

Monitorização de RNA de *Norovírus*, *Rotavírus* e do vírus da hepatite A em água natural e para consumo do sistema de abastecimento da EPAL e AdVT

Monitoring of *Norovirus*, *Rotavirus* and hepatitis A virus RNA in natural and drinking water from EPAL and AdVT supply system

Daniel Salvador¹ *, Célia Neto² e Rui Neves Carneiro³

* Autor correspondente: daniel.salvador@adp.pt

¹ Doutor, Técnico Superior, Direção de Laboratórios (LAB) da Empresa Portuguesa das Águas Livres (EPAL), Avenida de Berlim, 15, 1800-031 Lisboa, Portugal, daniel.salvador@adp.pt. Professor Auxiliar Convidado, Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal. Membro do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) e do Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes (CE3c).

² Licenciada, Responsável de Área, Direção de Laboratórios (LAB) da Empresa Portuguesa das Águas Livres (EPAL), Portugal, celia.neto@adp.pt

³ Engenheiro, Diretor, Direção de Laboratórios (LAB) da Empresa Portuguesa das Águas Livres (EPAL), Portugal, rui.carneiro@adp.pt

RESUMO: O saneamento e o abastecimento de água potável são duas condições essenciais para a saúde humana. Em 2025, prevê-se que metade da população possa viver em áreas de stress hídrico, o que poderá aumentar o risco de exposição a agentes patogénicos, como bactérias, fungos, protozoários e vírus. Destacam-se os vírus entéricos, que infetam e replicam no trato gastrointestinal. Transmitem-se maioritariamente pela via fecal-oral através do consumo de alimentos ou água contaminados.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal a monitorização do RNA de *Norovírus*, *Rotavírus* e do vírus da hepatite A em amostras de água natural doce e água para consumo humano dos sistemas de abastecimento da Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A. (EPAL) e das Águas do Vale do Tejo, S.A. (AdVT).

A colheita de amostras de águas doces naturais incluiu águas superficiais, colhidas num rio e em quatro albufeiras, e águas subterrâneas colhidas em três furos. As campanhas de amostragem decorreram entre Janeiro e Dezembro de 2021. O procedimento experimental utilizado foi adaptado do Método 1615 (EPA/600/R-10/181). A deteção e quantificação do RNA viral foi realizada pelo método PCR em Tempo Real (RT-qPCR).

Entre Janeiro e Dezembro de 2021 foram colhidas 86 amostras, 43 amostras de água natural e 43 de água para consumo humano. Das 43 amostras de água natural, 35 eram provenientes de massas de água superficial e 8 de massas subterrâneas.

Nas amostras de água natural foram detetados RNA de *Norovírus* e de *Rotavírus*, mas não do vírus da hepatite A. A concentração de RNA foi variável ao longo do ano para os dois vírus detetados (0 - 23464 UG/L). Não se verificou uma padrão de sazonalidade na deteção/quantificação de RNA viral. No entanto, vale a pena ressaltar que na maioria dos pontos de amostragem, as maiores concentrações de RNA viral ocorreram nos meses de Verão. As amostras de água subterrânea apresentaram um reduzido nível de contaminação viral. Por outro lado, a água proveniente do rio apresentou as maiores concentrações de RNA de *Rotavírus*.

Nas amostras de água para consumo foram detetados RNA de *Norovírus* e de *Rotavírus*, mas não do vírus da hepatite A. A concentração de RNA viral nesta matriz foi inferior à encontrada em água natural, tendo variado entre 0 - 544 UG/L.

Espera-se com este projeto contribuir para aumentar o conhecimento sobre a presença destes vírus em água e assim permitir, à Entidade Gestora, o desenvolvimento do sistema de avaliação de risco e complementar o Plano de Segurança da Água.

Palavras-chave: *Norovírus*, qualidade de água, vírus, *Rotavírus*, RT-qPCR, saúde humana, vírus da hepatite A.

