas.

2. Material e métodos

2.1. Caracterização das estações de tratamento de águas residuais em estudo e recolha de amostras de água residual

As ETAR's selecionadas para o estudo estão localizadas no distrito de Lisboa e possuem as características descritas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Características das Estações de tratamento de água residual analisadas. UV - Ultravioleta (adaptado de Rodrigues, 2015 [⁹⁸]).

ETAR	Equivalente populacional (habitantes)	Tipo de água residual	Pontos de descarga	Fluxo médio (m ³ /dia)	Tipo de tratamento	Tratamento biológico
X	756 000	Doméstico	Rio Tejo	140 000	Terciário com UV	Biofiltração
Y	255 000	Doméstico e industrial	Rio Tejo	50 000	Terciário com UV	Lamas ativadas

As amostras de AR foram recolhidas em duas alturas diferentes do ano: Outono de 2018 (Outubro) e Primavera de 2019 (Abril), sendo recolhido 1 L do influente inicial, 5 L do efluente após o tratamento secundário (figura 2.1), e 10 L do efluente descarregado no rio Tejo e do efluente após o tratamento terciário, que consiste na AR reutilizável. Todas as amostras foram recolhidas em triplicados, e em bidões de 20 L de plástico estéril e transportadas imediatamente para o laboratório, sendo mantidas a 4 °C até serem processadas no máximo até 12h após a colheita.



Figura 2.1 - Recolha do efluente após o tratamento secundário na ETAR X. (Fotografia do autor).

2.2. Concentração de partículas virais por floculação orgânica

2.2.1. Preparação da solução de leite em pó para floculação

Para a solução pré-floculada de leite em pó (1% (m/v)) foi dissolvido 10 g de leite em pó (Conda Pronadisa, Madrid, Espanha), em 1 L de água do mar artificial (Sigma Aldrich Quimica GMBH, Sintra, Portugal), sendo o pH ajustado para 3,5 com HCL a 1M.

2.2.2. Floculação orgânica

Foram adicionados 10 mL e 100 mL da solução anterior às amostras de AR de 1 L e 10 L, respetivamente (concentração final de leite em pó a 0,01% (m/v)), e o pH foi ajustado para 3,5 com HCL 1 M. Posteriormente, as amostras de AR ficaram sob agitação constante durante 8 h à temperatura ambiente (figura 2.2), e mais 8 h sem agitação para a sedimentação dos flocos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos através de uma bomba de vácuo de forma a não perturbar o sedimento. Este sedimento (cerca de 500 mL) foi então transferido para um frasco de centrifugação e concentrado por centrifugação a 5500 RCF por 45 minutos a 12 °C na centrífuga J-26 Avanti® XPI Beckman Coulter. De seguida, o sobrenadante foi rejeitado e o concentrado, onde se encontram as partículas virais, foi ressuspenso em 8 mL de tampão fosfato 0,2 M com pH a 7,5 (1:2 (v/v) mistura de 0,2 M Na_2HPO_4 e 0,2 M NaH_2PO_4). O concentrado foi guardado a -20 °C até posterior utilização.



Figura 2.2 - Floculação com leite em pó – amostras de AR sob agitação constante durante 8 h. (Fotografia do autor).

2.3. Detecção e quantificação dos genomas virais alvo por protocolos qPCR *TaqMan*

Para o presente estudo foram selecionados fragmentos correspondentes a seis genes virais, de acordo com a sua importância clínica na saúde pública e distribuição mundial. Através de colaborações estabelecidas com o Laboratório *Cell Line Development and Molecular Biotechnology* do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (Doutora Ana Coroadinha) e com o Laboratório *Environment, Reaction, Separation and Thermodynamics* da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (Doutora Ana Miguel Matos), foi possível obter DNA de Adenovírus (AdV) serotipo V, e de JC Polyomavírus (JCPyV). Em relação aos restantes controlos uma vez que se tratava de vírus com genomas de RNA, cuja estabilidade é reduzida, optou-se por sintetizar fragmentos do gene que codifica a junção ORF1/ORF2 para NoV GI, NoV GII e HEV, e do gene que codifica a região 5' região não codificada (5'NCR – do inglês, *5' noncoding region*) para HAV em plasmídeos recombinantes fabricados pela NZYTech (Portugal).

A deteção e quantificação dos genomas de AdV e PyV foi efetuada através de um protocolo *duplex qPCR TaqMan* otimizado durante o desenvolvimento da presente dissertação, enquanto que os genomas de NoV GI, NoV GII, HAV e HEV foram detetados e quantificados através de um protocolo *tetraplex qPCR TaqMan*, otimizado no âmbito de outro estudo da equipa.

2.3.1. Extração de ácidos nucleicos a partir dos concentrados virais

A extração de ácidos nucleicos virais foi efetuada a partir de 140 µL do concentrado obtido na etapa 2.2.2, através do sistema comercial *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN®, Izasa, Carnaxide, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante (protocolo em anexo I). Em resumo, cada amostra foi lisada sob condições desnaturantes para inativar RNases e garantir o isolamento do RNA viral. As condições dos vários tampões foram ajustadas de modo a permitir a ligação do RNA à membrana da coluna de extração. Após esta ligação, os contaminantes foram removidos em duas etapas com diferentes tampões de lavagem, e o RNA foi eluído num tampão *RNase free*, ficando limpo de proteínas, nucleases, e outros contaminantes e inibidores. O RNA extraído foi depois quantificado no espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) e guardado a -80 °C até posterior utilização.

Nota: Uma vez que não foi realizado o tratamento com DNase, no final da extração foi eluído não só o RNA viral, como também o DNA viral. Ao contrário das amostras colhidas no Outono, às amostras colhidas na Primavera não se adicionou RNA *carrier*. Este reagente tem como função aumentar o rendimento de RNA extraído, principalmente em amostras com baixas concentrações de RNA.

2.3.2. Síntese de cDNA por RT-PCR a partir de RNA

A síntese de cDNA a partir do RNA viral extraído em 2.3.1 foi realizada com recurso ao sistema comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Assim, a 10 µL de RNA viral extraído foram adicionados 10 µL de mistura de transcrição reversa contendo 2 µL de tampão de transcrição reversa (concentrado 10x), 0,8 µL de dNTPs concentrados a 10 mM, 2 µL de hexâmeros aleatórios (*primers* de sequência aleatória), 1 µL de transcriptase reversa *MultiScribe™* e 4,2 µL de água livre de nucleases, perfazendo um total de 20 µL.

As misturas de reação foram suavemente agitadas e colocadas num termociclador VWR-Doppio, em que o perfil térmico programado inclui um passo de hibridação a 25 °C por 10 minutos, extensão dos *primers* hibridados a 37 °C durante 120 minutos, e inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min. O cDNA obtido foi depois quantificado usando o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) e armazenado a -20 °C até posterior utilização no qPCR.

2.3.3. Preparação e otimização das curvas padrão para o *multiplex TaqMan* qPCR

2.3.3.1. Amplificação de DNA genômico de AdV e PyV por PCR

Para gerar as curvas padrão para cada ensaio de qPCR foram amplificados fragmentos de genes de interesse de regiões conservadas por PCR convencional. As sequências de *primers* utilizadas, ilustradas na tabela 2.2, foram desenhadas *ex novo* para o presente estudo. Para a PCR cada reação de 25 µL continha 12,5 µL de *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYTech), 500 nM de cada *primers forward* e *reverse*, 2 µL de DNA molde e 8,5 µL de água livre de nucleases. Os controlos negativos corresponderam a reações em que o volume de DNA molde foi substituído por água livre de nucleases.

Tabela 2.2 - *Primers* utilizados para amplificação de sequências genômicas virais em estudo. AdV – Adenovírus; PyV – Polyomavírus.

Designação dos <i>primers</i>	Sequência (5' – 3')	Referência	Posição nucleotídica
AdV <i>Primer forward</i>	GCTGCCAACAGC GCGCTACC	<i>Made in house</i>	15958 - 15977 (genoma referência com o número de acesso MK836309)
AdV <i>Primer reverse</i>	GACACTGTCTCCA CGGCCGG	<i>Made in house</i>	18368 - 18387 (genoma referência com o número de acesso MK836309)
PyV <i>Primer forward</i>	GATGGTTAAAGT GATTTGGCTG	<i>Made in house</i>	3709 - 3730 (genoma número de acesso MN164516)
PyV <i>Primer reverse</i>	TGCTATTGCTTTG ATTGCTTCA	<i>Made in house</i>	4578 - 4599 (genoma referência com o número de acesso MN164516)

As reações de amplificação foram efetuadas no mesmo termociclador VWR-Doppio. Para a amplificação da sequência genômica de AdV utilizou-se um protocolo base que incluiu um passo inicial de desnaturação a 94 °C durante 5 minutos, seguindo-se 35 ciclos com uma etapa de desnaturação a 94 °C por 30 s, uma etapa de hibridação dos *primers* a 63 °C durante 1 minuto, e uma etapa de extensão dos *primers* hibridados a 72 °C por 45 s. Por fim, foi efetuado um passo de extensão final de 72 °C por 5 minutos. A reação de amplificação da sequência genômica de PyV incluiu um passo inicial de desnaturação a 95 °C durante 3 minutos, seguindo-se 35 ciclos com uma etapa de desnaturação a 94 °C por 30 s, uma etapa de hibridação dos *primers* a 52 °C durante 30 s e uma etapa de extensão dos *primers* hibridados a 72 °C por 30 s. Por fim, efetuou-se uma etapa de extensão final de 72 °C por 5 minutos.

2.3.3.1.1. Análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose

Com o objetivo de verificar a correta amplificação do fragmento do gene de interesse, os produtos de PCR foram corridos por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Assim, o gel foi preparado por dissolução de 1,5 g de agarose *electrophoresis grade* (NZYTech) em 100 mL de tampão TAE (40 mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0), ao qual se adicionou 2 µL de *GreenSafe Premium* (NZYTech) que permite a visualização dos fragmentos de DNA quando submetidos a luz Ultravioleta (UV). Após a polimerização o gel foi colocado na tina de eletroforese com tampão TAE 1x, tendo sido aplicados 5 µL do produto de PCR de cada amostra. Paralelamente com as amostras, utilizou-se um marcador molecular de 100 bp (NZYTech). Por fim, aplicou-se uma corrente elétrica de 100 V durante 40 min. A visualização dos produtos de amplificação no gel efetuou-se sob iluminação UV, no Gel-Doc EZ (Bio-Rad). De seguida, determinou-se a concentração e pureza dos produtos de amplificação no espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

2.3.3.2. Purificação dos produtos de amplificação por PCR

Os produtos de PCR foram purificados pelo sistema comercial *NZYGelpure kit* (NZYTech) de acordo com as indicações do fabricante (protocolo em anexo II). Resumidamente, aos produtos de amplificação obtidos em 2.3.3.1 foi adicionada 5x o volume inicial de solução de ligação. Após um *short spin* colocou-se a mistura num sistema coluna/filtro e efetuaram-se dois passos de lavagem com uma solução à base de etanol (*washing buffer*). Por fim o DNA purificado foi eluído da coluna com 50 µL de solução de eluição (pré-aquecida a 55 °C). Os produtos de amplificação purificados foram visualizados num gel de agarose a 1,5%, nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, determinou-se a concentração e pureza no espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Os produtos de PCR purificados foram armazenados a -20 °C até posterior utilização.

2.3.3.3. Clonagem molecular

Os produtos de PCR purificados no passo anterior foram clonados no vetor disponibilizado comercialmente, designado *pGEM®-T Easy* (Promega), ilustrado na figura 2.3 que recorre ao plasmídeo da bactéria *Escherichia coli* como hospedeiro, de forma linearizada que inclui resíduos de nucleótidos de timidina na extremo 3', o que potencia a eficiência da ligação entre moléculas de vetor e insertos com extensões 3' adeniladas, prevenindo a recircularização do vetor.

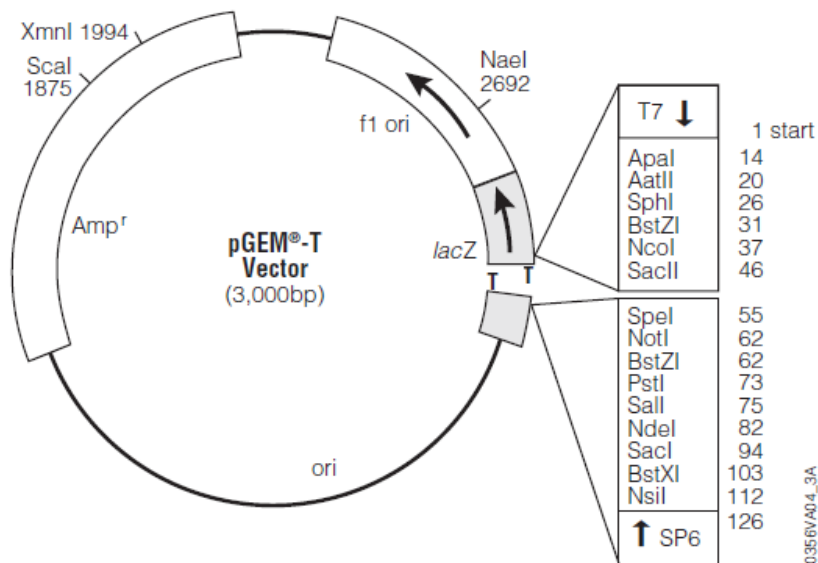


Figura 2.3 - Esquema representativo do vetor plasmídico *pGEM®-T Easy*. (<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf> [99]).

Este vetor contém uma origem de replicação e um marcador de seleção (gene *bla*) que codifica a enzima (β -lactamase) que catalisa a hidrólise do anel β -lactâmico da ampicilina, o que proporciona resistência das bactérias à ampicilina. O gene *lacZ* que codifica o péptido α da enzima β -galactosidase contém sequências de nucleótidos correspondentes a locais de clivagem com enzimas de restrição, designado sítio de clonagem múltipla, flanqueado por promotores de transcrição dos fagos T7 e SP6. A IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) promove a expressão da proteína, o que inativa a proteína repressora LacI, o que provoca a incapacidade de ligação ao promotor da transcrição de *lacZ*. Caso, haja interrupção da sequência deste gene surge a expressão de β -galactosidase ativa, derivado à complementação das frações da β -galactosidase expressas a partir do DNA plasmídico e cromossômico bacteriano (fragmento ω), que hidrolisa X-gal (5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) e assim proporcionar a identificação de colônias azuis. Caso o plasmídeo contenha o fragmento de DNA exógeno, é interrompida a sequência do gene em causa provocando a incapacidade de expressão de β -galactosidase ativa, e hidrolisando o X-gal, o que permite a visualização de colônias brancas.

2.3.3.3.1. Obtenção de células *Escherichia coli* competentes e sua transformação

Para obtenção de células *E. coli* competentes para introdução do DNA exógeno foi preparada uma cultura saturada de *One Shot Chemically Competent E. coli TOP10 Ultracomp™ Cells* (Invitrogen). Para a ligação do DNA ao vetor foram testadas diversas proporções de inserto/vetor, compreendidas entre 1/8 e 10/1, de forma a selecionar a melhor razão molar da concentração de vetor e do fragmento a inserir. As misturas de ligação continham até 10 μ L de diversos reagentes descritos detalhadamente na tabela 2.3 e foram incubadas *overnight* a 4 °C até à sua utilização para a transformação de células bacterianas competentes.

