

Deteção de vírus entéricos em amostras de água natural superficial e de água para consumo humano

Daniel Salvador^{a, b, c*}, Maria Filomena Caeiro^b, Joana Aguilár^c,
Maria João Benoliel^c, Célia Neto^c

^a Instituto de Saúde Ambiental, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Avenida Prof. Egas Moniz, Piso 0, Ala C, 1649-028 Lisboa, Portugal

^b Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

^c Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A., Direção Laboratórios e de Controlo da Qualidade de Água, Avenida de Berlim, 15, 1800-031 Lisboa, Portugal

Resumo

As doenças infecciosas relacionadas com a água são uma importante causa de morbilidade e mortalidade. Dos vários agentes causadores de doença destacam-se os vírus entéricos representados, entre outros, pelos *Enterovirus* e pelos vírus das Hepatites A e E, que se transmitem principalmente pela via oral-fecal, através da água. Objetiva-se com este estudo a pesquisa de vírus entéricos por transcrição reversa seguida de PCR em Tempo Real (RT-qPCR), em amostras de água natural superficial e de água para consumo humano. Pretende-se também avaliar a eventual associação destes vírus com outros indicadores de contaminação fecal e a eficácia dos sistemas de tratamento de água na sua eliminação em Estações de Tratamento. Verificou-se a adequação da metodologia implementada uma vez que, nas 15 amostras analisadas até à data, foram detetados RNAs virais em amostras de água natural superficial: do vírus da Hepatite A em duas amostras e de *Enterovirus* em três amostras. Numa destas amostras foram detetados ambos os vírus. O vírus da Hepatite E não foi detetado. Em amostras de água para consumo humano não foram detetados ácidos nucleicos virais. Os coliformes fecais (indicadores microbianos de contaminação fecal) foram encontrados e quantificados em amostras de água natural, mas não em amostras de água para consumo humano. A deteção de RNA viral e de coliformes fecais foi apenas parcialmente coincidente.

Palavras-Chave: água, coliformes fecais, RT-qPCR, saúde humana, vírus entéricos

doi: 10.22181/aer.2020.0701

* Autor para correspondência
E-mail: daniel_fsalvador@hotmail.com

Detection of enteric viruses in samples of natural surface water and drinking water

Daniel Salvador^{a, b, c*}, Maria Filomena Caeiro^b, Joana Aguilar^c,
Maria João Benoliel^c, Célia Neto^c

^a Instituto de Saúde Ambiental, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Avenida Prof. Egas Moniz, Piso 0, Ala C, 1649-028 Lisboa, Portugal

^b Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

^c Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A., Direção Laboratórios e de Controlo da Qualidade de Água, Avenida de Berlim, 15, 1800-031 Lisboa, Portugal

Abstract

Water-related infectious diseases are important causes of morbidity and mortality. *Enterovirus* and Hepatitis A and E viruses are, among others, representative of the enteric viruses, which are disease-causing agents mainly transmitted by the oral-fecal route, through water. The objective of this study is to search for enteric viruses by reverse transcription followed by Real-time PCR (RT-qPCR), in samples of natural surface water and in drinking water. It is also intended to evaluate the eventual association of these viruses with other fecal contamination indicators, and the efficacy of the water treatment plants in their elimination. It was confirmed the adequacy of the methodology implemented since, in the 15 samples analyzed so far, Hepatitis A virus and *Enterovirus* RNAs were detected in natural surface water samples, in two and three samples, respectively. Both viruses RNAs were detected in one of these samples. No viral nucleic acids were detected in drinking water samples. Fecal coliforms (microbial indicators of fecal contamination) were detected in natural water samples, but not in drinking water samples. Viral RNA and coliform detection only partially co-occurred.

Keywords: enteric viruses, fecal coliforms, human health, RT-qPCR, water

doi: 10.22181/aer.2020.0701

* Corresponding author
E-mail: daniel_fsalvador@hotmail.com

1 Introdução

O crescimento da população humana tem levado a um aumento da pressão sobre a quantidade e qualidade dos recursos hídricos do planeta. Atualmente, as doenças infecciosas relacionadas com a água são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WHO 2003). Estima-se que em 2012, pelo menos 1,8 bilhões de humanos tenham utilizado água contaminada e que cerca de 90% das mortes por diarreia resultaram de saneamento inadequado e do consumo de água contaminada com agentes patogénicos (UNICEF 2012).