ABSTRACT: Both sanitation and the water supply are two essential conditions for the human health. By 2025, it is predicted that half of the population could live in areas of water stress. This situation might increase the risk of exposure to pathogens, such as bacteria, fungi, protozoa and viruses. Enteric viruses infect and replicate in the gastrointestinal tract. They are transmitted mainly by the fecal-oral route, through the consumption of contaminated food or water.

In this context, the main objective of the present study was to monitor the RNA of *Norovirus*, *Rotavirus* and hepatitis A virus, in samples of natural and drinking water from the supply systems of Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A. (EPAL) and Águas do Vale do Tejo, S.A. (AdVT).

The natural water sampling included surface water, collected from a river and four reservoirs, and groundwater collected from three boreholes. The sampling campaigns occurred between January and December 2021. The experimental procedure was adapted from Method 1615 (EPA/600/R-10/181). The detection and quantification of viral RNA was performed using the Real-Time PCR (RT-qPCR) method.

During 2021, 86 samples were collected, consisting of 43 samples of natural water and 43 samples of drinking water. Regarding the 43 natural water samples, 35 came from surface water bodies and 8 from underground bodies.

In natural water samples, RNA from both *Norovirus* and *Rotavirus* was detected, but there was no detection of hepatitis A virus. The RNA concentration varied throughout the year for the two viruses detected (0 - 23464 UG/L). There was no seasonal pattern in the detection/quantification of viral RNA. However, for the majority of sampling points, the highest concentrations of viral RNA happened in the summer months. Groundwater samples had a low level of viral contamination. On the other hand, water from the river had the highest concentrations of *Rotavirus* RNA.

Norovirus and *Rotavirus* RNA were detected in drinking water samples, but there was no detection of hepatitis A virus. The concentration of viral RNA in drinking water was lower than that found in the natural water (0 - 544 UG/L).

With the project developed, it is expected to contribute to increase the knowledge about the presence of these viruses on water, allowing the Management Entity to develop the risk assessment system and complement the Water Safety Plan.

Keywords: *Norovirus*, water quality, virus, *Rotavirus*, RT-qPCR, human health, hepatitis A virus.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e o aumento da urbanização pressionam cada vez mais a qualidade e quantidade dos recursos hídricos do planeta. Este cenário além de estar associado a uma sobre-exploração dos recursos é ainda agravado pela ocorrência de fenômenos extremos como secas ou inundações, provocados pelas alterações climáticas, mas também pela alteração da distribuição e variação sazonal de vários agentes patogénicos (Damania *et al.*, 2019; Funari *et al.*, 2010; WHO 2003). As inundações podem dispersar os contaminantes fecais, aumentando o risco de surtos de doenças transmitidos pela água, enquanto que as secas podem aumentar o risco de doenças diarreicas. Estima-se que essas doenças provoquem 2 milhões de mortes por ano em todo o mundo, afetando sobretudo crianças menores de 5 anos (WHO, 2019). Cerca de 90% dos casos resultam exclusivamente de saneamento inadequado e de consumo de água contaminada (Unicef, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o fornecimento de água deverá ser adequado, seguro e acessível a todos. Em 2015, a água limpa e o saneamento para todos foram também incluídos na Agenda de Desenvolvimento Sustentável para 2030 das Nações Unidas (Nações Unidas, 2015).

A água contaminada poderá conter bactérias, protozoários e vírus (WHO, 2003). Os vírus, entidades muito diversas, são constituídos essencialmente por uma cápside proteica protetora e por um ácido nucleico DNA ou RNA, onde se encontra a informação para o processo de infeção (Eifan, 2013; WHO, 2017). Dos mais de 1,6 milhões de vírus de mamíferos e aves aquáticas que se pensa existir na natureza, destacam-se os vírus entéricos, uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o planeta (Figura 1). Este grupo de vírus infeta e replica no trato gastrointestinal (Eifan, 2013; Gall *et al.*, 2015). Existem mais de 200, divididos por diversas famílias. Em 2017, alguns deles foram incluídos e classificados nas linhas orientadoras da OMS sobre a qualidade da água para consumo "Guidelines for Drinking water", como tendo um impacto moderado a elevado na saúde humana (WHO, 2017).