Tabela 2.3 - Reagentes e volumes utilizados para ligação de DNA ao vetor *pGEM®-T Easy* (Promega).

Reagentes	Volume (µL)
<i>2X Rapid Ligation Buffer</i>	5
<i>pGEM®-T Easy Vector (50ng)</i>	1
Produto de PCR purificado	1 (Proporção 1/1)
DNA ligase do fago T4	1
Água livre de nucleases	2

Para iniciar a transformação de células bacterianas competentes realizou-se um *short spin* à mistura de ligação e utilizou-se 2 µL adicionados a 25 µL do sedimento celular. Agitou-se cuidadosamente a mistura e incubou-se durante 30 minutos em gelo. De seguida, as amostras sofreram um choque térmico tendo sido colocadas em banho maria a 42 °C durante 30 s e seguidamente em gelo durante 2 min. Foi adicionado 125 µL de meio *Super Optimal Broth* (SOB), disponibilizado pelo sistema comercial. A suspensão bacteriana foi incubada a 37 °C, durante 1h 30, com agitação a 225 rpm. Por fim, inoculou-se por sementeira 100 µL da suspensão bacteriana às placas de Petri com meio líquido LB (Lúria-Bertani) sólido suplementado com X-gal (40 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL). O plaqueamento foi realizado com auxílio de um espalhador estéril e as placas de Petri incubadas *overnight*, a 37 °C para obtenção de colónias.

As culturas de *E.coli* que não foram utilizadas, foram armazenadas e conservadas em *stocks* de glicerol, a -80 °C.

2.3.3.4. Extração de DNA plasmídico

A extração do DNA plasmídico foi realizada pelo sistema comercial *NZYMiniprep kit* (NZYTech), de acordo com as instruções do fabricante. Transferiu-se 1,5 mL da cultura de *E. coli* crescida em meio LB líquido suplementado com ampicilina (100 µg/mL) em tubos Eppendorf® de 1,5 mL e centrifugou-se durante 30 s a 12600 rpm. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 250 µL de solução A1 (tampão com RNase) e agitou-se vigorosamente no vórtex. Adicionou-se 250 µL de solução A2 (lise alcalina), agitou-se invertendo a solução até 8 vezes e incubou-se a solução à temperatura ambiente durante 4 min. Adicionou-se 300 µL de solução A3, repetiu-se o passo da agitação e centrifugou-se a 12600 rpm durante 10 min. Colocou-se a coluna num tubo de recolha de 2 mL, adicionou-se o sobrenadante resultante da centrifugação e centrifugou-se a 11000 RCF durante 1 minuto e descartando o eluído. Adicionou-se 500 µL de solução AY (pré-aquecida a 50 °C), centrifugou-se a 12600 rpm durante 1 minuto e descartou-se o eluído. Adicionou-se 600 µL de solução A4 (contém etanol), e repetiu-se o passo da centrifugação e tendo-se descartado o eluído. Colocou-se a coluna num novo tubo de recolha de 2 mL e centrifugou-se a 12500 rpm durante 2 minutos e descartou-se o eluído. Colocou-se a coluna num tubo Eppendorf® de 1,5 mL, adicionou-se 50 µL de solução de eluição no centro da coluna (pré-aquecida a 55 °C), incubou-se a temperatura ambiente durante 1 minuto e por fim centrifugou-se a 12500 rpm durante 1 min. Por fim, determinou-se a sua concentração e pureza no espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Após a obtenção do DNA plasmídico com os fragmentos de interesse para cada genoma viral em estudo, procedeu-se à otimização das curvas de padrão do PCR's quantitativo, com o objetivo de determinar a sensibilidade de cada ensaio, inicialmente em *singleplex* e posteriormente em *duplex*. Assim, através da concentração do DNA plasmídico e pelo tamanho de cada genoma viral, foi determinado o número de cópias de genoma, utilizando-se a seguinte fórmula¹⁰⁰:

$$\text{Número de cópias de genoma} = \frac{\text{concentração de DNA} \left(\frac{\text{mg}}{\mu\text{L}}\right) \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{tamanho do genoma viral} \times 1 \times 10^9 \times 650} \quad (2.1)$$

Este cálculo é baseado no pressuposto de que o peso médio de 1 bp corresponde a 650 Da, ou seja, uma mole de 1 bp pesa 650 g e que o peso molecular de qualquer molécula de DNA de cadeia dupla pode ser estimado através do produto do seu comprimento (em bp).

Seguidamente efetuaram-se diluições seriadas destes DNA's plasmídicos, variando entre 10^6 a 1 cópia de genoma/ μL .

2.3.4. Desenvolvimento e otimização das reações de *TaqMan* qPCR em *multiplex*

2.3.4.1. Desenvolvimento e otimização do protocolo *duplex* qPCR *TaqMan* para deteção dos genomas virais de AdV e PyV

Para deteção e quantificação das partículas virais em estudo nas respetivas amostras de AR, foi otimizado o protocolo de *TaqMan* qPCR em *duplex* dirigido aos genomas de AdV e PyV, de acordo com as diretrizes do *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*¹⁰¹.

Para cada qPCR foram utilizados *primers* e sondas marcadas com fluoróforos de acordo com a tabela 2.4. As sequências dos *primers* e das sondas foram desenhadas *ex novo* para o presente estudo. Para tal, foram efetuados múltiplos alinhamentos de sequências de referência disponibilizadas na base de dados do *GenBank* para cada gene alvo, utilizando-se o *software* Mafft 7. Posteriormente as sequências selecionadas foram avaliadas através da combinação de várias ferramentas informáticas, nomeadamente o *Multiple Primer Analyzer* (Thermo Fisher Scientific) e o *PrimerBlast*. As respetivas sequências quer dos *primers* quer das sondas, foram sintetizados pelas empresas Eurofins Genomics (Alemanha) e Stabvida (Portugal).

Tabela 2.4 - Sequências de *primers* e sondas utilizados para os protocolos de *duplex* qPCR *TaqMan*. **AdV** – Adenovírus; **PyV** – Polyomavírus.

Designação dos <i>primers</i> /sondas	Sequência (5' – 3')	Referência	Posição nucleótida
<i>Primer forward</i> AdV	CGGCGGTATCCTGCCCTC C	Rodriguez <i>et al.</i> , 2013 [¹⁰²]	16168 - 16187 (genoma referência com o número de acesso MN628615)
<i>Primer reverse</i> AdV	GGACTCTCAGCTCGCTTG	<i>Made in house</i>	16307 - 16325 (genoma referência com o número de acesso MN628615)
Sonda AdV	[HEX]TTGCATCCGTGGCCT TGACGGCGCA[BHQ1]	Rodriguez <i>et al.</i> , 2013 [¹⁰²]	16230 - 16254 (genoma referência com o número de acesso MN628615)
<i>Primer forward</i> PyV	CAGGAAAGTCTTTAGGGT CTTCTACC	<i>Made in house</i>	4240 - 4265 (genoma referência com o número de acesso MN154516)
<i>Primer reverse</i> PyV	AGGTGCCAACCTATGGAA CAGAT	<i>Made in house</i>	4397 - 4419 genoma referência com o número de acesso MN154516)
Sonda PyV	[FAM]AGGATCCCATCACT CTACCCACCT[BHQ1]	<i>Made in house</i>	4280 - 4304 genoma referência com o número de acesso MN154516)

Inicialmente o ensaio de qPCR foi otimizado em *singleplex*, onde cada reação continha 10 µL de 2x *SensiFAST™ Probe No-Rox Mix* (Bioline), 2 µL de DNA plasmídico (20 a 40 ng), concentrações variáveis de cada *primers forward* e *reverse*, sondas e de água livre de nucleases, de forma a perfazer 20 µL. O modo de preparação dos controlos negativos foi semelhante ao descrito no tópico 2.3.3.1.

Assim, para cada *singleplex*, as concentrações de cada *primers forward* e *reverse* variaram entre 100 nM a 500 nM e as concentrações da cada sonda entre 100 nM a 250 nM, sendo que as concentrações finais encontram-se na tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Concentrações finais usadas para a quantificação de genomas virais por qPCR *singleplex* dirigido para aos genomas alvo: **AdV** – Adenovírus e **PyV** – Polyomavírus.

Reagentes	Concentração molar (nM)
<i>Primer forward</i> AdV	300
<i>Primer reverse</i> AdV	300
Sonda AdV	100
<i>Primer forward</i> PyV	300
<i>Primer reverse</i> PyV	300
Sonda PyV	100

O programa de qPCR aplicado para cada *singleplex* foi o aconselhado na ficha informativa da mistura de qPCR comercial *SensiFAST™ Probe No-Rox*, nomeadamente: desnaturação inicial a 95 °C, por 5 minutos, seguido de 40 ciclos incluindo uma etapa de desnaturação rápida entre 95 °C, por 10 s e uma etapa de hibridação compreendida de 60 °C durante 30 s.

Após otimização de cada qPCR em *singleplex*, procedeu-se à otimização do *duplex* qPCR, tendo sido testado as mesmas concentrações de *primers* e sondas e o mesmo programa de qPCR de cada um dos qPCR em *singleplex*.

2.3.5. Protocolo *tetraplex* qPCR *TaqMan* para deteção dos genomas virais de NoV GI, NoV GII, HAV e HEV

Para a deteção e quantificação das partículas virais em estudo nas respetivas amostras de AR, foi utilizado um protocolo de *TaqMan* qPCR em *tetraplex* dirigido aos genomas NoV GI, NoV GII, HAV e HEV, previamente otimizado no âmbito de outro estudo de acordo com as diretrizes do *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*¹⁰¹.

Para cada qPCR foram utilizados *primers* e sondas marcadas com fluoróforos de acordo com a tabela 2.6. As sequências dos *primers* e das sondas foram retiradas da literatura e sintetizados pelas empresas Eurofins Genomics (Alemanha) e Stabvida (Portugal).

Tabela 2.6 - Sequências de *primers* e sondas utilizadas para os protocolos de *tetraplex* qPCR *TaqMan*. **NoV GI** – Norovírus GI; **NoV GII** – Norovírus GII; **HAV** – Vírus da Hepatite A; **HEV** - Vírus da Hepatite E.

Designação dos <i>primers</i> /sondas	Sequência (5' – 3')	Referência	Número de acesso	Posição nucleótida
<i>Primer forward</i> NoV GI	CCATGTTCCGBTG GATGC	Ramanan <i>et al.</i> , 2017 [¹⁰³]	MK387055	191 - 208
<i>Primer reverse</i> NoV GI	CCTTAGACGCCAT CATCATTAC	Kageyama <i>et al.</i> , 2003 [¹⁰⁴]	MN186390	751 - 773
Sonda NoV GI	[FAM]AGATRGCG ATCTCCTGTCCAC A[BHQ1]	Kageyama <i>et al.</i> , 2003 [¹⁰⁴]	MN186390	716 - 737
<i>Primer forward</i> NoV GII	ATGTTYAGRTGG ATGAGATTCTC	Ramanan <i>et al.</i> , 2017 [¹⁰³]	NC_044046	4997 - 5019
<i>Primer reverse</i> NoV GII	TCGACGCCATCTT CATTCACA	Kageyama <i>et al.</i> , 2003 [¹⁰⁴]	MN210082	744 - 764
Sonda NoV GII	[HEX]TGGGAGGG CGATCGCAATCT[BHQ1]	Kageyama <i>et al.</i> , 2003 [¹⁰⁴]	NC_044047	5024 - 5043
<i>Primer forward</i> HAV	TCACCGCCGTTTG CCTAG	Costafreda <i>et al.</i> , 2006 [¹⁰⁵]	MK829707	68 - 85
<i>Primer reverse</i> HAV	GGAGAGCCCTGG AAGAAAG	Costafreda <i>et al.</i> , 2006 [¹⁰⁵]	MK829707	223 - 241
Sonda HAV	[Texas RED]GATTCCTGC AGGTTCAAGGTTT T[BHQ2]	Costafreda <i>et al.</i> , 2006 [¹⁰⁵]	MK829707	152 - 174
<i>Primer forward</i> HEV	CGGTGGTTTCTGG GGTGAC	<i>Made in house</i>	MN646695	5443-5461
<i>Primer reverse</i> HEV	AGGGGTTGGTTG GATGAATATAG	<i>Made in house</i>	MN646695	5491-5513
Sonda HEV	[FAM]GGGTTGAT TCTCAGCCCTTCG C[BHQ1]	<i>Made in house</i>	MN646695	5463-5484

O programa de qPCR compreendeu um passo de desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguindo-se 40 ciclos de desnaturação rápida a 95 °C durante 15 s, uma etapa de hibridação a 60 °C por 1 minuto numa primeira reação, e 65 °C por 1 minuto numa segunda reação. Na tabela 2.7 estão ilustradas as concentrações finais utilizadas.

Tabela 2.7 - Concentrações finais usadas para quantificação viral por qPCR *tetraplex* dirigido para os genomas alvo. **NoV GI** – Norovírus GI; **NoV GII** – Norovírus GII; **HAV** – Vírus da Hepatite A; **HEV** - Vírus da Hepatite E.

Reagentes	Concentração molar (nM)
<i>Primer forward</i> NoV GI	100
<i>Primer reverse</i> NoV GI	400
Sonda NoV GI	250
<i>Primer forward</i> NoV GII	100
<i>Primer reverse</i> NoV GII	400
Sonda NoV GII	100
<i>Primer forward</i> HAV	100
<i>Primer reverse</i> HAV	400
Sonda HAV	100
<i>Primer forward</i> HEV	100
<i>Primer reverse</i> HEV	400
Sonda HEV	100

2.4. Avaliação da comunidade viral por análise metagenômica por sequenciação de próxima geração

2.4.1. Amostras analisadas e extração do RNA viral

As mesmas amostras de 2.1 foram também processadas para avaliação por sequenciação de próxima geração. Para tal após a concentração das partículas virais por floculação orgânica (capítulo 2.2), o RNA viral foi extraído utilizando o mesmo sistema comercial descrito em 2.3.1 de acordo com as instruções do fabricante, quantificado no espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) e guardado a -80 °C até posterior utilização.

2.4.2. Sequenciação de próxima geração

Para a avaliação da comunidade viral existente nas amostras recolhidas em cada ponto de cada ETAR por sequenciação de próxima geração, foi estabelecida uma colaboração com o Laboratório de Vírus Contaminantes de Água e Alimentos do Departamento de Genética, Microbiologia e Estatística da Universidade de Barcelona. Assim, as amostras de RNA foram enviadas em gelo seco para o laboratório mencionado, onde foram preparadas as bibliotecas genômicas e realizadas as sequenciações no equipamento *Illumina Miseq* (2x300 bp). O processamento bioinformático e a classificação taxonômica das leituras das sequências obtidas foram analisados pelo *software Web Genome Detective*¹⁰⁶. Esta ferramenta tem como função identificar e classificar os vírus presentes numa amostra analisando as sequências obtidas pela plataforma *Illumina*.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização das estações de tratamento de águas residuais em estudo e recolha de amostras de águas residuais

Ambas as ETAR's em estudo pertencem ao distrito de Lisboa, e tratam águas residuais maioritariamente domésticas e hospitalares nas quais foram amostrados quatro pontos. Assim, na ETAR X os pontos amostrados foram: I) influente após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; II) efluente que segue para o rio Tejo após o tratamento secundário (biofiltração); III) efluente após passagem por um sistema de filtração por membrana; IV) efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%. No caso da ETAR Y os pontos amostrados foram: I) influente após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; II) efluente após o tratamento secundário (lama ativadas); III) efluente que segue para o rio Tejo após passagem por um filtro de areia; IV) efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%. Assim, salienta-se que no caso do efluente que vai para o Rio Tejo, existe uma diferença entre a ETAR X e a ETAR Y, sendo que na ETAR Y o efluente passa ainda por um sistema de filtração de areia e só depois é descarregado no rio, o que contribui para a descarga de uma água mais limpa com menor carga microbiana.