A água contaminada poderá conter, entre muitos outros microrganismos, bactérias, protozoários e vírus entéricos (WHO 2003). Os vírus entéricos, que se distribuem por várias famílias, têm cápsides robustas que lhes permitem manter-se infecciosos durante muito tempo sob condições adversas (Eifan 2013). É esse o caso dos *Enterovirus*, Vírus das Hepatites A e E, *Norovirus*, *Rotavirus* e *Sapovirus*, apontados pela Organização Mundial da Saúde como tendo uma elevada significância na saúde humana (WHO 2017).

Os *Enterovirus*, da família *Picornaviridae*, são pequenos vírus com genoma de RNA que se encontram distribuídos por todo o mundo. Nos Estados Unidos, causam mais de 10 milhões de infeções e vários milhares de hospitalizações por ano (Sinclair et al. 2009). Em Portugal, num estudo realizado pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) com 625 amostras fecais recebidas entre 2010-2013, 22,9% das amostras eram positivas para *Enterovirus* (Palminha et al. 2015). A maioria das infeções é assintomática, e quando a doença ocorre pode provocar febre, sintomas de infeção do trato respiratório superior, doença paralítica, poliomielite, meningite, paralisia, miocardite ou síndrome mão-pé-boca (Bruu et al. 2002, Sinclair et al. 2009).

O vírus da Hepatite A (HAV), também da família *Picornaviridae*, é um vírus de RNA que causa a hepatite viral aguda mais comum no mundo, com aproximadamente 1,4 milhões de casos clínicos descritos anualmente e mais de 100 000 mortes (Sinclair et al. 2009, Yong e Son 2009). Em Portugal, Pereira et al. (2014) estudaram retrospectivamente 7 894 amostras de sangue colhidas entre 2002-2012 e concluíram que 60% apresentavam anticorpos para o HAV. A hepatite A é uma doença de declaração obrigatória, tendo sido reportados 554 casos em 2017 à Direção-Geral de Saúde (DGS 2017). A maioria das infeções é silenciosa em crianças com idade inferior a cinco anos. Em crianças mais velhas e adultos, os sintomas mais comuns são urina escura, diarreia, dor abdominal, febre, náusea, icterícia e anorexia (Yong e Son 2009).

O vírus da Hepatite E (HEV), da família *Hepeviridae*, é um vírus de RNA que se estima infetar 20 milhões de pessoas em todo o mundo, com 57 000 mortes anuais (Asghar 2014, WHO 2016). Em Portugal, um estudo conduzido pelo INSA que incluiu 297 amostras de soro recebidas entre 2000 e 2012, relativos a casos com diagnóstico de hepatite de origem desconhecida, mostrou a existência de 20,2% de indivíduos com anticorpos para HEV (Ferreira et al. 2013). Os sintomas clínicos são semelhantes aos da infeção por HAV (Ferreira et al. 2013, WHO 2016).

Os vírus entéricos transmitem-se aos seres humanos por diversas vias como contacto pessoa-pessoa, aerossóis, ingestão de alimentos contaminados, mas sobretudo pela via oral-fecal, sendo a água um dos veículos de transmissão mais frequentes (WHO 2017). Estes vírus são muito resistentes à desinfeção, aquecimento, pressão e pH baixo da água (Haramoto et al. 2018). Para que ocorra a sua eliminação ou perda de infecciosidade na água, é necessário utilizar processos com cloro, ozono e/ou exposição à radiação ultravioleta, nas Estações de Tratamento de Água (ETA) e nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) (Guerrero-Latorre et al. 2016). No entanto, os tratamentos mais completos referidos anteriormente não estão disponíveis em algumas ETA/ETAR e, quando estão, podem não ser totalmente eficazes na eliminação destes

vírus, seja na água para consumo humano, seja em efluentes de águas residuais que possam ser reutilizados, como foi comprovado nos últimos anos (Kokkinos et al. 2015). Além disso, estima-se que 90% das águas residuais produzidas são descarregadas no ambiente sem desinfecção, representando um enorme risco de exposição a estes vírus, não apenas através do consumo direto de água, mas também por vias indiretas como, por exemplo, o consumo de vegetais, bivalves ou carne de animais (Polo et al. 2015).