Os vírus entéricos transmitem-se aos seres humanos maioritariamente pela via fecal-oral, através do consumo de alimentos ou água contaminados (Sinclair *et al.*, 2009). A contaminação das águas pode ocorrer como consequência por exemplo de ruturas na rede de saneamento, descargas de água residual sem tratamento, descargas de resíduos industriais, defecação a céu aberto, descargas de navios nos portos e escoamento superficial (WHO,

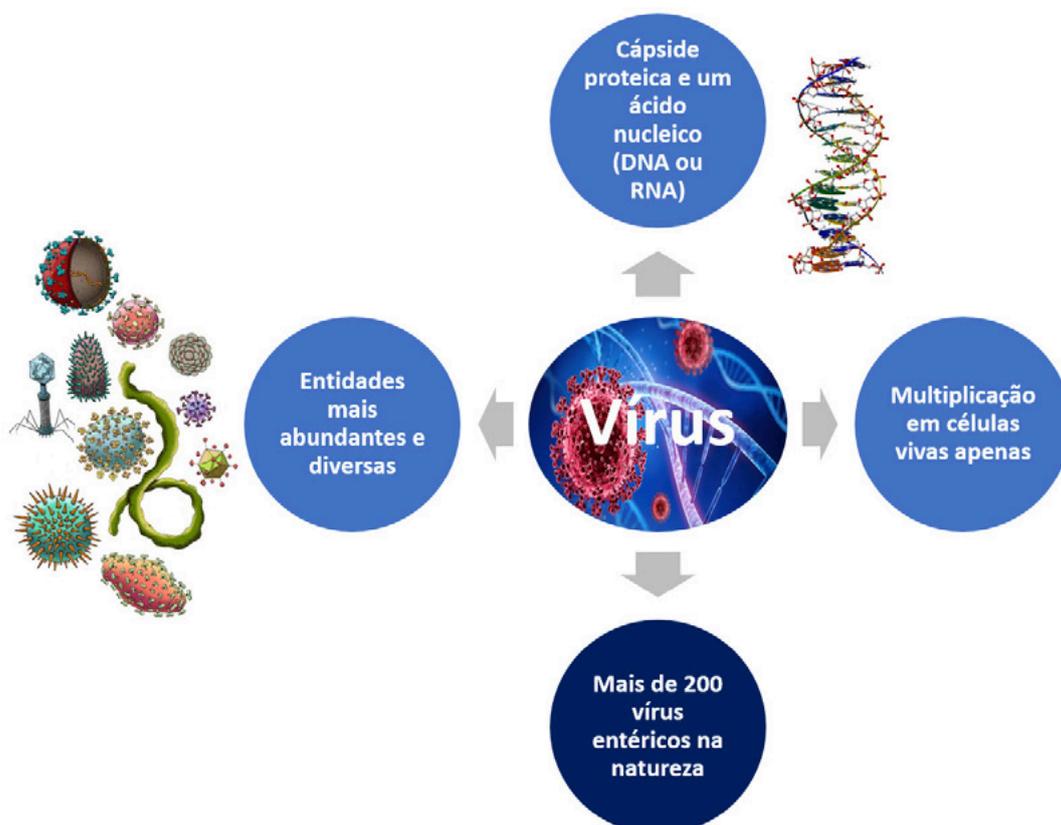


Figura 1. Os vírus e suas características.

2017). Estes agentes patogénicos são libertados em grande número nas fezes de portadores durante a infeção (10^5 a 10^{11} partículas de vírus por grama de fezes), sendo mais contagiosos e resistentes a variações das condições do meio ambiente do que as bactérias. Podem manter a capacidade de infetar organismos vivos por longos períodos de tempo: cerca de 120 dias em água doce e água residual, 130 dias em água salgada e mais 100 dias no solo (Fong e Lipp, 2005). A presença de uma robusta cápside e a ausência de involucro lipídico permite-lhes ter uma elevada resistência também aos tratamentos de desinfeção da água nas ETA/ETAR. A sua eliminação é complexa nas matrizes de água, impondo-se muitas vezes o uso de processos combinados, como o tratamento com ozono e/ou radiação ultravioleta (Guerrero-Latorre *et al.*, 2016; Sinclair *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2020).