Mais ainda, o tratamento terciário com desinfecção por UV não estava a ser aplicado em nenhuma das ETAR's em estudo, tendo sido apenas utilizado a adição de hipoclorito de sódio a 10%. Esta alteração no método de desinfecção poderá ter consequências ao nível da eliminação/inativação dos microrganismos, nomeadamente na baixa eficiência demonstrada na remoção de parasitas e alguns vírus, que apresentam uma resistência moderada a alta a este desinfetante¹⁰⁷. Mais ainda, este desinfetante é tóxico podendo levar à formação de subprodutos, mutagénicos e/ou cancerígenos perigosos que irão ser libertados no meio ambiente¹⁰⁸.

3.2. Concentração de partículas virais por floculação orgânica

No método de concentração de partículas virais por floculação orgânica os flocos de leite em pó em meio ácido têm a particularidade de adsorver as partículas virais presentes nas amostras em estudo, aumentando o seu peso e facilitando a sua precipitação ao longo do tempo¹⁰⁹. É um método maioritariamente utilizado em amostras ambientais para detetar vírus de DNA, como rastreador de contaminação microbiológica, tais como o JCPyV, AdV suíno, e Polyomavírus bovino em amostras de águas superficiais e subterrâneas¹¹⁰; para estudos da diversidade viral em águas de rio para deteção dos vírus HAV, NoV, JCPyV entre outros^{11,111}; e também para pesquisa de vírus quer de RNA quer de DNA em amostras de água do mar^{109,111}. Mais recentemente, este método foi também utilizado com sucesso para a deteção de NoV e HAV em amostras de frutos vermelhos¹¹². Por ser um método simples e de fácil execução, que permite processar um grande volume de amostra (10 L), tem sido também utilizado para concentração de partículas virais em amostras de água residual para posterior avaliação e caracterização do viroma por NGS^{57,113}.

Assim, no presente estudo, dado ao tipo de amostras de água a analisar e ao objetivo do trabalho, este método revelou-se ser o mais apropriado para a concentração de partículas virais, utilizadas como base para posterior pesquisa e caracterização de genomas virais por abordagens diretas e indiretas.

3.3. Detecção e quantificação dos genomas virais por protocolos *TaqMan* qPCR

3.3.1. Extração de ácidos nucleicos a partir dos concentrados virais

No presente estudo a extração de ácidos nucleicos virais foi efetuada com o sistema comercial *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*, que apesar de ser dirigido para extração de RNA viral, permite também extrair o DNA viral, desde que não se adicione a enzima DNase. Assim, as concentrações de RNA obtidas variaram entre 7 ng/μL e 133 ng/μL, e a pureza entre 1,9 e 4,8 para a razão de absorbâncias 260/280 e 0,03 e 0,7 para a razão de absorbâncias 260/230 (Anexo III). De acordo com a literatura, uma amostra de RNA é considerada pura quando estes valores variam entre 1,8 e 2,2, sendo que valores fora deste intervalo significam que há uma possível contaminação da amostra com proteínas, fenol, sais, etanol ou outros contaminantes. Assim, as amostras de RNA obtidas com valores acima de 2,2 para a razão 260/280 estarão provavelmente contaminadas com proteínas e as que apresentaram valores abaixo de 1,8 para a razão 260/230 poderão estar contaminadas com etanol.

Relativamente às amostras de DNA viral obtidas, a concentração variou entre 11,8 ng/μL e 73,3 ng/μL e as purezas entre 1,8 e 2,65 para a razão de absorbâncias 260/280 e entre 0,03 e 0,4 para a razão de absorbâncias 260/230. Os valores obtidos para a razão 260/230 estão abaixo dos valores de referência o que significa que as amostras de DNA estão provavelmente contaminadas com etanol.

Estas contaminações das amostras de RNA e DNA extraídas, devem-se aos resíduos dos reagentes utilizados na extração de ácidos nucleicos (etanol), podendo resultar numa sobrestimação de concentração de ácidos nucleicos¹¹⁴, o que poderá influenciar a eficiência dos protocolos moleculares que serão posteriormente utilizados.

3.3.2. Preparação e otimização das curvas padrão para o protocolo *duplex TaqMan* qPCR

Para a preparação das curvas padrão necessárias à otimização dos protocolos de qPCR, amplificou-se primeiramente por PCR convencional fragmentos de interesse dos genomas de AdV e do PyV. Assim, para o AdV amplificou-se um fragmento de 760 bp, e para o PyV um fragmento de 890 bp (Figura 3.1). Uma vez que foram também obtidas bandas inespecíficas, os produtos amplificados foram purificados a partir do gel de agarose, através do sistema comercial *NZYGelpure kit* (NZYTech).

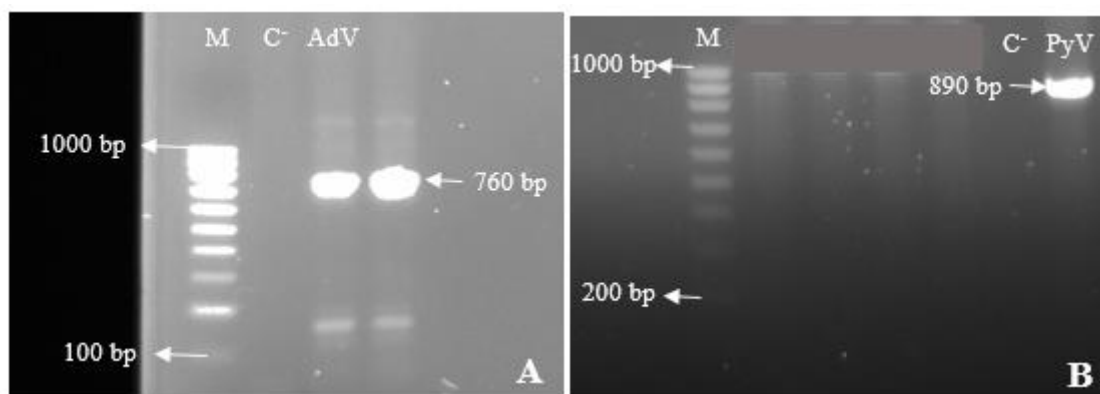


Figura 3.1 - Observação dos produtos de amplificação obtidos para o genoma de Adenovírus e Polyomavírus após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. **(A)** fragmento de Adenovírus; **(B)** fragmento de Polyomavírus. **M** – Marcador molecular: *NZYDNA Ladder IV* (NZYTech). **C-** - Controle negativo de amplificação.

3.3.2.1. Clonagem molecular das sequências amplificadas de AdV e PyV

A clonagem dos produtos de amplificação obtidos no passo anterior foi efetuada com recurso ao vetor *pGEM®-T Easy*, utilizando-se *E. coli* como hospedeiro de clonagem. A mistura de ligação foi efetuada diretamente com os produtos de PCR purificados, tendo-se utilizado uma razão inserto/vetor de 1/1. A seleção dos clones bacterianos possuindo plasmídeos recombinantes foi efetuada visualmente pela observação da coloração das colónias (brancas ou azuis), tendo sido analisadas um conjunto de 39 e 16 colónias brancas 60 e 24 colónias azuis na clonagem das sequências amplificadas de AdV e o PyV, respetivamente (Figura 3.2).

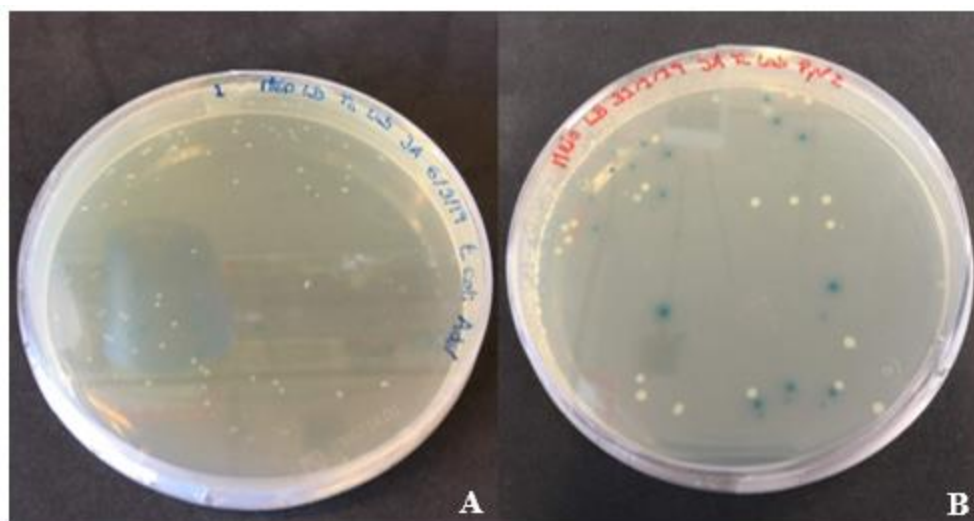


Figura 3.2 - Observação do resultado da clonagem com os fragmentos do genoma de Adenovírus **(A)** e Polyomavírus **(B)**. Colónias brancas - *E.coli* cujo plasmídeo tem inserido o fragmento de interesse (inserto); Colónias azuis - *E.coli* cujo plasmídeo não tem o inserto.

A presença de cada um dos fragmentos de interesse de AdV e PyV no plasmídeo das respetivas colónias foi confirmada através dos PCR convencionais descritos anteriormente (Figura 3.3).

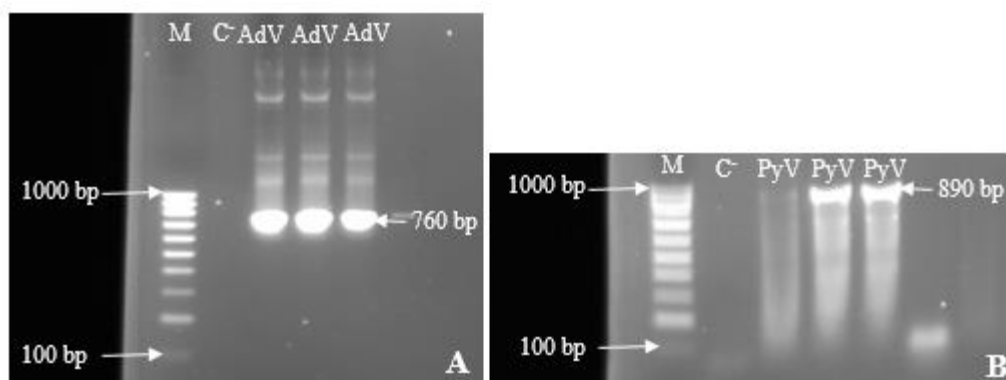


Figura 3.3 - Observação dos produtos amplificação obtidos para Adenovírus (A) e Polyomavírus (B), após clonagem molecular para confirmação do inserto no plasmídeo das colônias brancas de *E. coli*. M – Marcador molecular: NZYDNA Ladder IV (NZYTech). C- - Controlo negativo de amplificação.

A concentração do DNA plasmídico obtido variou entre 80 ng/μL e 171 ng/μL e a pureza para cada uma das razões de absorvâncias entre 1,9 e 2,0 para 260/280 e entre 1,8 e 2,0 para 260/230 (Anexo IV). Através da concentração de DNA plasmídico foi determinado o número de cópias de genoma para cada um dos genomas em estudo, de forma a se efetuarem as diluições seriadas (entre 10⁶ e 1 cópias de genoma/μL) necessárias para a otimização e determinação do limite de deteção dos protocolos de qPCR.

Para obtenção das curvas padrão dos protocolos de qPCR, optou-se pela metodologia atrás descrita (clonagem de fragmentos em vetor) devido ao laboratório de *Food Safety and Microbiology* do iBET, onde decorreu o trabalho prático desta dissertação, não ter as condições necessárias para a manutenção e manipulação de culturas de vírus, sendo que este laboratório está dirigido para populações bacterianas e fúngicas presentes nos alimentos.

3.3.3. Desenvolvimento e otimização do protocolo de *duplex TaqMan* qPCR para pesquisa simultânea de genomas de AdV e PyV

Os protocolos de *multiplex TaqMan* qPCR permitem detetar e quantificar genomas de microrganismos de uma forma rápida, precisa e com elevada sensibilidade, sendo cada vez mais utilizados para pesquisa e quantificação de genomas virais em amostras ambientais^{115,116}.

Assim, no presente estudo foi desenvolvido e otimizado um protocolo de *duplex TaqMan* qPCR para pesquisa simultânea de genomas de AdV e PyV nas amostras de água residual colhidas nas duas ETAR's em diferentes estações do ano. A otimização deste protocolo foi dividida em vários passos: primeiramente foi otimizado o protocolo em *singleplex* para a deteção do genoma de cada um dos vírus em estudo, onde para o caso do protocolo de qPCR em *singleplex* dirigido ao genoma de AdV, obteve-se uma eficiência de 88,92%, um R^2 de 0,9994 e um *slope* de -3,6196 (Figura 3.4) O limite de deteção foi de 1 cópia de genoma/reação.

qPCR *singleplex* para diluições seriadas do genoma de AdV

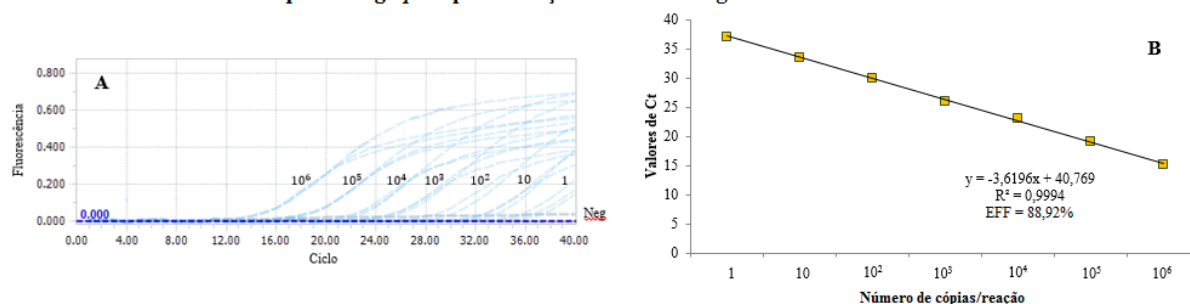


Figura 3.4 - Ilustração da curva padrão obtida para o protocolo de *singleplex* qPCR direcionado ao genoma de Adenovírus. (A) Diluições de DNA de Adenovírus seriadas de 10⁶ a 1 cópias de genoma; (B) respectiva relação entre o logaritmo da concentração inicial de DNA e os valores de Ct de amplificação. **Neg** – controle negativo da reação de qPCR cujo *template* corresponde a água e RNA *free*; **Ct** – interseção da curva de amplificação da amostra com o *threshold*.