Em Portugal, a maioria das águas doces superficiais são classificadas pelo Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (SNIRH) como tendo qualidade razoável. No entanto, a ocorrência ou quantificação de vírus entéricos não está contemplada na lista dos parâmetros avaliados (SNIRH 2019). De acordo com a legislação em vigor (Diário da República, Decreto-Lei n.º 152/2017), os vírus entéricos não são reconhecidos como indicadores microbianos de contaminação fecal para avaliação da qualidade da água para consumo humano, sendo apenas consideradas as bactérias coliformes (Diário da República 2017). Contudo, nos últimos anos tem havido uma crescente incerteza quanto à capacidade dessas bactérias refletirem a ocorrência de contaminação por outros agentes patogénicos, nomeadamente vírus (Polo et al. 2015).

Nesse sentido, objetiva-se com este estudo a pesquisa de vírus entéricos (Enterovirus, Vírus das Hepatites A e E) por transcrição reversa seguida de PCR em Tempo Real (RT-qPCR) em amostras de água natural superficial e de água para consumo humano, em Portugal. Pretende-se avaliar a sua eventual associação com outros indicadores de contaminação fecal como os coliformes fecais, bem como a eficácia dos sistemas implementados nas Estações de Tratamento de Água, na eliminação destes vírus.

2 Metodologia

O procedimento experimental utilizado para detetar vírus entéricos nas amostras de água está ilustrado na Figura 1 e foi adaptado do Método 1615 (EPA / 600 / R-10/181) (Cashdollar et al. 2012).

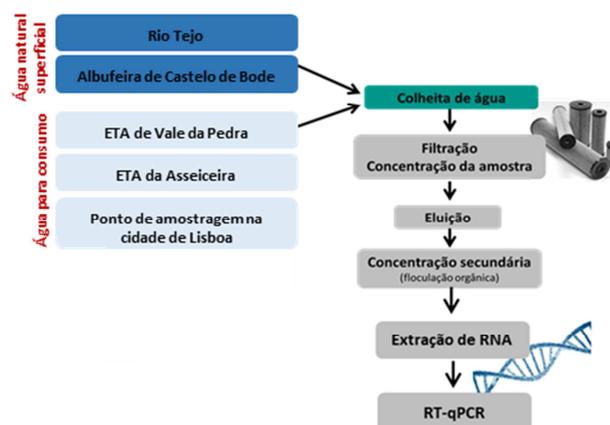


Figura 1. Procedimento experimental implementado para deteção de vírus entéricos em amostras de água

2.1 Locais de amostragem

O estudo realizou-se em duas matrizes de água - água natural superficial (não tratada) e água para consumo humano (tratada) (Figura 1).

Os pontos de amostragem de água natural superficial estão localizados junto dos pontos de captação de água no Rio Tejo e na Albufeira de Castelo de Bode, dois dos principais reservatórios de água para abastecimento da cidade de Lisboa. Já os três pontos de

amostragem de água para consumo humano são efetuados à saída da ETA de Vale da Pedra e da ETA da Asseiceira, e num ponto da cidade de Lisboa.

Nas duas estações indicadas, a água é submetida a diferentes tratamentos. Na ETA de Vale da Pedra, composta por duas linhas independentes, a água proveniente do Rio Tejo passa por um processo de pré-oxidação, ajuste de pH, adsorção com carvão ativado, coagulação/floculação, sedimentação, filtração, correção de pH e desinfecção final com cloro. Na ETA da Asseiceira, composta também por duas linhas independentes, a água proveniente da Albufeira de Castelo de Bode passa por um processo de pré-oxidação (cloro), remineralização e correção da agressividade, coagulação, flotação, coagulação, filtração, correção de pH e desinfecção final com cloro (EPAL 2019).

2.2 Colheita de amostras

A colheita de amostras de água em cada ponto de amostragem ocorreu em maio de 2018 e entre janeiro e março de 2019. Foram colhidas 15 amostras.