Atualmente, o método molecular RT-qPCR (Reverse Transcription Real-time PCR/PCR em Tempo Real quantitativo) é um dos mais utilizados para pesquisar ácidos nucleicos bacterianos ou virais (DNA ou RNA) (Salvador *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2020). Este método, além de rápido e de apresentar uma elevada sensibilidade, também apresenta uma alta especificidade, permitindo a amplificação e deteção/quantificação ao mesmo tempo, da sequência de DNA/RNA em estudo (Teixeira *et al.*, 2020).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo principal a monitorização do RNA de *Norovírus*, *Rotavírus* e do vírus da hepatite A em amostras de água natural doce (água subterrânea e superficial) e água para consumo humano dos sistemas de abastecimento da Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A. (EPAL) e das Águas do Vale do Tejo, S.A. (AdVT).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Locais de amostragem

O estudo realizou-se em amostras de água natural doce (água subterrânea e superficial) e de água para consumo do sistema de abastecimento da EPAL e da AdVT.

A amostragem de água natural incluiu águas superficiais, colhidas num rio e em quatro albufeiras e águas subterrâneas colhidas em três furos. Todas as massas de água são atualmente utilizadas para a produção de água para consumo, fornecida a vários municípios do país.

A colheita das águas superficiais foi realizada junto aos pontos de captação das referidas origens, antes de qualquer tratamento. Após o processo de tratamento, composto por várias etapas, foi realizada a colheita de água para consumo. Por outro lado, a amostragem de água subterrânea não tratada foi realizada na saída dos furos. Após uma etapa de desinfeção com hipoclorito de sódio, a respetiva água subterrânea tratada foi colhida, imediatamente antes de entrar na rede de distribuição. A descrição das origens e o processo de tratamento de cada ETA encontram-se referidos nas Tabelas 1 e 2.

2.2 Colheita e concentração primária da amostra de água

As campanhas de amostragem iniciaram-se em Janeiro de 2021 e terminaram em Dezembro 2021. As colheitas de água superficial e respetiva água para consumo decorreram ao longo de todo o ano, abrangendo as várias estações. Já as colheitas de água subterrânea no Furo_A aconteceram em Outubro e Dezembro; no Furo_L em Junho e Agosto; e no Furo_O em Maio, Agosto, Setembro e Novembro. A colheita de amostras foi mensal.

Tabela 1 - Descrição das origens de água natural em estudo.

| Matriz | Origem em estudo | Região | Bacia hidrográfica |
|------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| Água superficial | Rio_T | Lisboa e Vale do Tejo | Bacia do Rio Tejo |
| | Albufeira_C | Lisboa e Vale do Tejo | Bacia do Rio Zêzere |
| | Albufeira_M | Alentejo | Bacia do Rio Guadiana |
| | Albufeira_P | Alentejo | Bacia do Rio Tejo |
| | Albufeira_S | Centro | Bacia do Rio Tejo |
| Água subterrânea | Furo_A | Lisboa e Vale do Tejo | - |
| | Furo_L | | |
| | Furo_O | | |

Tabela 2. Descrição dos processos de tratamento das Estações de Tratamento de Água (ETA) em estudo.