Para o caso do protocolo em *singleplex* dirigido ao genoma de PyV, foi possível obter uma eficiência de 90,06%, um R^2 de 0,9995 e um *slope* de -3,5857 (Figura 3.5). O limite de detecção foi de 1 cópia de genoma/reação.

qPCR *singleplex* para diluições seriadas do genoma de PyV

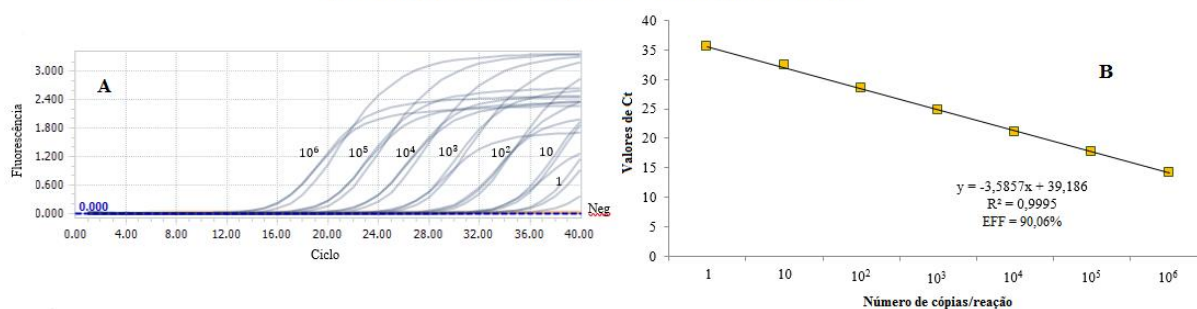


Figura 3.5 - Ilustração da curva padrão obtida para o protocolo de *singleplex* qPCR direcionado ao genoma de Polyomavírus, e (A) Diluições de DNA de Polyomavírus seriadas de 10⁶ a 1 cópias de genoma; (B) respectiva relação entre o logaritmo da concentração inicial de DNA e os valores de Ct de amplificação. **Neg** – controle negativo da reação de qPCR cujo *template* corresponde a água DNA e RNA *free*; **Ct** – interseção da curva de amplificação da amostra com o *threshold*.

Posteriormente, após a otimização de cada protocolo de qPCR em *singleplex*, procedeu-se então a otimização do protocolo de qPCR em *duplex* para a detecção simultânea de genomas de AdV e PyV. Assim os Ct obtidos para as várias diluições nos protocolos *singleplex* não devem variar em mais do que 1 Ct, em relação ao protocolo de qPCR em *duplex* (figura 3.6). A eficiência obtida por este protocolo qPCR *duplex* foi superior a 84% e o limite de detecção manteve-se igual aos protocolos em *singleplex*, ou seja, de 1 cópias de genoma/reação (figura 3.6) para cada um dos genomas virais em estudo.

Duplex qPCR para os genomas de AdV e PyV

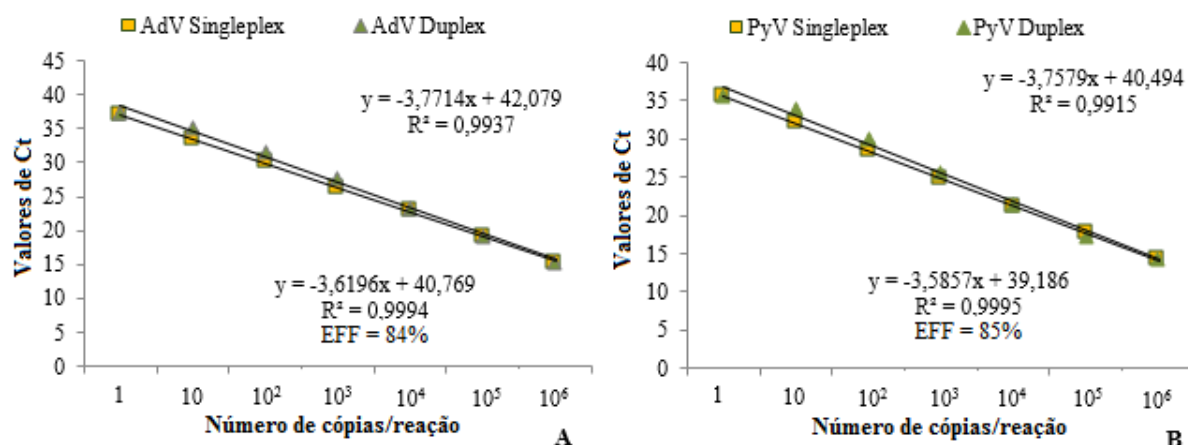


Figura 3.6 - Ilustração da relação linear entre o logaritmo da concentração inicial de DNA e os valores de amplificação entre 10^6 e 1 cópias de genoma para o protocolo de *duplex* qPCR e para cada um dos protocolos de qPCR em *singleplex* para os genomas de Adenovírus (A) e Polyomavírus (B). Ct – interseção da curva de amplificação da amostra com o *threshold*.

Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, nomeadamente num estudo cujo objetivo foi determinar a eficiência de remoção viral em lagos de tratamento de AR's, com recurso a protocolos qPCR em *singleplex*, onde os autores obtiveram limites de deteção de 5 e 10 cópias de genoma para os genomas de AdV e PyV, respetivamente¹¹⁷. Na passagem de um protocolo de qPCR em *singleplex* para *multiplex* é normal ocorrer uma diminuição no limite de deteção da técnica, uma vez que existe na mistura de reação mais do que um alvo em estudo podendo ocorrer competição pelos reagentes. No entanto, no presente estudo esta diminuição não se verificou, o que demonstra que as concentrações dos reagentes utilizados estão nas quantidades necessárias, não ocorrendo competição.

Após otimização deste protocolo *duplex TaqMan* qPCR para deteção dos genomas de AdV e PyV, este foi aplicado às amostras de AR recolhidas em vários pontos das duas ETAR's no Outono e na Primavera de 2018 e 2019 respetivamente, tendo-se obtido as quantificações descritas na figura 3.7. Estes valores resultam da média de 6 replicados técnicos.

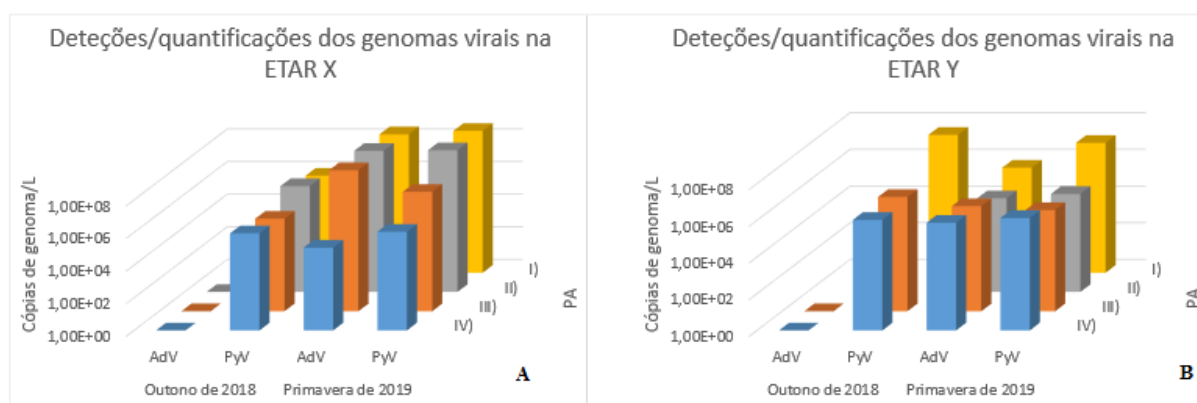


Figura 3.7 - Representação gráfica das quantificações obtidas para os genomas de Adenovírus e Polyomavírus na ETAR X (A) e na ETAR Y (B), nos diferentes pontos de amostragem das recolhas de Outono de 2018 e Primavera de 2019. PA – Pontos amostrados na ETAR X: **I** - Influyente após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; **II** - efluente que segue para o rio Tejo após o tratamento secundário (biofiltração); **III** - efluente após passagem por um sistema de filtração por membrana; **IV** - efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%. Na ETAR Y os pontos amostrados foram: **I** - influente após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; **II** - efluente após o tratamento secundário (lamas ativadas); **III** - efluente que segue para o rio Tejo após passagem por um filtro de areia; **IV** - efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%.

Assim, foi possível verificar que tanto na ETAR X como na ETAR Y no Outono de 2018 o genoma de AdV não foi detectado em qualquer ponto de amostragem, no entanto o mesmo não se verifica na colheita feita na Primavera de 2019. Esta diferença entre as duas estações do ano poderá estar relacionada com a temperatura da AR na ETAR, que pode afetar a sobrevivência do AdV¹¹⁸. No entanto, genomas de adenovírus humanos (HAdV) estão normalmente presentes em maiores concentrações do que outros vírus entéricos em amostras de AR's¹¹⁹, sendo excretados em elevadas concentrações pelos doentes infetados (mais de 10^{11} partículas virais por grama de fezes)¹²⁰, assim, esta ausência de AdV no outono poderá ter sido pontual e estar apenas relacionada com o momento de recolha das amostras de AR.

Relativamente à colheita realizada na Primavera, o genoma de AdV foi detectado nos 4 pontos de amostragem, apresentando maiores concentrações na ETAR X do que na ETAR Y, o que seria de esperar uma vez que a ETAR X recebe os influentes de um maior número de habitantes e de mais fontes hospitalares do que a ETAR Y. Assim, verificou-se que na ETAR X ocorreu uma diminuição da concentração do genoma de AdV entre o influente e o efluente reutilizável, de cerca de 3 Log_{10} , enquanto que na ETAR Y esta diminuição não foi observada, demonstrando que os tratamentos aplicados por esta ETAR são pouco eficientes na remoção deste vírus. Tendo em conta que o AdV é um dos vírus entéricos mais prevalente em amostras de água residual e com maior tolerância aos tratamentos químicos e físicos aplicados nas ETAR's¹²¹, o seu destino nestes processos de tratamento deverá ser mais aprofundado, de forma a melhorar a sua remoção/ inativação.

Comparativamente com a literatura, as concentrações obtidas de AdV nas AR's estudadas estão dentro da mesma ordem de grandeza, observando-se ligeiras alterações, nomeadamente num estudo feito em Itália, cujo objetivo foi detetar e quantificar genomas de vírus entéricos em AR's recolhidas em cinco ETAR's urbanas, onde se observou que a concentração média de AdV foi de $3,30 \times 10^7$ cópias de genoma/mL no influente, e de $7,60 \times 10^6$ cópias de genoma/mL no efluente. Estas variações poderão estar relacionadas com o método de concentração de partículas virais aplicado pelos autores, tendo sido efetuada por ultracentrifugação. Mais ainda o AdV é um vírus termoestável altamente resistente aos tratamentos de desinfecção aplicados nas ETAR's, o que poderá justificar as elevadas concentrações obtidas nos vários estudos¹²².

Outro estudo desenvolvido na Suíça cujo objetivo foi investigar a ocorrência e concentração de HAdV tipo 40 (HAdV-40) entre outros, por protocolos de qPCR, em amostras de AR de 31 influentes de ETAR's entre junho a agosto (Verão) e Novembro a Janeiro (Inverno). As ETAR's selecionadas serviam uma população que varia entre 2 000 e 50 000 habitantes, incluindo quintas de produção de bovinos. Foi desenvolvido um ensaio *duplex*, entre outros, para a deteção e quantificação de HAdV-40/PAdV. Assim, obteve-se uma concentração média de HAdV-40 de $6,80 \times 10^5$ cópias de genoma/L nas amostras de Verão, e de $3,28 \times 10^5$ cópias de genomas/L nas amostras de Inverno. Estes valores foram 3 log_{10} inferiores aos obtidos no presente estudo na recolha da primavera na ETAR X. Esta diferença poderá estar não só relacionada com a estação do ano em que foram recolhidas as amostras de AR ser diferente, como também com o método de concentração de partículas virais utilizado. Os autores recorreram à filtração por membrana e precipitação com PEG. A filtração por membranas tem sido aplicada, igualmente, para concentrar partículas virais em AR, apresentando boa eficiência devido à disponibilidade de diversos tamanhos de poros, contudo, estes colmatam frequentemente em efluentes turvos e com forte caudal¹²³. A precipitação com PEG é um método mais adaptado e aplicado em AR, contudo é limitado pelo volume máximo a ser processado, cerca de 1 L, não sendo específico para concentração de partículas virais, pois também concentra compostos orgânicos²⁴.

No caso do genoma de PyV, verificaram-se ligeiras diferenças nas concentrações entre as duas estações do ano, no entanto observou-se uma diminuição na concentração de PyV entre o influente e o efluente reutilizável de 1 e 2 Log_{10} na ETAR X e na ETAR Y, respetivamente. Esta ligeira diminuição

demonstra uma vez mais a baixa eficiência na remoção de genomas virais dos tratamentos aplicados em cada uma das ETAR's em estudo. Concentrações semelhantes de PyV foram também obtidas num estudo onde 15 ETAR's portuguesas foram analisadas no Inverno de 2013. Através do protocolo qPCR foram obtidas concentrações de $5,22 \times 10^5$ e $1,69 \times 10^5$ cópias de genoma/L para o PyV no influente e no efluente das ETAR's, respetivamente⁹⁸. Mais ainda, noutro estudo foram obtidas concentrações de $9,6 \times 10^3$ e $4,1 \times 10^3$ cópias de genoma/L antes e depois tratamento secundário, respetivamente e de $1,1 \times 10^4$ cópias de genoma/L no efluente reutilizável¹¹⁷.

Por fim, salienta-se ainda que no efluente que é descarregado no rio, no caso da ETAR Y, há uma maior diminuição na concentração de AdV e PyV, (de 3 Log₁₀) do que na ETAR X (de 0 Log₁₀), apesar destas concentrações serem semelhantes nos influentes. Este facto poderá estar relacionado com o passo adicional de filtração por cascalho e areia realizado pela ETAR Y.

3.3.4. Protocolo *tetraplex* qPCR *TaqMan* para deteção dos genomas virais de NoV GI, NoV GII, HAV e HEV

O protocolo *tetraplex* *TaqMan* qPCR para deteção dos genomas de NoV GI, NoV GII, HAV e HEV desenvolvido e otimizado no âmbito de outro estudo do laboratório, apresentou uma eficiência entre 88 e 103% e um limite de deteção de 100 cópias de genoma/reacção para NoV GI, e de 10 cópias de genoma/reacção para NoV GII, HAV e HEV. Assim, este protocolo foi, igualmente, aplicado às mesmas amostras de AR recolhidas nas duas ETAR's no Outono de 2018 e na Primavera de 2019. As concentrações obtidas para cada um dos genomas virais em estudo e as suas variações entre cada um dos pontos amostrado, encontram-se representadas na figura 3.8. Estes valores resultam da média de 6 replicados técnicos.