As amostras para deteção de vírus entéricos foram colhidas utilizando filtros NanoCeram (Argonite). Filtraram-se 100 - 600 litros de água natural superficial e 800 - 3000 litros de água tratada para consumo humano. As amostras foram transportadas para o laboratório refrigeradas, tendo ocorrido o seu processamento o mais rapidamente possível (até 72 horas depois). Para a quantificação de coliformes fecais foi efetuada a colheita de amostras de água de acordo com os procedimentos de amostragem para análise microbiológica.

2.3 Quantificação de coliformes fecais

Em águas tratadas para consumo humano, utilizou-se o método de membrana filtrante e incubação em meio de cultura a 44°C e em águas naturais utilizou-se o método de número mais provável pela técnica de Colilert a 44°C (Tandukar et al. 2018). Os resultados foram quantificados após 24 horas de incubação.

2.4 Concentração viral

Os filtros NanoCeram (Argonite) utilizados para a filtração das amostras de água, como referido em 2.2, foram eluídos com 1000 mL extrato de carne. O extrato sofreu floculação orgânica com agitação, tendo o pH sido ajustado para 3,5 com HCl. As amostras flocularam durante 30 minutos e posteriormente foram centrifugadas a 2500 G durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram aspirados e os sedimentos ressuspensos em 30 mL de fosfato de sódio pH 7-7,5. O pH foi ajustado para 9 com NaOH. Centrifugaram-se durante mais 15 minutos, a 3200 G e a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo e os sedimentos descartados. O pH dos sobrenadantes foi acertado para 7-7,5 com HCl. As amostras foram filtradas em filtros Acrodisc Syringe (PALL Corporation) pré-tratados com extrato de carne. Por último, as amostras com cerca de 35 mL foram divididas em três partes: uma para extração de RNA e ulterior deteção de vírus entéricos por RT-qPCR, uma para inoculação em culturas celulares e outra para armazenamento. As amostras foram mantidas a -70°C.

2.5 Extração de RNA para deteção de vírus entéricos por RT-qPCR

As amostras (aproximadamente 19 mL) reservadas para extração de RNA e utilização em RT-qPCR foram descongeladas e transferidas para concentradores Vivaspin (Sartorius), tendo sido centrifugadas durante várias horas a 3200 G e a 4°C até resultar um volume inferior a 1120 µL. Em seguida realizou-se a extração e purificação do RNA com o QIAamp viral RNA Mini kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

2.6 Detecção de RNA viral por RT-qPCR

Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas num termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems). A deteção de *Enterovirus* foi realizada com o Enterovirus genesis Advanced Kit (Primerdesign) e as deteções dos vírus das Hepatites A e E foram realizadas com os kits hepatitisA@ceeramTools (bioMérieux) e hepatitisE@ceeramTools (bioMérieux), respetivamente. Procedeu-se de acordo com as instruções dos fabricantes.

3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos encontram-se no Quadro 1. Nas águas naturais foi detetado RNA viral em quatro das seis amostras analisadas. Nas amostras de água do Rio Tejo foram detetados *Enterovirus* e vírus da Hepatite A. Os *Enterovirus* foram detetados em duas das três amostras analisadas (colhidas em maio de 2018 e março de 2019), enquanto que o vírus da Hepatite A foi detetado apenas em maio de 2018. Na amostra de maio de 2018 foram detetados em simultâneo RNA de *Enterovirus* e RNA do vírus da Hepatite A. Nas amostras de água da Albufeira de Castelo de Bode foram detetados ácidos nucleicos do vírus da Hepatite A e de *Enterovirus*, ambos em apenas uma amostra (em maio de 2018 e em maio de 2019, respetivamente).

Em água para consumo humano da ETA de Vale da Pedra e da ETA de Asseiceira (nove amostras) não foi detetado RNA viral, nomeadamente nas amostras de água tratada colhidas no mesmo dia em que foram colhidas as amostras de água natural do Rio Tejo e da Albufeira de Castelo de Bode onde foram detetados ácidos nucleicos do vírus da Hepatite A e de *Enterovirus*.