| Estação de Tratamento de Água | Origem | Processo de tratamento | Outras observações |
|-------------------------------|-------------|---|---|
| ETA_T | Rio_T | Pré-oxidação química com permanganato de potássio (na origem) e/ou ozono, condicionamento de pH, coagulação-floculação, adsorção, decantação, oxidação intermédia com hipoclorito de sódio, filtração, correção de pH e desinfecção final | Estação composta por duas linhas independentes de tratamento, cada uma com capacidade de produzir 120 000 m ³ /dia. |
| ETA_C | Albufeira_C | Pré-cloragem, correção de agressividade e remineralização, coagulação-floculação, flotação, filtração, ajuste de pH e desinfecção final | Estação composta por duas linhas independentes de tratamento, com a capacidade de produzir 500 000 m ³ /dia (linha 1) e 125 000 m ³ /dia (linha 2). |
| ETA_M | Albufeira_M | Pré-oxidação química com ozono, remineralização, coagulação, adição de carvão ativado em pó, floculação-flotação, floculação-decantação, remoção de manganês, filtração, ajuste de pH e desinfecção final | Estação com a capacidade de produzir 26 400 m ³ /dia. |
| ETA_P | Albufeira_P | Pré-oxidação química com ozono, correção pH, remineralização, coagulação, floculação, flotação, oxidação intermédia, filtração, correção de pH e desinfecção final | Estação com capacidade de produzir cerca de 16 800 m ³ /dia. |
| ETA_S | Albufeira_S | Pré-oxidação com ozono, remineralização, coagulação/floculação, adsorção com carvão ativado, decantação, filtração, ajuste de pH e desinfecção final | Estação com capacidade de produzir cerca de 2200 m ³ /hora. |

O procedimento experimental utilizado na colheita e processamento de amostras de água das duas matrizes foi adaptado do Método 1615 (EPA/600/R-10/181) da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Fout *et al.*, 2014) (Figura 2).

A concentração primária que ocorreu em campo, no ponto de amostragem, permitiu concentrar um elevado volume de amostra apenas num filtro Nanoceram^R (Argonite) (Figura 2). Estes filtros utilizam um meio filtrante altamente eletropositivo que rapidamente adsorve partículas como os vírus, independentemente do seu tamanho. Foram filtrados 100 a 200 litros de água por amostra. Os filtros com a amostra foram depois eluídos com extrato de carne a 3% em laboratório. A solução eluída resultante foi submetida a um processo de floculação orgânica com ajuste de pH a 3,5, seguindo-se uma centrifugação a 2500 g durante 15 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em fosfato de sódio e após ajuste do pH a 9 efetuou-se uma nova centrifugação a 3200 g durante 10 minutos. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo de ensaio e acertado o pH a 7-7,5. As amostras foram ainda filtradas com filtros Acrodisc Syringe (PALL Corporation) para remover eventuais fungos e bactérias. No fim desta etapa, dividiu-se o volume resultante em duas partes: uma para extração de RNA e posterior deteção RT-qPCR, e outra para armazenamento. As amostras foram mantidas a -70 °C até serem utilizadas.

2.3 Concentração secundária da amostra e extração do RNA viral

As amostras reservadas para análise por RT-qPCR foram primeiramente descongeladas. Em seguida, foram aplicadas em concentradores Vivaspin^R (Sartorius) para efetuar uma nova concentração por centrifugação, durante 5 horas a 9500 g e a 4 °C. Esta etapa de concentração secundária permitiu reduzir o volume de eluído da etapa anterior até 1 mL. A amostra concentrada (1 mL) sofreu depois extração e purificação de RNA com o kit QIAamp viral RNA Mini (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

2.4 Deteção e quantificação do RNA viral

A deteção e quantificação do RNA viral foi realizada no termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems). Na pesquisa do RNA do género *Norovirus* (Genogrupo I e Genogrupo II) foram utilizados dois kits de RT-qPCR: *NorovirusGI* CeeramTools e *NorovirusGII* CeeramTools (ambos BioMérieux). Já na pesquisa do RNA de *Rotavirus* foi usado o kit *Rotavirus* CeeramTools (BioMérieux) e na pesquisa do RNA do vírus da hepatite A *HepatitisA* CeeramTools (BioMérieux). As condições de amplificação seguiram as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado por curvas padrão com cinco pontos, construídas a partir de diluições seriadas 1:10 de uma solução de RNA padrão de cada vírus, com

10⁶ UG/μL. Apenas os resultados que satisfizeram os critérios de qualidade foram validados. As amostras foram consideradas positivas quanto apresentaram um ciclo de quantificação (Cq) inferior a 40.