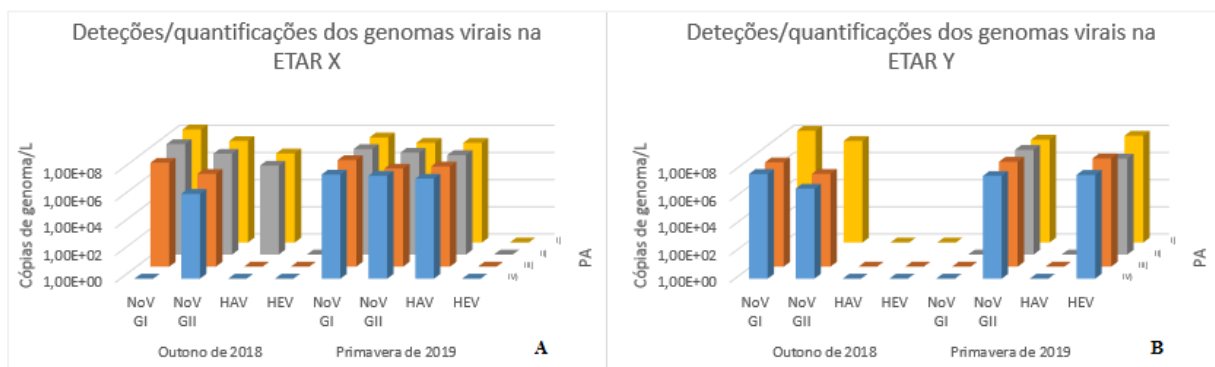


Figura 3.8 - Representação gráfica das quantificações obtidas para os genomas de Norovírus GI, Norovírus GII, vírus da Hepatite A e E na ETAR X (A) e na ETAR Y (B), nos diferentes pontos de amostragem das recolhas de Outono de 2018 e Primavera de 2019. **PA** – Pontos amostrados na ETAR X: **I** - Influentes após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; **II** - efluente que segue para o rio Tejo após o tratamento secundário (biofiltração); **III** - efluente após passagem por um sistema de filtração por membrana; **IV** - efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%. Na ETAR Y os pontos amostrados foram: **I** - influente após o tratamento preliminar pelo sistema de gradagem; **II** - efluente após o tratamento secundário (lamas ativadas); **III** - efluente que segue para o rio Tejo após passagem por um filtro de areia; **IV** - efluente reutilizável após a adição de hipoclorito de sódio a 10%.

Assim, verificou-se que o genoma de NoV GI foi detetado em elevadas concentrações na recolha do Outono de 2018 em ambas as ETAR's nos quatro pontos amostrados, mantendo-se estas praticamente iguais entre o influente e o efluente reutilizável, com exceção do efluente reutilizável da ETAR X. Relativamente a recolha da primavera na ETAR X foi detetado o genoma de NoV GI nos quatro pontos amostrados com concentrações semelhantes às obtidas no outono. No entanto, na ETAR Y este vírus foi apenas detetado na recolha do Outono, mantendo-se as concentrações dentro da mesma ordem de

grandeza das obtidas anteriormente. Estes resultados demonstram, uma vez mais, a baixa eficiência na remoção de genomas virais dos tratamentos aplicados pelas ETAR's. Mais ainda, a não detecção do genoma de NoV GI na recolha da Primavera não significa necessariamente que os influentes e efluentes estivessem isentos de NoV, dado que este resultado poderá ser um falso negativo da técnica de *multiplex* qPCR devido à presença de possíveis inibidores, ou a carga viral presente nas amostras estar abaixo do limite de detecção da técnica.

Em relação ao NoV GII, o seu genoma foi detetado em concentrações elevadas, na ordem do 10^7 cópia de genoma/L nos influentes e efluentes de ambas as ETAR's, quer no outono como na Primavera, e em todos os pontos amostrados, o que demonstra, uma vez mais, a baixa eficiência dos tratamentos aplicados na remoção das partículas virais.

De acordo com a literatura o genoma de NoV pode ser detetado em concentrações elevadas (10^{11} cópias de genoma/g) nas fezes¹²⁴, o que, consequentemente, contribui para a sua disseminação no meio ambiente, nomeadamente nas águas residuais. Assim, os valores obtidos neste estudo para os genomas de NoV GI e GII foram semelhantes aos obtidos noutros estudos, onde foram analisados três pontos de uma ETAR no concelho de Lisboa, tendo sido detetados genomas de NoV GI e NoV GII com concentrações mais baixas, na ordem de grandeza de 10^6 cópias de genoma/L no influente e de 10^4 cópias de genoma no efluente reutilizável¹¹⁶. Outra investigação detetou também níveis elevados de NoV GI e GII nos influentes e efluentes das cinco ETAR's italianas estudadas, tendo sido observado, no entanto, uma maior prevalência do genoma de NoV GI em relação ao NoV GII, provavelmente devido a este tipo ser o mais prevalente na população¹²².

Verificou-se também que o genoma de HAV foi apenas detetado na ETAR X em ambas as estações do ano com concentrações entre 10^6 e 10^7 cópias de genoma/L, à exceção dos efluentes após o tratamento secundário e terciário da recolha do Outono de 2018, onde não foi detetado. A ausência do genoma deste vírus na ETAR Y poderá estar relacionado com a origem das águas residuais, uma vez que a ETAR X recebe águas de mais fontes hospitalares que a ETAR Y. Um estudo desenvolvido em Portugal teve resultados semelhantes, onde o genoma de HAV foi detetado no influente da ETAR em concentrações na ordem das 10^7 cópias de genoma/L, não sendo depois detetado nos efluentes tratados após o tratamento secundário e terciário da ETAR em estudo também no concelho de Lisboa¹¹⁶.

Relativamente ao HEV, verificou-se que tanto na recolha do Outono de 2018 como na recolha da Primavera de 2019 o genoma de HEV não foi detetado em nenhum dos pontos amostrados. Este resultado não era esperado uma vez que, Portugal é endémico para HEV^{125,126}, tendo sido confirmada a presença deste vírus em suínos^{127,128}, sendo expectável a sua libertação no ambiente aquático, e consequentemente a sua presença nas águas residuais em estudo. No entanto, este resultado não significa necessariamente que os influentes e efluentes correspondentes a cada ETAR estivessem isentos de HEV. Na verdade, tal como descrito anteriormente, este resultado poderá ser um falso negativo, ou dever-se a uma baixa carga viral presente nas amostras, estando abaixo do limite de detecção da técnica. Relativamente à ETAR Y, o mesmo não se observa, uma vez que na recolha da Primavera em todos os pontos amostrados foram detetadas concentrações elevadas deste vírus que se mantiveram semelhantes antes e depois dos tratamentos aplicados. Resultados semelhantes foram também obtidos, onde foram avaliadas 15 ETAR's portuguesas, de norte a sul do país, em Setembro e Dezembro de 2013, tendo sido duas delas positivas para HEV na colheita de Dezembro. No entanto, os autores não indicam as concentrações de HEV detetadas pelo RT-qPCR utilizado, uma vez que o objetivo principal do estudo foi a caracterização molecular do vírus e não a avaliação da sua ocorrência¹²⁹.

Mais ainda, um estudo recente na Alemanha, onde foi determinada a prevalência de HEV em diferentes amostras de águas, incluindo águas residuais, foram obtidas concentrações de 10^5 cópias de genoma/L nos influentes e de 10^3 cópias de genoma/L nos efluentes, após o tratamento secundário. Estes valores estão cerca de 2 log₁₀ abaixo dos obtidos no presente estudo¹³⁰.

3.4. Avaliação da comunidade viral por análise metagenômica por sequenciação de próxima geração

A sequenciação de próxima geração promove a descoberta de potenciais novos vírus, tendo-se vindo a revelar uma ferramenta útil na monitorização e identificação de vírus patogénicos em AR's, contribuindo assim para uma melhoria da saúde pública^{31,55,91,113}.

Os vírus excretados pelos humanos através das fezes, urina e descamação da pele, juntamente com vírus de outros animais e de invertebrados, plantas, bactérias e fungos constituem o viroma das AR's. Esta complexa matriz contém uma larga variedade de vírus patogénicos e comensais que podem dar informações relevantes de infeções persistentes ou agudas que possam estar a afetar a população⁹¹.

Atualmente, as metodologias de sequenciação de próxima geração são cada vez mais vistas como ferramentas promissoras para o estudo abrangente de microrganismos numa grande variedade de amostras, substituindo os métodos moleculares tradicionais. As principais razões para esta nova tendência são: a capacidade de processar simultaneamente um maior número de amostras, a redução dos custos de sequenciação, a facilidade com que as amostras e bibliotecas podem ser preparadas e o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas mais rápidas e eficientes para processar a enorme quantidade de dados gerada¹³¹.

No caso dos vírus, estes não possuem marcadores moleculares conservados, como as bactérias com o gene rDNA 16S que é partilhado entre todas as espécies. No entanto, a aplicação de abordagens de sequenciação baseadas em sequências nucleotídicas (*primers*) aleatórios em combinação com as técnicas de sequenciação de próxima geração, abriu um novo caminho para a descoberta viral, aumentando o número de novas espécies virais descritas todos os anos. As aplicações de metagenômica viral nas AR's fornecem excelentes ferramentas para monitorizar e identificar agentes patogénicos virais potencialmente conhecidos e desconhecidos que circulam entre a população humana, contribuindo para a vigilância da saúde pública¹¹³.

Assim, a avaliação da comunidade viral existente em cada um dos pontos amostrados de cada ETAR na recolha da Primavera, foi realizada por sequenciação de próxima geração no sequenciador *Illumina Miseq*, através da colaboração estabelecida com a Universidade de Barcelona. Os resultados obtidos foram analisados com o *software* disponível online "*Genome Detective*". Este *software* consiste numa aplicação de fácil utilização, *user-friendly* que permite uma rápida e precisa identificação das comunidades virais a partir dos dados obtidos pela sequenciação de próxima geração. Esta aplicação permite a identificação de clusters filogenéticos e genótipos a partir de genomas em formato FASTA.

Nas duas ETAR's em estudo, foram identificadas diversas famílias virais, onde as famílias de bacteriófagos *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Microviridae*, apresentaram uma elevada abundância, o que corrobora os resultados obtidos num estudo desenvolvido em Espanha¹¹³. Foram também identificadas famílias virais associadas a plantas tais como *Virgaviridae*, *Circoviridae* e *Picobirnaviridae*, e outras associadas a vírus patogénicos humanos nomeadamente *Astroviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* e *Calciviridae*, conforme ilustrado na figura 3.9.

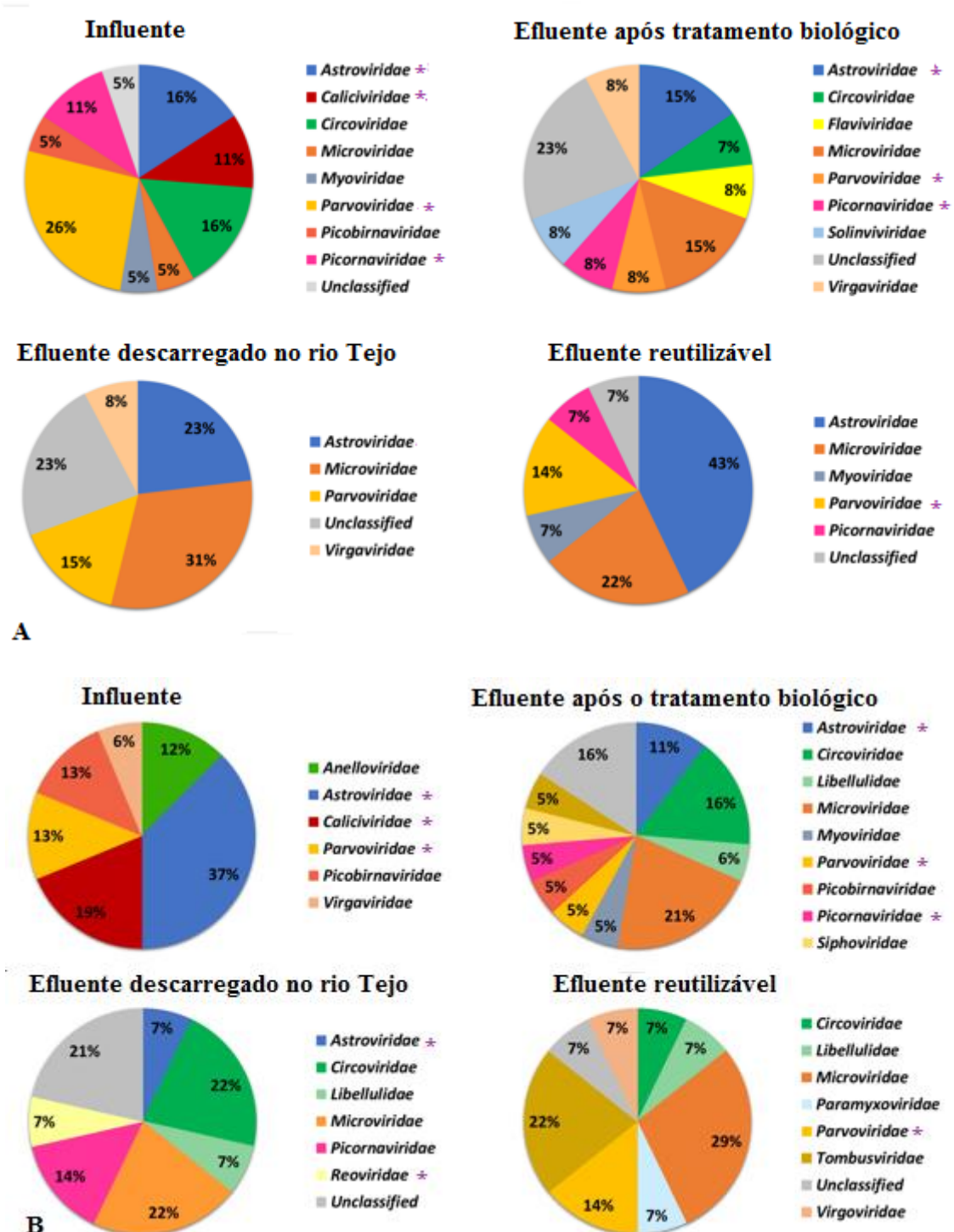


Figura 3.9 - Ilustração da percentagem de cada uma das famílias virais identificadas por sequenciação de próxima geração, nos quatro pontos amostrados na Primavera na ETAR X (A) e na ETAR Y (B). * - famílias associadas a vírus patogénicos.

Assim, verifica-se que há uma maior diversidade de famílias virais no influente da ETAR X comparativamente ao influente da ETAR Y, estando este facto provavelmente associado ao tipo de AR que cada ETAR trata, uma vez que, tal como referido anteriormente, a ETAR X recebe AR's de um maior número de habitantes e de mais fontes hospitalares que a ETAR Y. Mais ainda, observou-se um aumento da diversidade de famílias virais no efluente após o tratamento secundário na ETAR Y, sendo maioritariamente famílias associadas a bacteriófagos. Este enriquecimento de famílias virais foi também

observado em menor escala na ETAR X, sendo que esta diferença poderá estar associada ao tipo de tratamento biológico efetuado por cada ETAR, sendo na ETAR X feito por biofiltração e na ETAR Y por lamas ativadas.

Relativamente ao efluente que é descarregado no rio e ao efluente reutilizável, verificou-se que a ETAR X parece ser a mais eficaz na remoção de um maior número de famílias virais quando comparada com a ETAR Y. No entanto, no caso da ETAR X as famílias virais associadas a vírus patogénicos humanos mantêm-se praticamente presentes em todos os pontos amostrados, independentemente do tipo de tratamento efetuado. Por exemplo, na ETAR X no caso da família *Astroviridae* verifica-se um aumento na sua percentagem quer no efluente descarregado no rio quer no efluente reutilizável. Uma outra família também associada a vírus patogénicos humanos é a *Parvoviridae*, que também se mantém presente, nos vários pontos amostrados ao longo de ambas as ETAR's.