Quadro 1. Avaliação microbiológica das amostras analisadas

Proveniência	Matriz	Mês de colheita	Deteção de RNA de vírus entéricos	Quantificação de coliformes fecais
Rio Tejo	Água natural	maio de 2018	Vírus da Hepatite A <i>Enterovirus</i>	687 NMP/100 mL
Rio Tejo	Água natural	janeiro de 2019	Não detetado	1553 NMP/100 mL
Rio Tejo	Água natural	março de 2019	<i>Enterovirus</i>	649 NMP/100 mL
Albufeira de Castelo de Bode	Água natural	maio de 2018	Vírus da Hepatite A	0 NMP/100 mL
Albufeira de Castelo de Bode	Água natural	janeiro de 2019	<i>Enterovirus</i>	3 NMP/100 mL
Albufeira de Castelo de Bode	Água natural	março de 2019	Não detetado	1 NMP/100 mL
ETA de Vale da Pedra	Água para consumo	maio de 2018	Não detetado	0 ufc/100 mL
ETA de Vale da Pedra	Água para consumo	janeiro de 2019	Não detetado	0 ufc/100 mL
ETA de Vale da Pedra	Água para consumo	março de 2019	Não detetado	0 ufc/100 mL
ETA da Asseiceira	Água para consumo	maio de 2018	Não detetado	0 ufc/100 mL
ETA da Asseiceira	Água para consumo	janeiro de 2019	Não detetado	0 ufc/100 mL
ETA da Asseiceira	Água para consumo	fevereiro de 2019	Não detetado	0 ufc/100 mL
ETA da Asseiceira	Água para consumo	março de 2019	Não detetado	0 ufc/100 mL
Ponto de amostragem na cidade de Lisboa	Água para consumo	janeiro de 2019	Não detetado	0 ufc/100 mL
Ponto de amostragem na cidade de Lisboa	Água para consumo	fevereiro de 2019	Não detetado	0 ufc/100 mL

ufc – unidades formadoras de colónias; NMP – número mais provável

Das seis amostras de águas naturais analisadas, três amostras apresentaram apenas um género viral (HAV ou *Enterovirus*) e uma apresentou dois géneros virais em simultâneo (HAV e *Enterovirus*) (Figura 2). O vírus da Hepatite E não foi detetado nas amostras analisadas. O *Enterovirus* foi o género viral mais frequentemente detetado em águas naturais.

A metodologia desenvolvida e implementada mostrou ser adequada para detetar vírus entéricos, uma vez que foi possível a deteção de RNA genómico quer de *Enterovirus* quer do vírus da Hepatite A.

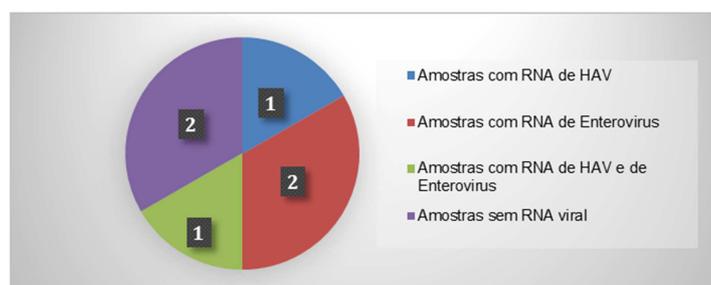


Figura 2. Deteção de vírus entéricos em amostras de água natural superficial do Rio Tejo e da Albufeira de Castelo de Bode (n= 6 amostras)

RNA de *Enterovirus* já havia sido anteriormente detetado em massas de água para abastecimento e para fins recreativos de muitos outros países, nomeadamente, Estados Unidos, Japão, Holanda, Alemanha e África do Sul (Lodder et al. 2010, Lee et al. 2014, Lin & Sing 2015, Leifels et al. 2016, Haramoto et al. 2018).

RNA do vírus da Hepatite A, embora pesquisado, ainda não tinha sido identificado em águas superficiais portuguesas usadas para a produção de água para consumo (Teixeira et al. 2020) mas já tinha sido detetado nesta matriz nos Estados Unidos, Brasil, Espanha e República da Coreia (Jiang & Chu 2004, López Gálvez et al. 2016, Shin et al. 2017). Em águas para consumo, este vírus ainda não foi detetado em Portugal, mas já foi encontrado em água da rede de abastecimento da Colômbia (Peláez Carvajal et al. 2016). Também já foi detetado em águas residuais da rede de saneamento dos Estados Unidos, Bolívia, Espanha e Egipto (Symonds et al. 2014, Montazeri et al. 2015, López Gálvez et al., 2016, Hamza et al. 2017).