2.5 Validação do método implementado

A deteção e quantificação do RNA viral por RT-qPCR, foi validada com recurso a uma verificação do limite de quantificação e da curva de quantificação, de acordo com os critérios de qualidade estabelecidos no Laboratório. A totalidade do protocolo experimental foi ainda validada através do processamento de amostras de água contaminadas artificialmente com RNA do vírus de controlo de processo Mengovirus (BioMérieux) e da participação em ensaios interlaboratoriais.

3. RESULTADOS

Entre Janeiro e Dezembro de 2021 foram colhidas 86 amostras, 43 amostras de água natural e 43 de água para consumo. Das 43 amostras de água natural, 35 eram provenientes de massas de água superficial e 8 de massas subterrâneas. A proveniência das amostras encontra-se descrita na Tabela 3.

3.1 Deteção e quantificação do RNA viral em amostras de água natural subterrânea

Relativamente aos pontos de amostragem de águas subterrâneas, nas quatro amostras de água natural do Furo_O, apenas numa foi detetado RNA viral (Maio). O RNA pertencia ao género de *Norovirus* e encontrava-se em concentração reduzida e inferior ao Limite de Quantificação. Na respetiva água para consumo não foi detetado RNA viral.

Nas duas amostras de água natural provenientes do Furo_A não foi detetado RNA viral. Já na respetiva água para consumo, uma das duas amostras apresentou RNA de *Norovirus* (Outubro), ainda que em reduzida concentração e inferior ao Limite de Quantificação. Na outra amostra não foi detetado RNA.

Nas duas amostras de água natural do Furo_L não foi encontrado RNA viral. Na água para consumo, uma das amostras tinha RNA de *Norovirus* em reduzida concentração e inferior ao Limite de Quantificação (Junho). Na outra amostra não foi detetado RNA.

Tabela 3. Caracterização e proveniência das amostras analisadas no estudo (n=86).

| Matriz | Local de amostragem | Número de amostras colhidas | |
|-------------------|---------------------|-----------------------------|----|
| Água natural | Subterrânea | Furo_O | 4 |
| | | Furo_A | 2 |
| | | Furo_L | 2 |
| | Superficial | Rio_T | 10 |
| | | Albufeira_C | 9 |
| | | Albufeira_P | 7 |
| | | Albufeira_M | 5 |
| | | Albufeira_S | 4 |
| Água para consumo | Furo_O_AT | 4 | |
| | Furo_A_AT | 2 | |
| | Furo_L_AT | 2 | |
| | ETA_T | 10 | |
| | ETA_C | 9 | |
| | ETA_P | 7 | |
| | ETA_M | 5 | |
| | ETA_S | 4 | |



Figura 2. Representação esquemática do procedimento experimental para pesquisa do RNA viral em amostras de água natural e água para consumo.

O RNA do vírus da hepatite A não foi encontrado em nenhuma amostra proveniente dos referidos pontos de amostragem.

3.2 Detecção e quantificação do RNA viral em amostras de água natural superficial e água para consumo

3.2.1 Rio_T/ETA_T

Das 10 amostras de água natural do Rio_T, em seis foi detetado RNA viral (Janeiro, Junho, Agosto, Setembro, Outubro e Novembro). Das seis amostras positivas, em quatro foi possível detetar e quantificar em simultâneo RNA de *Norovírus* e de *Rotavírus*. A concentração de RNA do *Norovírus* variou entre 129 - 17295 UG/L, enquanto que a concentração de RNA de *Rotavírus* variou entre 590 - 23464 UG/L. Uma amostra registou a presença de RNA de *Rotavírus* apenas, com uma concentração de 590 UG/L, e numa foi detetado apenas RNA de *Norovírus*, numa concentração diminuta e inferior ao Limite de Quantificação. Na respetiva água para consumo à saída da ETA, das 10 amostras colhidas, três evidenciaram RNA viral (Janeiro, Abril e Julho). Das três amostras positivas, uma registou a presença de RNA de *Norovírus* e de *Rotavírus*. A concentração de RNA de *Norovírus* foi de 514 UG/L e a de *Rotavírus* muito reduzida e inferior ao Limite de Quantificação. Em duas amostras foi detetado apenas RNA de *Norovírus*, numa concentração inferior ao Limite de Quantificação. Não foi detetado RNA do vírus da hepatite A em nenhuma amostra de água natural, nem em nenhuma de água para consumo.