A família *Astroviridae* consiste em dois géneros: *Avastrovírus* e *Mamastrovírus* que infetam aves e mamíferos, respetivamente. Os vírus associados a esta família são sem invólucro, com uma cápside icosaédrica, com um diâmetro de aproximadamente 28 - 40 nm, e cujo genoma é de RNA no sentido positivo¹³². Em humanos, os astrovírus estão associados a gastroenterites, especialmente em crianças e indivíduos imunocomprometidos¹³³. As espécies virais identificadas dentro desta família pertenciam maioritariamente ao género *Mamastrovírus*. Estudos anteriores demonstraram também a presença de astrovírus em AR's, sendo estes resistentes aos agentes físicos e químicos utilizados nos processos de tratamento das ETAR's^{113,134}.

A família *Parvoviridae*, abrange os menores vírus conhecidos e alguns dos mais resistentes ao ambiente. Os membros desta família não possuem invólucro, têm uma cápside icosaédrica com um diâmetro de 18 - 26 nm, cujo genoma é constituído por uma cadeia simples de DNA^{12,135}. Esta família divide-se em duas subfamílias, a *Parvovirinae* que infeta hospedeiros vertebrados e a *Densovirinae* que infeta hospedeiros invertebrados. Os primeiros parvovírus identificados em humanos não eram patogénicos e foram identificados como adeno-associated viroses. Mais tarde foram então identificados dois parvovírus patogénicos humanos, nomeadamente o parvovírus B19¹³⁶ e o bocavírus humano 1¹³⁷. Nas amostras de AR's analisadas, foram identificadas diversas espécies desta família nomeadamente, adeno-associated vírus, human bocavírus, bocavírus canino entre outras. Resultados semelhantes, foram também obtidos por outros autores em Itália¹³⁸ e Noruega¹³⁹.

Mais pontualmente foram também detetados genomas virais pertencentes a outras famílias associadas a vírus patogénicos, nomeadamente a família *Picornaviridae*, com os vírus Aichivírus A e Cardiovírus C, identificados em ambas as ETAR's no efluente após o tratamento secundário. Os picornavírus são um grupo de vírus de RNA de cadeia simples com sentido positivo, que infetam vertebrados tais como mamíferos e pássaros. São vírus sem invólucro com um diâmetro de cerca de 30 nm, com uma cápside icosaédrica, sendo responsáveis por uma variedade de doenças incluindo, gastroenterite, paralisia, meningite, hepatite e poliomielite¹⁴⁰⁻¹⁴³. Resultado semelhante, foi também obtido em Itália¹⁴⁴ e USA (do inglês, *United States of America*)¹⁴¹.

A família *Caliciviridae* consiste em dez genogrupos, sendo os membros pertencentes aos genogrupos I, II, IV, VIII e XIX capazes de infetar humanos³². Os vírus associados a esta família são sem invólucro, de aproximadamente 35 nm de diâmetro e contendo um genoma de RNA de cadeia simples, de sentido positivo^{24,29,30}. São considerados os principais causadores de surtos de gastroenterite aguda, associado normalmente ao genogrupo II, genótipo 4^{11,33,34}. Nas amostras de AR's analisadas, foi identificado a espécie NoV GII nos influentes de ambas as ETAR's, resultados semelhantes foram obtidos em Itália²⁵, o que também é corroborado pelos dados epidemiológicos existentes sobre as ocorrências de surtos de NoV na Europa^{145,146}.

A caracterização do viroma presente nas AR's urbanas pode constituir uma importante base de dados para estirpes virais conhecidas, novas e emergentes que circulam na população humana. Técnicas

de alto rendimento, como a sequenciação de próxima geração, são uma ferramenta valiosa para identificar os principais agentes patogênicos presentes na comunidade e no ambiente, e fornecer dados para estudos epidemiológicos e de vigilância da saúde pública. Além disso, o conhecimento sobre a composição patogênica do viroma nas AR's pode sensibilizar para a necessidade de modificar os processos de tratamento das ETAR's, de modo a que estas consigam impedir eficazmente a disseminação de vírus patogênicos para o meio ambiente.

4. Conclusão

A procura de AR's como fonte fiável de água e nutrientes para a agricultura tem vindo a crescer como resposta ao crescimento populacional, à urbanização, ao aumento da escassez de água e aos efeitos das alterações climáticas. No entanto, é nesta reutilização que surgem preocupações relacionadas com a qualidade da água no que diz respeito aos microrganismos patogénicos. Diversos estudos têm demonstrado que estas AR's urbanas possuem na sua composição um vasto número de famílias virais, algumas das quais patogénicas com uma elevada infecciosidade, podendo ser disseminados para o meio ambiente com retorno à população humana e animal provocando problemas de saúde pública, uma vez que estas não são completamente eliminadas ou inativadas nas ETAR's.

Assim, o presente estudo teve como objetivo principal caracterizar o viroma presente nas AR's de duas ETAR's da região de Lisboa, em duas estações do ano distintas (Outono e Primavera), por protocolos moleculares diretos e indiretos. As metodologias desenvolvidas com base na floculação com leite em pó para a obtenção das partículas virais, são bastante úteis e robustas permitindo uma caracterização geral do viroma destas AR's urbanas, quer de vírus de genoma de DNA como de RNA.

A caracterização do viroma destas AR's, consistiu na pesquisa molecular de genomas de seis vírus patogénicos humanos (NoV GI, NoV GII, HAV, HEV, PyV e AdV), por dois protocolos de *multiplex* PCR quantitativo em tempo real. À exceção dos genomas virais de AdV, HAV, HEV e NoV GII, todos os outros genomas em estudo foram detetados em concentrações elevadas (10^8 e 10^5 cópias de genoma/L) nos influentes e efluentes reutilizáveis de ambas as ETAR's, independentemente da estação do ano em causa. A presença destes genomas nos efluentes reutilizáveis, demonstra a baixa eficiência das ETAR's no tratamento/eliminação de genomas virais. No entanto, estas metodologias apenas permitem uma rápida e precisa identificação de diversos alvos virais detetando-a apenas o seu genoma, não dando nenhuma informação relativamente à viabilidade dos vírus. Porém, a sua presença nas águas residuais tratadas com elevadas concentrações poderá representar um perigo para a saúde pública. Relativamente aos genomas de AdV e HEV, parece existir uma certa sazonalidade deste vírus estando presente apenas na colheita feita na Primavera, no entanto mais colheitas ao longo do tempo em cada estação do ano deverão ser efetuadas para melhor compreender estas correlações.

Relativamente à caracterização do viroma das AR's em estudo por métodos indiretos, foi efetuada a sequenciação de próxima geração, tendo-se identificado mais de 10 famílias virais de vertebrados, além de famílias de bacteriófagos, de vírus de plantas e de vírus que infetam outros hospedeiros. A sequenciação realizada neste estudo, apresentava um passo de enriquecimento utilizando-se uma sonda específica para vírus de vertebrados, o que permitiu obter esta vasta variedade de genomas virais.

Apesar da evolução dos métodos de tratamento das ETAR's, os vírus particularmente os patogénicos persistem e, conseqüentemente, as doenças causadas por estes vírus acabam por causar um impacto negativo ao nível da saúde pública e ambiental e até ao nível socioeconómico. Assim, este tipo de estudos são cada vez mais necessários, de modo a identificarem-se vírus patogénicos que possam estar em circulação na população e no ambiente, tornando estas metodologias de sequenciação de próxima geração ferramentas úteis para estudos epidemiológicos e para a vigilância da saúde pública.

Mais ainda este estudo veio corroborar a importância de se começar a utilizar vírus como indicadores de contaminação fecal nas águas, sendo que os indicadores bacterianos não conseguem retratar com precisão os riscos para a saúde humana da poluição fecal. Desta forma, apesar de ser impraticável monitorizar a presença de todos os agentes patogénicos virais relacionados com a poluição das AR's, o desenvolvimento de um indicador viral preciso da contaminação dos esgotos é necessário para uma monitorização melhorada da qualidade da água.

5. Referências bibliográficas

1. Becerra-Castro, C., Lopes, A. R., Vaz-Moreira, I., Silva, E. F., Manaia, C. M. & Nunes, O. C. Wastewater reuse in irrigation: A microbiological perspective on implications in soil fertility and human and environmental health. *Environ. Int.* **75**, 117–135 (2015).
2. Marecos do Monte, H. & Albuquerque, A. *Reutilização de Águas Residuais*. (Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2010).
3. Sanz, L. A. & Gawlik, B. M. *Water Reuse in Europe. Relevant guidelines, needs for and barriers to innovation*. (Joint Research Centre, European Commission, 2014).
4. Sales-Ortells, H., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Dürig, W., Girones, R. & Medema, G. Health risks derived from consumption of lettuces irrigated with tertiary effluent containing norovirus. *Food Res. Int.* **68**, 70–77 (2015).
5. Sidhu, J. P. S., Sena, K., Hodggers, L., Palmer, A. & Toze, S. Comparative enteric viruses and coliphage removal during wastewater treatment processes in a sub-tropical environment. *Sci. Total Environ.* **616–617**, 669–677 (2018).
6. Kitajima, M., Iker, B. C., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes — Identification of potential viral indicators. *Sci. Total Environ.* **488–489**, 290–296 (2014).
7. Henze, M. & Comeau, Y. Wastewater Characterization. in *Biological Wastewater Treatment: Principles Modelling and Design* (eds. Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A. & Brdjanovic, D.) 33–52 (IWA Publishing, 2008). doi:10.2166/9781780408644_001.
8. Tchobanoglous, G., Burton, F. L. & Stensel, H. D. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. (McGraw-Hill, 2003).
9. Marecos do Monte, H., Santos, M. T., Barreiros, A. M. & Albuquerque, A. *Tratamento de Águas Residuais - Operações e Processos de Tratamento Físico e Químico*. (Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2016).
10. Wang, H., Sikora, P., Rutgersson, C., Lindh, M., Brodin, T., Björleinius, B., Larsson, D. G. J. & Norder, H. Differential removal of human pathogenic viruses from sewage by conventional and ozone treatments. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **221**, 479–488 (2018).
11. Calgua, B., Fumian, T., Rusiñol, M., Rodriguez-Manzano, J., Mbayed, V. A., Bofill-Mas, S., Miagostovich, M. & Girones, R. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Res.* **47**, 2797–2810 (2013).
12. Rusiñol, M. & Girones, R. *Summary of Excreted and Waterborne Viruses*. (Global Water Pathogen Project, 2017).
13. Gall, A. M., Mariñas, B. J., Lu, Y. & Shisler, J. L. Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water. *PLOS Pathog.* **11**, e1004867 (2015).
14. Sano, D., Amarasiri, M., Hata, A., Watanabe, T. & Katayama, H. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review. *Environ. Int.* **91**, 220–229 (2016).
15. Simões, C., Rosmaninho, I. & Henriques, A. G. *Guia para a Avaliação de Impacte Ambiental de Estações de Tratamento de Águas Residuais*. (Agência Portuguesa do Ambiente, 2008).
16. AOS Treatments Solutions. A Complete Guide to Types of Screening in Wastewater Treatment | Wastewater Screening. <https://aosts.com/types-wastewater-screening/> (2018).
17. Spellman, F. R. *Handbook of Water and Wastewater Treatment Plant Operations*. (CRC Press,

- 2013).
18. Günder, B. *The membrane-coupled activated sludge process in municipal wastewater treatment*. (Technomic Publishing, 2000).
 19. Gerba, C. P., Kitajima, M. & Iker, B. Viral presence in waste water and sewage and control methods. in *Viruses in Food and Water* (ed. Cook, N.) 293–315 (Woodhead Publishing, 2013).
 20. Farkas, K., Cooper, D. M., McDonald, J. E., Malham, S. K., de Rougemont, A. & Jones, D. L. Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. *Sci. Total Environ.* **634**, 1174–1183 (2018).
 21. Courault, D., Albert, I., Perelle, S., Fraisse, A., Renault, P., Salemkour, A. & Amato, P. Assessment and risk modeling of airborne enteric viruses emitted from wastewater reused for irrigation. *Sci. Total Environ.* **592**, 512–526 (2017).
 22. Hellmér, M. *Viral Metagenomics to Assess the Microbial Quality of Reused Wastewater*. (Technical University of Denmark, 2018).
 23. Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. & Zinkernagel, R. M. Virology. in *Medical Microbiology* (ed. Thieme Verlag, G.) 376–474 (Thieme, 2005).
 24. Percival, S. L., Chalmers, R. M., Embrey, M., Hunter, P. R., Sellwood, J. & Wyn-Jones, P. Microbiology of Waterborne Diseases. in *Microbiology of Waterborne Diseases* (eds. Percival, S. L., Williams, D. W., Gray, N. F., Yates, M. V. & Chalmers, R. M.) 339–452 (Elsevier Ltd, 2004).
 25. La Rosa, G., Fratini, M., della Libera, S., Iaconelli, M. & Muscillo, M. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann. Ist. Super. Sanita* **48**, 397–406 (2012).
 26. Gerba, C. P., Betancourt, W. Q., Kitajima, M. & Rock, C. M. Reducing uncertainty in estimating virus reduction by advanced water treatment processes. *Water Res.* **133**, 282–288 (2018).
 27. Fong, T.-T. & Lipp, E. K. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments : Health Risks , Detection , and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 357–371 (2005).
 28. Zhang, C.-M., Xu, L.-M., Xu, P.-C. & Wang, X. C. Elimination of viruses from domestic wastewater: requirements and technologies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 69 (2016).
 29. Hardy, M. E. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**, 1–8 (2005).
 30. Martella, V., Lorusso, E., Decaro, N., Elia, G., Radogna, A., D’Abramo, M., Desario, C., Cavalli, A., Corrente, M., Camero, M., Germinario, C. A., Bányai, K., Di Martino, B., Marsilio, F., Carmichael, L. E. & Buonavoglia, C. Detection and Molecular Characterization of a Canine Norovirus. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1306–1308 (2008).
 31. Strubbia, S., Schaeffer, J., Oude Munnink, B. B., Besnard, A., Phan, M. V. T., Nieuwenhuijse, D. F., de Graaf, M., Schapendonk, C. M. E., Wacrenier, C., Cotten, M., Koopmans, M. P. G. & Le Guyader, F. S. Metavirome Sequencing to Evaluate Norovirus Diversity in Sewage and Related Bioaccumulated Oysters. *Front. Microbiol.* **10**, 2394 (2019).
 32. Santiso-Bellón, C., Randazzo, W., Pérez-Cataluña, A., Vila-Vicent, S., Gozalbo-Rovira, R., Muñoz, C., Buesa, J., Sanchez, G. & Rodríguez Díaz, J. Epidemiological Surveillance of Norovirus and Rotavirus in Sewage (2016–2017) in Valencia (Spain). *Microorganisms* **8**, 458 (2020).
 33. de Graaf, M., Villabruna, N. & Koopmans, M. P. Capturing norovirus transmission. *Curr. Opin. Virol.* **22**, 64–70 (2017).
 34. Purpari, G., Macaluso, G., Di Bella, S., Gucciardi, F., Mira, F., Di Marco, P., Lastra, A., Petersen, E., La Rosa, G. & Guercio, A. Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. *Int. J. Infect. Dis.* **80**, 66–72 (2019).
 35. Vasickova, P., Dvorska, L., Lorencova, A. & Pavlik, I. Viruses as a cause of foodborne diseases:

- a review of the literature. *Vet. Med. (Praha)*. **50**, 89–104 (2005).
36. Taylor, M. B. Water and foodborne viruses: current developments. *Contin. Med. Educ.* **29**, 207–209 (2011).
 37. Le Pendu, J., Ruvoën-Clouet, N., Kindberg, E. & Svensson, L. Mendelian resistance to human norovirus infections. *Semin. Immunol.* **18**, 375–386 (2006).
 38. Wang, H., Wang, X., Cao, J., Gao, Y., Zhou, W. & Bi, S. Full-length genome characterization and quasispecies distribution of hepatitis A virus isolates in China. *Virol. Reports* **5**, 29–46 (2015).
 39. Adefisoye, M. A., Nwodo, U. U., Green, E. & Okoh, A. I. Quantitative PCR Detection and Characterisation of Human Adenovirus, Rotavirus and Hepatitis A Virus in Discharged Effluents of Two Wastewater Treatment Facilities in the Eastern Cape, South Africa. *Food Environ. Virol.* **8**, 262–274 (2016).
 40. Ouardani, I., Turki, S., Aouni, M. & Romalde, J. L. Detection and Molecular Characterization of Hepatitis A Virus from Tunisian Wastewater Treatment Plants with Different Secondary Treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3834–3845 (2016).
 41. Centers for Disease Control and Prevention. Details - Public Health Image Library(PHIL). <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=2739> (2019).
 42. Mykytczuk, O., Harlow, J., Bidawid, S., Corneau, N. & Nasheri, N. Prevalence and Molecular Characterization of the Hepatitis E Virus in Retail Pork Products Marketed in Canada. *Food Environ. Virol.* **9**, 208–218 (2017).
 43. Nagashima, S., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nishizawa, T., Nishiyama, T., Primadharsini, P. P. & Okamoto, H. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J. Virol.* **91**, e00822-17 (2017).
 44. Nan, Y. & Zhang, Y.-J. Molecular Biology and Infection of Hepatitis E Virus. *Front. Microbiol.* **7**, 1419 (2016).
 45. Centers for Disease Control and Prevention. Details - Public Health Image Library(PHIL). <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=5605> (2019).
 46. Lion, T. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 441–462 (2014).
 47. Saha, B., Wong, C. M. & Parks, R. J. The Adenovirus Genome Contributes to the Structural Stability of the Virion. *Viruses* **6**, 3563–3583 (2014).
 48. Goldsmith, C. S. & Miller, S. E. Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 552–563 (2009).
 49. Ferenczy, M. W., Marshall, L. J., Nelson, C. D. S., Atwood, W. J., Nath, A., Khalili, K. & Major, E. O. Molecular Biology, Epidemiology, and Pathogenesis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, the JC Virus-Induced Demyelinating Disease of the Human Brain. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 471–506 (2012).
 50. Fratini, M., Di Bonito, P. & La Rosa, G. Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for Waterborne Transmission? *Food Environ. Virol.* **6**, 1–12 (2014).
 51. Pinto, M. & Dobson, S. BK and JC virus: A review. *J. Infect.* **68**, S2–S8 (2014).
 52. Moens, U., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., Ramqvist, T., Feltkamp, M. C. W., Daugherty, M. D., Verschoor, E. J. & Ehlers, B. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 1159–1160 (2017).
 53. Ryschkewitsch, C. F., Jensen, P. N. & Major, E. O. Multiplex qPCR assay for ultra sensitive detection of JCV DNA with simultaneous identification of genotypes that discriminates non-virulent from virulent variants. *J. Clin. Virol.* **57**, 243–248 (2013).

54. Ahmed, W., Harwood, V. J., Gyawali, P., Sidhu, J. P. S. & Toze, S. Comparison of Concentration Methods for Quantitative Detection of Sewage-Associated Viral Markers in Environmental Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 2042–2049 (2015).
55. Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J. R., Masago, Y., Sano, D. & Katayama, H. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* **135**, 168–186 (2018).
56. Calgua, B., Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Suñen, E., Calvo, M., Bofill-Mas, S. & Girones, R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* **187**, 215–221 (2013).
57. Hjelmshø, M. H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenko, O., Seidel, M., Elsässer, D., Aarestrup, F. M., Löfström, C., Bofill-Mas, S., Abril, J. F., Girones, R. & Schultz, A. C. Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS One* **12**, e0170199 (2017).
58. Iker, B. C., Bright, K. R., Pepper, I. L., Gerba, C. P. & Kitajima, M. Evaluation of commercial kits for the extraction and purification of viral nucleic acids from environmental and fecal samples. *J. Virol. Methods* **191**, 24–30 (2013).
59. Mattison, K. & Bidawid, S. Analytical Methods for Food and Environmental Viruses. *Food Environ. Virol.* **1**, 107–122 (2009).
60. Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. *Microbiology: An Introduction*. (Benjamin Cummings, 2010).
61. Duizer, E., Schwab, K. J., Neill, F. H., Atmar, R. L., Koopmans, M. P. G. & Estes, M. K. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J. Gen. Virol.* **85**, 79–87 (2004).
62. Straub, T. M., Höner zu Bentrup, K., Coghlan, P. O., Dohnalkova, A., Mayer, B. K., Bartholomew, R. A., Valdez, C. O., Bruckner-Lea, C. J., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M. A. & Nickerson, C. A. In Vitro Cell Culture Infectivity Assay for Human Noroviruses. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 396–403 (2007).
63. Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E. & Okamoto, H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* **88**, 903–911 (2007).
64. Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., Hundesa, A., Carratala, A. & Bofill-Mas, S. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Res.* **44**, 4325–4339 (2010).
65. Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alkan, C., Izri, A., Gould, E. A. & Charrel, R. N. Arthropods as a source of new RNA viruses. *Microb. Pathog.* **77**, 136–141 (2014).
66. Mackay, I. M. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1292–1305 (2002).
67. Freeman, W. M., Walker, S. J. & Vrana, K. E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potencial. *Biotechniques* **26**, 112–125 (1999).
68. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* **27**, 95–125 (2006).
69. van Pelt-Verkuil, E., van Belkum, A. & Hays, J. P. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. (Springer Netherlands, 2008).
70. Newton, C. R. & Graham, A. *PCR*. (BIOS Scientific Publishers, 1997).
71. Mokili, J. L., Rohwer, F. & Dutilh, B. E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 63–77 (2012).
72. Bridge, J. A. Reverse transcription-polymerase chain reaction molecular testing of cytology specimens: Pre-analytic and analytic factors. *Cancer Cytopathol.* **125**, 11–19 (2016).
73. Lallemand, F., Desire, N., Rozenbaum, W., Nicolas, J.-C. & Marechal, V. Quantitative Analysis

- of Human Herpesvirus 8 Viral Load Using a Real-Time PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1404–1408 (2000).
74. Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P. A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D. & Markham, A. F. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* **3**, 18 (2003).
 75. Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. & Patel, H. R. H. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **5**, 209–219 (2005).
 76. Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R. & Smith, T. F. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 165–256 (2006).
 77. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986–994 (1996).
 78. Abe, A., Inoue, K., Tanaka, T., Kato, J., Kajiyama, N., Kawaguchi, R., Tanaka, S., Yoshida, M. & Kohara, M. Quantitation of Hepatitis B Virus Genomic DNA by Real-Time Detection PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2899–2903 (1999).
 79. Kainz, P. The PCR plateau phase – towards an understanding of its limitations. *Biochim. Biophys. Acta* **1494**, 23–27 (2000).
 80. Gruber, F., Falkner, F. G., Dorner, F. & Hämmerle, T. Quantitation of Viral DNA by Real-Time PCR Applying Duplex Amplification, Internal Standardization, and Two-Color Fluorescence Detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2837–2839 (2001).
 81. Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. & Gelfand, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 7276–7280 (1991).
 82. Livak, K. J., Flood, S. J. A., Marmaro, J., Giusti, W. & Deetz, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res.* **4**, 357–362 (1995).
 83. Gibson, U. E. M., Heid, C. A. & Williams, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**, 995–1001 (1996).
 84. Josefsson, A., Livak, K. & Gyllensten, U. Detection and Quantitation of Human Papillomavirus by Using the Fluorescent 5' Exonuclease Assay. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 490–496 (1999).
 85. Clementi, M. Quantitative Molecular Analysis of Virus Expression and Replication. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2030–2036 (2000).
 86. Ginzinger, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Exp. Hematol.* **30**, 503–512 (2002).
 87. Ryncarz, A. J., Goddard, J., Wald, A., Huang, M.-L., Roizman, B. & Corey, L. Development of a High-Throughput Quantitative Assay for Detecting Herpes Simplex Virus DNA in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1941–1947 (1999).
 88. Butler, J. *Forensic DNA typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. (Elsevier Academic Press, 2005).
 89. Firth, C. & Lipkin, W. I. The Genomics of Emerging Pathogens. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **14**, 281–300 (2013).
 90. Bexfield, N. & Kellam, P. Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *Vet. J.* **190**, 191–198 (2011).
 91. Martínez-Puchol, S., Rusiñol, M., Fernández-Cassi, X., Timoneda, N., Itarte, M., Andrés, C.,

- Antón, A., Abril, J. F., Girones, R. & Bofill-Mas, S. Characterisation of the sewage virome: comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. *Sci. Total Environ.* **713**, 136604 (2020).
92. Wong, K., Fong, T.-T., Bibby, K. & Molina, M. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ. Int.* **45**, 151–164 (2012).
 93. Marston, D. A., McElhinney, L. M., Ellis, R. J., Horton, D. L., Wise, E. L., Leech, S. L., David, D., de Lamballerie, X. & Fooks, A. R. Next generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC Genomics* **14**, 444 (2013).
 94. Fumian, T. M., Fioretti, J. M., Lun, J. H., dos Santos, I. A. L., White, P. A. & Miagostovich, M. P. Detection of norovirus epidemic genotypes in raw sewage using next generation sequencing. *Environ. Int.* **123**, 282–291 (2019).
 95. Illumina. Sistema MiSeq®. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/miseq-data-sheet-770-2011-001-translations/miseq-specification-sheet-770-2011-001-ptb.pdf> (2019).
 96. Djikeng, A., Halpin, R., Kuzmickas, R., DePasse, J., Feldblyum, J., Sengamalay, N., Afonso, C., Zhang, X., Anderson, N. G., Ghedin, E. & Spiro, D. J. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics* **9**, 5 (2008).
 97. Wen, Y.-M. & Wang, Y.-X. Biological features of hepatitis B virus isolates from patients based on full-length genomic analysis. *Rev. Med. Virol.* **19**, 57–64 (2009).
 98. Rodrigues, F. V. Assessment of jc virus in portuguese wastewaters: impact on public health. (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2015).
 99. Promega. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf> (2019).
 100. EndMemo. DNA/RNA Copy Number Calculator. <http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php> (2019).
 101. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622 (2009).
 102. Rodríguez, R. A., Bounty, S. & Linden, K. G. Long-range quantitative PCR for determining inactivation of adenovirus 2 by ultraviolet light. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 1854–1865 (2013).
 103. Ramanan, P., Espy, M. J., Khare, R. & Binnicker, M. J. Detection and differentiation of norovirus genogroups I and II from clinical stool specimens using real-time PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **87**, 325–327 (2017).
 104. Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Takeda, N. & Katayama, K. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1548–1557 (2003).
 105. Costafreda, M. I., Bosch, A. & Pintó, R. M. Development, Evaluation, and Standardization of a Real-Time TaqMan Reverse Transcription-PCR Assay for Quantification of Hepatitis A Virus in Clinical and Shellfish Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3846–3855 (2006).
 106. Genome Detective. Genome Detective Virus Tool. <https://www.genomedetective.com/app/typingtool/virus/> (2020).
 107. Centers for Disease Control and Prevention. Effect of Chlorination on Inactivating Selected Pathogen. <https://www.cdc.gov/safewater/effectiveness-on-pathogens.html> (2019).
 108. Koivunen, J. & Heinonen-Tanski, H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical

- disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. *Water Res.* **39**, 1519–1526 (2005).
109. Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A. ., López-Pila, J. . & Girones, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Methods* **153**, 79–83 (2008).
 110. Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Calgua, B., Rusiñol, M., Maluquer de Motes, C. & Girones, R. Cost-effective Method for Microbial Source Tracking Using Specific Human and Animal Viruses. *J. Vis. Exp.* **58**, e2820 (2011).
 111. Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Carratalà, A., Abril, J. F., Silvera, C., Figueras, M. J., Gelati, E., Rodó, X., Kay, D., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S. & Girones, R. Evidence of viral dissemination and seasonality in a Mediterranean river catchment: Implications for water pollution management. *J. Environ. Manage.* **159**, 58–67 (2015).
 112. Melgaço, F. G., Victoria, M., Corrêa, A. A., Ganime, A. C., Malta, F. C., Brandão, M. L. L., de Mello Medeiros, V., de Oliveira Rosas, C., Bricio, S. M. L. & Miagostovich, M. P. Virus recovering from strawberries: Evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination. *Int. J. Food Microbiol.* **217**, 14–19 (2016).
 113. Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Martínez-Puchol, S., Rusiñol, M., Rodriguez-Manzano, J., Figuerola, N., Bofill-Mas, S., Abril, J. F. & Girones, R. Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. *Sci. Total Environ.* **618**, 870–880 (2018).
 114. Thermo Scientific. Assessment of Nucleic Acid Purity. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf> (2019).
 115. Hellmér, M., Paxéus, N., Magnius, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., Bergström, T. & Norder, H. Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 6771–6781 (2014).
 116. Teixeira, P., Costa, S., Brown, B., Silva, S., Rodrigues, R. & Valério, E. Quantitative PCR Detection of Enteric Viruses in Wastewater and Environmental Water Sources by the Lisbon Municipality: A Case Study. *Water* **12**, 544 (2020).
 117. Jurzik, L., Hamza, I. A. & Wilhelm, M. Investigating the Reduction of Human Adenovirus (HAdV) and Human Polyomavirus (HPyV) in a Sewage Treatment Plant with a Polishing Pond as a Tertiary Treatment. *Water, Air, Soil Pollut.* **226**, 284 (2015).
 118. Lipp, E. K., Kurz, R., Vincent, R., Rodriguez-Palacios, C., Farrah, S. R. & Rose, J. B. The Effects of Seasonal Variability and Weather on Microbial Fecal Pollution and Enteric Pathogens in a Subtropical Estuary. *Estuaries* **24**, 266–276 (2001).
 119. Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. & Girones, R. Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3376–3382 (1998).
 120. Fong, T.-T., Phanikumar, M. S., Xagorarakis, I. & Rose, J. B. Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 715–723 (2010).
 121. Nwachuku, N., Gerba, C. P., Oswald, A. & Mashadi, F. D. Comparative Inactivation of Adenovirus Serotypes by UV Light Disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5633–5636 (2005).
 122. La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M. & Muscillo, M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Ann. Ist. Super. Sanita* **46**, 266–273 (2010).
 123. Masclaux, F. G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D. & Oppliger, A. High occurrence of

- hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Res.* **47**, 5101–5109 (2013).
124. Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. A., Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H. & Graham, D. Y. Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1553–1557 (2008).
 125. Oliveira, R., Mesquita, J. R., Pereira, S., Abreu-Silva, J., Teixeira, J. & Nascimento, M. S. J. Seroprevalence of Hepatitis E Virus Antibodies in Portuguese Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **36**, 623–626 (2017).
 126. Nascimento, M. S. J., Pereira, S. S., Teixeira, J., Abreu-Silva, J., Oliveira, R. M. S., Myrmel, M., Stene-Johansen, K., Øverbø, J., Gonçalves, G. & Mesquita, J. R. A nationwide serosurvey of hepatitis E virus antibodies in the general population of Portugal. *Eur. J. Public Health* **28**, 720–724 (2018).
 127. Berto, A., Backer, J. A., Mesquita, J. R., Nascimento, M. S., Banks, M., Martelli, F., Ostanello, F., Angeloni, G., Di Bartolo, I., Ruggeri, F. M., Vasickova, P., Diez-Valcarce, M., Hernandez, M., Rodriguez-Lazaro, D. & van der Poel, W. H. Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. *BMC Res. Notes* **5**, 190 (2012).
 128. Mesquita, J. R., Oliveira, R. M. S., Coelho, C., Vieira-Pinto, M. & Nascimento, M. S. J. Hepatitis E Virus in Sylvatic and Captive Wild Boar from Portugal. *Transbound. Emerg. Dis.* **63**, 574–578 (2016).
 129. Matos, A., Mesquita, J. R., Gonçalves, D., Abreu-Silva, J., Luxo, C. & Nascimento, M. S. J. First detection and molecular characterization of hepatitis E virus in water from wastewater treatment plants in Portugal. *Ann. Agric. Environ. Med.* **25**, 364–367 (2018).
 130. Beyer, S., Szewzyk, R., Gnirss, R., Johne, R. & Selinka, H.-C. Detection and Characterization of Hepatitis E Virus Genotype 3 in Wastewater and Urban Surface Waters in Germany. *Food Environ. Virol.* **12**, 137–147 (2020).
 131. Huang, Z., Zhang, C., Li, W., Fang, X., Wang, Q., Xing, L., Li, Y., Nie, X., Yang, B. & Zhang, W. Metagenomic next-generation sequencing contribution in identifying prosthetic joint infection due to *Parvimonas micra*: a case report. *J. Bone Jt. Infect.* **4**, 50–55 (2019).
 132. Bosch, A., Pintó, R. M. & Guix, S. Human Astroviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 1048–1074 (2014).
 133. Yi, S., Niu, J., Wang, H., Dong, G., Guo, Y., Dong, H., Wang, K. & Hu, G. Molecular characterization of feline astrovirus in domestic cats from Northeast China. *PLoS One* **13**, e0205441 (2018).
 134. Meleg, E., Jakab, F., Kocsis, B., Bányai, K., Meleg, B. & Szűcs, G. Human astroviruses in raw sewage samples in Hungary. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 1123–1129 (2006).
 135. Qiu, J., Söderlund-Venermo, M. & Young, N. S. Human Parvoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 43–113 (2017).
 136. Cossart, Y. E., Cant, B., Field, A. M. & Widdows, D. Parvovirus-Like Particles in Human Sera. *Lancet* **305**, 72–73 (1975).
 137. Jartti, T., Hedman, K., Jartti, L., Ruuskanen, O., Allander, T. & Söderlund-Venermo, M. Human bocavirus—the first 5 years. *Rev. Med. Virol.* **22**, 46–64 (2012).
 138. Iaconelli, M., Divizia, M., Della Libera, S., Di Bonito, P. & La Rosa, G. Frequent Detection and Genetic Diversity of Human Bocavirus in Urban Sewage Samples. *Food Environ. Virol.* **8**, 289–295 (2016).
 139. Myrmel, M., Lange, H. & Rimstad, E. A 1-Year Quantitative Survey of Noro-, Adeno-, Human Boca-, and Hepatitis E Viruses in Raw and Secondarily Treated Sewage from Two Plants in Norway. *Food Environ. Virol.* **7**, 213–223 (2015).

140. Ambert-Balay, K., Lorrot, M., Bon, F., Giraudon, H., Kaplon, J., Wolfer, M., Lebon, P., Gendrel, D. & Pothier, P. Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Virus Strains in Stool Samples from Community and Hospitalized Patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1252–1258 (2008).
141. Blinkova, O., Rosario, K., Li, L., Kapoor, A., Slikas, B., Bernardin, F., Breitbart, M. & Delwart, E. Frequent Detection of Highly Diverse Variants of Cardiovirus, Cosavirus, Bocavirus, and Circovirus in Sewage Samples Collected in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3507–3513 (2009).
142. Räsänen, S., Lappalainen, S., Kaikkonen, S., Hamalainen, M., Salminen, M. & Vesikari, T. Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiol. Infect.* **138**, 1227–1234 (2010).
143. Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Hovi, T., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Lindberg, A. M., Pallansch, M. A., Palmenberg, A. C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G. & Yamashita, T. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2421–2422 (2017).
144. Di Martino, B., Di Profio, F., Ceci, C., Di Felice, E. & Marsilio, F. Molecular detection of Aichi virus in raw sewage in Italy. *Arch. Virol.* **158**, 2001–2005 (2013).
145. Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K.-O., Torvén, M., Bonsdorff, C.-H. van, Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szücs, G., Melegh, B., Svennson, L., van Duynhoven, Y., Koopmans, M. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* **363**, 682–688 (2004).
146. Lodder, W. J. & de Roda Husman, A. M. Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1453–1461 (2005).

6. Anexos

6.1. Sistema comercial *QIAamp*[®] *Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN[®])

Inicialmente, adicionaram-se 560 µL da solução tampão AVL com o *carrier* RNA a partir de 140 µL dos concentrados, homogeneizaram-se por meio de agitação no vórtex durante 15 segundos e incubaram-se à temperatura ambiente durante 10 minutos, promovendo a lise celular e a inativação das RNases. Após um *short spin* adicionaram-se 560 µL de etanol (96-100%) e homogeneizaram-se por meio de agitação no vórtex durante 15 segundos. Após um *short spin*, transferiram-se 630 µL das misturas para colunas *QIAamp Mini spin* providenciados pelo *kit* (colocados em tubos Eppendorf[®] de 2 mL), à qual se seguiu uma centrifugação a 8 000 rpm durante 1 minuto. Descartaram-se os eluídos, adicionaram-se 500 µL de solução tampão de lavagem AW1 e repetiu-se a centrifugação a 8 000 rpm durante 1 minuto. Após descartaram-se os eluídos, adicionaram-se 500 µL de solução tampão de lavagem AW2 e centrifugaram-se a 14 000 rpm durante 3 minutos. Após descarte dos eluídos, repetiu-se uma centrifugação a 12 500 rpm durante 1 minuto, de forma a garantir a secagem da coluna. Em seguida, colocaram-se as colunas *QIAamp Mini spin* em novos tubos Eppendorf[®] de 1,5 mL e adicionaram-se 40 µL de solução tampão *RNase free* (AVE) no centro da coluna, incubando-se à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugaram-se a 8 000 rpm durante 1 minuto. Por fim, descartaram-se as colunas *QIAamp Mini spin* e armazenaram-se as amostras de RNA's a -80 °C até posterior utilização.

6.2. Sistema comercial *NZYGelpure kit* (NZYTech)

Inicialmente, adicionaram-se 90 µL da solução de ligação às amostras (produtos de PCR), inverteram-se os tubos Eppendorf[®] de 1,5 mL. Após um *short spin*, transferiram-se as misturas para colunas *NZYTech spin* (colocados em tubos Eppendorf[®] de 2 mL) providenciados pelo *kit*, incubando-se a temperatura ambiente durante 2 minutos, à qual se seguiu uma centrifugação a 12 500 rpm durante 1 min. Descartaram-se os eluídos, adicionaram-se à coluna 600 µL da solução de lavagem e centrifugaram-se a 12 500 rpm durante 1 min. Descartaram-se os eluídos e repetiu-se a centrifugação a 12 500 rpm durante 1 minuto, de forma a garantir a secagem da coluna. Em seguida, colocaram-se as colunas *NZYTech spin* em novos tubos Eppendorf[®] de 1,5 mL e adicionaram-se 50 µL de solução de eluição (pré-aquecida a 55°C) no centro da coluna e centrifugaram-se a 12 500 rpm durante 1 min. Por fim, descartaram-se as colunas *NZYTech spin* e armazenaram-se os produtos de PCR purificados a -20°C até posterior utilização.

6.3. Quantificação e ácidos nucleicos extraídos a partir dos concentrados virais para qPCR *TaqMan*

A partir dos concentrados virais das amostras recolhidas em ambas as ETAR's no Outono de 2018 (Outubro) e Primavera de 2019 (Abril), extraíram-se os ácidos nucleicos através do sistema comercial *QIAamp*[®] *Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN[®]) para, posteriormente, serem submetidos a qPCR para detecção/quantificação dos genomas virais alvo em estudo. A quantificação das concentrações de

RNA e o grau de pureza através do espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) estão disponíveis na figura 6.1.

ID Amostra	ng/ul	260/280	260/230
ETAR X Influyente1	38,50	2,86	0,29
ETAR X Influyente2	58,61	2,71	0,45
ETAR X Influyente3	49,72	3,01	0,31
ETAR X Rio1	66,77	2,57	0,33
ETAR X Rio2	57,19	2,96	0,20
ETAR X Rio3	57,87	2,91	0,42
ETAR X Antes Hipoclorito1	25,21	3,11	0,15
ETAR X Antes Hipoclorito2	57,11	3,21	0,40
ETAR X Antes Hipoclorito3	31,85	3,40	0,19
ETAR X Reutilizável1	66,91	3,09	0,35
ETAR X Reutilizável2	40,88	2,81	0,24
ETAR X Reutilizável3	35,80	3,33	0,14
ETAR Y Influyente1	79,25	2,23	0,49
ETAR Y Influyente2	87,54	2,51	0,52
ETAR Y Influyente3	73,71	2,48	0,52
ETAR Y Rio1	130,64	2,30	0,74
ETAR Y Rio2	133,06	2,33	0,40
ETAR Y Rio3	106,00	2,39	0,64
ETAR Y Reutilizável1	61,71	2,26	0,17
ETAR Y Reutilizável2	76,71	2,62	0,23
ETAR Y Reutilizável3	81,38	2,57	0,16
ETAR X Influyente1	7,56	4,85	0,05
ETAR X Influyente2	11,65	4,11	0,06
ETAR X Influyente3	17,74	2,57	0,15
ETAR X Rio1	55,35	2,01	0,19
ETAR X Rio2	57,56	2,01	0,39
ETAR X Rio3	29,28	1,94	0,19
ETAR X Antes Hipoclorito1	17,71	2,34	0,07
ETAR X Antes Hipoclorito2	21,38	2,24	0,15
ETAR X Antes Hipoclorito3	35,75	2,12	0,31
ETAR X Reutilizado1	21,12	2,09	0,06
ETAR X Reutilizado2	22,10	2,06	0,15
ETAR X Reutilizado3	31,34	1,99	0,19
ETAR Y Influyente1	51,93	2,01	0,23
ETAR Y Influyente2	37,76	2,03	0,17
ETAR Y Influyente3	42,37	1,99	0,21
ETAR Y Após Lamas1	35,60	1,93	0,27
ETAR Y Após Lamas2	28,26	2,01	0,12
ETAR Y Após Lamas3	42,33	2,06	0,12
ETAR Y Rio1	8,38	3,91	0,04
ETAR Y Rio2	15,34	2,58	0,03
ETAR Y Rio3	9,20	2,81	0,06
ETAR Y Reutilizado1	15,84	2,29	0,12
ETAR Y Reutilizado2	17,85	2,54	0,03
ETAR Y Reutilizado3	12,74	2,75	0,05

Figura 6.1 - Concentrações de RNA e graus de pureza obtidos da extração de ácidos nucleicos a partir dos concentrados virais das amostras das ETAR's X e Y, recolhidas no Outono de 2018 e na Primavera de 2019 (Abril).

6.4. Quantificação de ácido desoxirribonucleico plasmídico

A partir das clonagens realizadas com os fragmentos de interesse de AdV e PyV, extraíram-se os DNA's plasmídicos através do sistema comercial *NZYMiniprep kit* (NZYTech) e quantificou-se as respectivas concentrações e grau de pureza através do espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific), sendo estas apresentadas na figura 6.2.

ID Amostra	ng/ul	260/280	260/230
DNA Plasmídeo AdV1	168,68	1,93	2,02
DNA Plasmídeo AdV2	157,81	1,93	1,99
DNA Plasmídeo AdV3	171,08	1,90	2,01
DNA Plasmídeo PyV1	86,03	1,89	1,77
DNA Plasmídeo PyV2	93,37	1,91	1,81
DNA Plasmídeo PyV3	80,23	1,88	1,75

Figura 6.2 - Concentrações de DNA plasmídico e grau de pureza obtidos da sua extração a partir de clones com fragmentos de Adenovírus (AdV) e Polyomavírus (PyV).

6.5. Quantificação de ácidos nucleicos extraídos a partir dos concentrados virais para NGS

A partir dos concentrados virais das amostras recolhidas em ambas as ETAR's na Primavera de 2019 (Abril), extraíram-se os ácidos nucleicos através do sistema comercial *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN®) para, posteriormente, serem submetidos a uma avaliação da comunidade viral por análise metagenómica por NGS. A quantificação das concentrações de RNA e o grau de pureza através do espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) estão visíveis na figura 6.3.

ID Amostra	ng/ul	260/280	260/230
ETAR X Influyente1	65.56	3.02	0.45
ETAR X Influyente2	62.08	3.00	0.37
ETAR X Influyente3	68.85	2.91	0.44
ETAR X Rio1	81.65	2.51	0.18
ETAR X Rio2	102.46	2.42	0.21
ETAR X Rio3	75.71	2.62	0.18
ETAR X Antes Hipoclorito1	82.16	2.88	0.52
ETAR X Antes Hipoclorito2	83.62	2.86	0.37
ETAR X Antes Hipoclorito3	96.73	2.64	0.53
ETAR X Reutilizável1	65.41	3.09	0.28
ETAR X Reutilizável2	85.54	2.97	0.60
ETAR X Reutilizável3	94.55	2.74	0.43
ETAR Y Influyente1	114.03	2.28	0.48
ETAR Y Influyente2	112.76	2.36	0.61
ETAR Y Influyente3	102.75	2.51	0.66
ETAR Y Após Lamas1	101.23	2.47	0.61
ETAR Y Após Lamas2	96.03	2.56	0.24
ETAR Y Após Lamas3	103.74	2.51	0.24
ETAR Y Rio1	70.36	3.05	0.51
ETAR Y Rio2	80.61	2.62	0.54
ETAR Y Rio3	61.14	2.69	0.29
ETAR Y Reutilizável1	69.90	2.81	0.22
ETAR Y Reutilizável2	72.55	2.99	0.19
ETAR Y Reutilizável3	74.50	2.91	0.52

Figura 6.3 - Concentrações de RNA e graus de pureza obtidos da extração de ácidos nucleicos a partir dos concentrados virais das amostras das ETAR's X e Y, recolhidas na Primavera de 2019 (Abril).