Quanto ao vírus da Hepatite E, não detetado nas amostras avaliadas neste estudo, já foi detetado em águas superficiais da Colômbia e em águas residuais de Itália, Suíça e de outros países (La Rosa et al. 2010, Hellmér et al. 2014, Baez et al. 2017).

Os coliformes fecais apenas foram detetados em cinco das seis amostras de água natural superficial, nos pontos de captação de água no Rio Tejo e na Albufeira de Castelo de Bode (Figura 3). Das quatro amostras de água superficial onde foram detetados RNA virais, apenas em três foram quantificados coliformes fecais, e em reduzido número numa delas (amostra da Albufeira de Castelo de Bode – janeiro de 2019) (Quadro 1).

Nas amostras de água para consumo humano não foram detetados coliformes (Quadro 1).

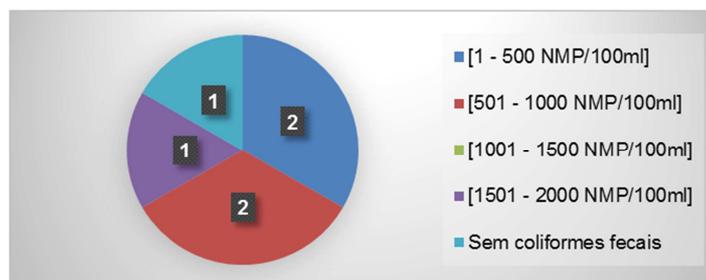


Figura 3. Deteção e quantificação de coliformes fecais em amostras de água natural superficial (n=6 amostras)

4 Notas finais

Embora preliminares por ainda incluírem um número reduzido de amostras, os resultados obtidos permitem afirmar que os vírus entéricos, tal como os coliformes fecais, podem estar presentes nas águas naturais superficiais, tal como acontece em outros países. A ausência de ambos em todas as amostras analisadas de água para consumo humano, permite inferir que os tratamentos existentes na ETA de Vale da Pedra e na ETA da Asseiceira são eficazes na eliminação dos coliformes fecais e do RNA dos vírus entéricos presentes nas águas naturais, resultando numa água para consumo segura e com qualidade.

Estes resultados, corroborando estudos de outros autores (e.g. Polo et al. 2015), também sugerem que possa não existir uma associação entre vírus entéricos e os indicadores de contaminação fecal, que são os que atualmente constam na legislação em vigor (Diário da República, Decreto-Lei n.º 152/2017).

A análise da presença de vírus entéricos em amostras de água é exigente e complexa, quer pelo custo dos reagentes quer pelos requisitos técnicos associados. Tendo em conta que estes vírus se encontram em baixa concentração nas águas naturais e que em águas para consumo serão praticamente inexistentes, a metodologia de análise implica a necessidade de filtrar elevados volumes de amostra de água (pelo menos 100 litros de água natural e 800 litros de água para consumo) para garantir uma maior representatividade da matriz na análise. As colheitas são por isso morosas e exigem ser efetuadas por pessoal com formação prévia. De igual modo, o processamento das amostras em laboratório pode decorrer até três dias. De salientar que esta foi a primeira vez que uma entidade gestora de água em Portugal desenvolveu e implementou com sucesso um método de deteção de vírus entéricos.

O método molecular utilizado para detetar RNA genómico viral (RT-qPCR) apresenta uma elevada sensibilidade e especificidade, permitindo a amplificação e quantificação simultânea da sequência de interesse. Contudo, não permite avaliar infecciosidade, ou seja, a presença de partículas virais com capacidade para infetar e replicar em células humanas. A infecciosidade é geralmente avaliada pela observação de efeitos citopáticos (CPE) em culturas celulares. Neste contexto, a etapa seguinte deste estudo consiste em avançar com testes em culturas celulares a fim de avaliar a infecciosidade das amostras previamente identificadas como positivas por RT-qPCR.