3.2.2 Albufeira_C/ETA_C

Das nove amostras de água natural da Albufeira_C foi detetado RNA viral em quatro (Abril, Maio, Junho e Julho). Das quatro amostras, numa foi detetado RNA de *Norovírus* e *Rotavírus* em concentrações reduzidas e inferiores ao Limite de Quantificação. Nas restantes três amostras positivas foi detetado RNA de *Norovírus*, numa concentração variável (< LQ - 78 UG/L). Das nove amostras de água para consumo na saída da ETA_C, o RNA viral foi detetado em quatro (Abril, Maio, Julho e Agosto). Das quatro amostras, numa foi detetado ao mesmo tempo RNA de *Norovírus* e *Rotavírus*, em concentrações reduzidas e inferiores ao Limite de Quantificação. Nas restantes três amostras positivas foi detetado RNA de *Norovírus*, numa concentração variável (< LQ - 545 UG/L). O RNA do vírus da hepatite A não foi encontrado nas amostras provenientes desta albufeira/ETA.

3.2.3 Albufeira_P/ETA_P

Das sete amostras de água natural colhidas na Albufeira_P, em cinco foi detetado RNA viral (Janeiro, Maio, Agosto, Novembro e Dezembro). Numa das cinco amostras positivas foi possível detetar e quantificar RNA de *Norovírus* e *Rotavírus*, numa concentração de 60 UG/L. Nas restantes quatro amostras foi encontrado RNA de *Rotavírus*, numa concentração variável (< LQ - 1206 UG/L). Das sete amostras de água colhidas à saída da ETA_P, quatro apresentaram RNA viral (Janeiro, Maio, Agosto e Dezembro). Das quatro positivas, em duas foi detetado apenas RNA de *Norovírus*, numa concentração reduzida e inferior ao Limite de Quantificação; uma evidenciou RNA de *Rotavírus* numa concentração de 70 UG/L; e numa foi detetado RNA em simultâneo de *Norovírus* e *Rotavírus* também em concentrações reduzidas. Neste ponto de amostragem não foi encontrado RNA do vírus da hepatite A em nenhuma das matrizes.

3.2.4 Albufeira_M/ETA_M

Das cinco amostras de água natural da Albufeira_M, quatro evidenciaram a presença de RNA viral (Janeiro, Junho, Agosto e Outubro). Das quatro amostras positivas numa foi detetado RNA de *Norovírus*, noutra RNA de *Rotavírus* e em duas RNA de *Norovírus* e *Rotavírus*. Em todas as amostras positivas, a concentração de RNA foi reduzida e inferior ao Limite de Quantificação. Nas amostras de água para consumo, das cinco colhidas, apenas numa foi detetado RNA viral de *Norovírus*, numa concentração reduzida e inferior ao Limite de Quantificação (Janeiro). O RNA do vírus da hepatite A não foi detetado nas amostras das duas matrizes deste ponto de amostragem.

3.2.5 Albufeira_S/ETA_S

Nas quatro amostras de água natural da Albufeira_S não foi detetado o RNA de nenhum dos vírus em estudo. Por outro lado, na respetiva água para consumo à saída da ETA_S, foi detetado RNA de *Norovírus* em todas as amostras (Maio, Julho, Outubro e Dezembro). Contudo, a concentração de RNA de *Norovírus* foi sempre reduzida e inferior ao Limite de Quantificação do método. O RNA do vírus da hepatite A não foi detetado nem na água natural, nem na água para consumo.

Foram realizados ao longo do estudo diversos brancos que apresentaram sempre ausência de contaminação.