A campanha de amostragem realizada deverá manter-se durante os próximos meses a fim de também averiguar padrões de sazonalidade destes agentes patogénicos.

Por fim, de acordo com os 17 objetivos de Desenvolvimento Sustentável para 2030, das Nações Unidas, e no contexto das alterações climáticas e da seca moderada em Portugal, é cada vez mais importante a avaliação da quantidade e da qualidade dos recursos hídricos existentes, tal como a ponderação da possível utilização de água a partir de águas residuais tratadas, desde que sem riscos para a saúde humana. Perspetiva-se assim a implementação da metodologia de deteção e quantificação de vírus entéricos para a avaliação de águas residuais tratadas e não tratadas.

Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pela Empresa Portuguesa das Águas Livres (EPAL) e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através da bolsa de Doutoramento PDE/BDE/114582/2016 - Daniel Salvador.

Referências

- Asghar R. (2014). *Hepatitis A and E*. *Eastern Mediterranean Health Journal* 20 (3) 212–213.
- Baez P. A., Lopez M. C., Duque-Jaramillo A., Pelaez D., Molina F., Navas M. C. (2017). First evidence of the Hepatitis E virus in environmental waters in Colombia. *PLoS ONE* 12(5) 1–16.
- Bruu L. (2002). *Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses*. In *A Practical Guide to Clinical Virology*, 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons.
- Cashdollar J., Brinkman N., Griffin S., McMinn B., Rhodes E., Varughese E., Grimm A., Parshionikar S., Wymer L., Fout, G (2012). Development and evaluation of EPA method 1615 for detection of enterovirus and norovirus in water. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 215–223.
- Diário da República (2017). Decreto-Lei n.º 152/2017. <https://dre.pt/home/-/dre/114315242/details/maximized>, acessado a 15 de março de 2019.
- Direção-Geral da Saúde (DGS) e Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) (2017). Hepatite A em Portugal. *Boletim Epidemiológico* de 19 de Dezembro de 2017, Portugal.
- Eifan S. (2013). Enteric Viruses and Aquatic Environment. *The Internet Journal of Microbiology* 12 1–7.
- EPAL.(2019). *Sistema de Abastecimento*. <https://www.epal.pt/EPAL/menu/%C3%A1gua/sistema-de-abastecimento>, acessado a 5 de julho de 2019.
- Ferreira C., Santos J., Lourenço T., Benoliel C., Matos R., Martins H (2013). Diagnóstico da infeção por vírus da hepatite E no INSA, 2000-2012. *Boletim Epidemiológico Observações* 27–8.
- Guerrero-Latorre L., Gonzales-Gustavson E., Hundesa A., Sommer R., Rosina G. (2016). UV disinfection and flocculation-chlorination sachets to reduce hepatitis E virus in drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 219, 405–411.
- Hamza H., Abd-Elshafy D. N., Fayed S. A., Bahgat M. M., El-Esnawy N. A., Abdel-Mobdy E. (2017). Detection and characterization of hepatitis A virus circulating in Egypt. *Archives of Virology* 162 (7) 1921–1931.
- Haramoto E., Kitajima M., Hata A., Torrey J., Masago Y., Sano D., Katayama H. (2018). A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Research* 135, 168–186.
- Hellmér M., Paxéus N., Magnius L., Enache L., Arnholm B., Johansson A., Norder H. (2014). Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* 80(21) 6771–6781.
- Jiang S. C., Chu W. (2004). PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. *Journal of Applied Microbiology* 97(1) 17–28.
- Kokkinos P., Mandilara G., Nikolaidou A., Velegraki A., Theodoratos P., Kampa P. (2015). Performance of three small-scale wastewater treatment plants. A challenge for possible reuse. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (22) 17744–17752.
- La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Vennarucci V. S., Muscillo M. (2010). Molecular detection of hepatitis E virus in sewage samples. *Applied and Environmental Microbiology* 76(17) 5870–5873.
- Lee C. S., Lee C., Marion J., Wang Q., Saif L., Lee, J. (2014). Occurrence of human enteric viruses at freshwater beaches during swimming season and its link to water inflow. *Science of the Total Environment* (472) 757–766.
- Leifels M., Hamza I. A., Krieger M., Wilhelm M., Mackowiak M., Jurzik, L. (2016). From Lab to Lake – Evaluation of Current Molecular Methods for the Detection of Infectious Enteric Viruses in Complex Water Matrices in an Urban Area. *Plos One* 11(11) 1–16.

- Lin J., Singh, A. (2015). Detection of human enteric viruses in Umgeni River, Durban, South Africa. *Journal of Water and Health* 13(4) 1098–1112.
- Lodder W. J., Berg H., Rutjes S., Husman A. (2010). Presence of Enteric Viruses in Source Waters for Drinking Water Production in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* (76) 5965–5971.
- López-Gálvez F., Truchado P., Sánchez G., Aznar R., Gil M. I., Allende, A. (2016). Occurrence of enteric viruses in reclaimed and surface irrigation water: relationship with microbiological and physicochemical indicators. *Journal of Applied Microbiology* 121(4) 1180–1188.
- Montazeri N., Goettert D., Achberger E. C., Johnson C. N., Prinyawiwatkul W., Janes M. E. (2015). Pathogenic enteric viruses and microbial indicators during secondary treatment of municipal wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 81(18) 6436–6445.
- Palminha P., Ribeiro C., Roque C., Vinagre E. (2015). Vigilância laboratorial da infeção a Enterovirus entre 2010 e 2013. *Boletim Epidemiológico Observações* 4 (12) 19-21.
- Peláez-Carvajal D., Guzmán B. L., Rodríguez J., Acero F., Nava, G. (2016). Presence of enteric viruses in water samples for consumption in Colombia: Challenges for supply systems. *Biomedica* 36, 169–172.
- Pereira S., Linhares I., Neves A., Almeida A. (2014). Hepatitis A Immunity in the District of Aveiro (Portugal): An Eleven-Year Surveillance Study (2002–2012). *Viruses* 6 (3) 1336–45.
- Polo D., Varela M., Romalde J. (2015). Detection and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. *International Journal of Food Microbiology* 193, 43–50.
- Shin E., Kim J. S., Oh K. H., Oh S. S., Kwon M. J., Kim S., Parka J., Kwaka H., Chunga G., Kimc C., Kim J. (2017). A waterborne outbreak involving hepatitis A virus genotype IA at a residential facility in the Republic of Korea in 2015. *Journal of Clinical Virology* (94) 63–66.
- Symonds E. M., Verbyla M. E., Lukasik J. O., Kafle R. C., Breitbart M., Mihelcic J. R. (2014). A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. *Water Research* 65 257–270.
- Sinclair R., Jones E., Gerba C. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1769–80.
- SNIRH: Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos (2019). <https://snirh.apambiente.pt/>, acessado a 18 de Maio de 2019.
- Tandukar S., Sherchand J. B., Id D. B., Sherchan S. P., Malla B., Shrestha R. G., Haramoto, E. (2018). Presence of Human Enteric Viruses, Protozoa, and Indicators of Pathogens in the Bagmati River, Nepal. *Pathogens* 7(38) 1–11.
- Teixeira P., Costa S., Brown B., Silva S., Rodrigues R., Valério E. (2020). *Quantitative PCR Detection of Enteric Viruses in Wastewater and Environmental Water Sources by the Lisbon Municipality: A Case Study*. *Water* 12 (544) 1-13.
- United Nations Children's Fund (UNICEF) (2012). *Pneumonia and diarrhea*. *United Nations Children's Fund* (UNICEF) 1-86.
- World Health Organization (2003). *Emerging Issues in Water and Infectious Disease*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 1-23.
- World Health Organization (2010). *The Global Prevalence of Hepatitis A Virus Infection and Susceptibility: A Systematic Review*. World Health Organization 29-30.
- World Health Organization (2016). Hepatitis E. 2016 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>, acessado a 15 de abril de 2019.
- World Health Organization (2017). *Guidelines for Drinking-water Quality, 4th ed.*, Switzerland. WHO Library Cataloguing in Publication Data.
- Yong H., Son R. (2009). Review Article Hepatitis A virus – a general overview. *International Food Research Journal* (467) 455–67.