4. DISCUSSÃO

O RNA dos vírus entéricos encontrado nas águas subterrâneas deste estudo também já havia sido detetado em vários outros países como a República da Coreia e no Estado Wisconsin nos Estados Unidos da América (Rusiñol, 2023). Ainda assim, esta matriz apresentou um reduzido nível de contaminação viral. Ainda existem poucos estudos, mas os mesmos indiciam que o solo acaba por realizar alguma proteção destas massas de água, sendo pouco provável a contaminação com vírus (Wyk *et al.*, 2022).

Tal como nas águas subterrâneas, também nas águas superficiais e para consumo foi encontrado RNA de vírus entéricos. Estes vírus encontram-se por todo o mundo e em praticamente todas as matrizes de água, desde água natural, água salgada, água para consumo e água residual. São muitos os estudos já realizados com resultados positivos, nomeadamente na Colômbia, Brasil, Espanha, Finlândia, Noruega e Países Baixos (Lanrewaju *et al.*, 2022; Salvador *et al.*, 2021).

Não se verificou uma padrão de sazonalidade na deteção/quantificação de RNA viral, mas vale a pena salientar que as amostras de água superficial com RNA viral foram colhidas durante os meses de verão. Este resultado poderá estar associado à diminuição do fluxo de água nos rios e dos níveis de água nas albufeiras, havendo maiores consequências das descargas contaminantes por exemplo de aviários ou pecuárias (Salvador *et al.*, 2020).

Outro aspeto relevante é a falta de correspondência entre a ausência de RNA viral na água natural e a presença na respetiva água tratada. Este resultado poderá estar associado a várias causas, como as diferentes características das matrizes que podem influenciar os procedimentos de extração de RNA e do RT-qPCR ou à fragilidade das moléculas deste ácido nucleico que se podem degradar (Haramoto *et al.*, 2018).

Apesar de ter sido encontrado RNA viral nas amostras de água, é necessário ainda avaliar o seu estado de infecciosidade. A infecciosidade traduz-se na capacidade dos vírus infetarem células vivas. Só a partir desta avaliação é possível determinar o real risco para a saúde humana (Salvador *et al.*, 2020), uma vez que os vírus podem estar degradados e inativos. Geralmente essa análise é realizada em culturas celulares.

A avaliação não foi realizada no âmbito deste trabalho, mas pretende dar-se continuidade a tal nos próximos anos, a fim de complementar a informação do risco relativo à qualidade da água destinada ao consumo.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de pesquisa de vírus encontra-se validado na Direção de Laboratórios da EPAL.

Tal como acontece em muitos outros países, também em Portugal existe RNA de *Norovírus* e *Rotavírus* nas amostras de água natural e para consumo.

Nesta campanha de amostragem o RNA do vírus da hepatite A não foi encontrado.

As amostras de água subterrânea apresentaram um reduzido nível de contaminação viral.

A pesquisa de vírus em amostras de água é exigente e complexa, quer pelo custo dos reagentes, quer pelos requisitos técnicos que são necessários. Se estes agentes patogénicos se encontrarem na água, estarão muito provavelmente em baixa concentração, sendo por isso necessário filtrar um elevado volume de água para garantir uma maior representatividade na amostragem. As colheitas são por isso demoradas e com a necessidade de serem efetuadas por pessoal previamente formado na metodologia. De igual modo, o processamento das amostras em laboratório que pode levar até uma semana, segue procedimentos de ensaio muito minuciosos e de elevado rigor técnico, exigindo que sejam realizados por técnicos qualificados nesta área analítica.

Tendo em conta os custos, especificidade e complexidade destes ensaios, a Diretiva EU 2020/2184 de 16 Dezembro de 2020 e o novo Decreto-Lei n.º 69/2023, de 21 de Agosto preconizam que as Entidades Gestoras apostem nesta temática fazendo um rastreio preliminar da eventual presença/carga viral nas origens e saída das ETA, com base em ensaios/pesquisa de colifagos somáticos no âmbito da monitorização operacional dos seus PCQA. Os colifagos somáticos são vírus que infetam bactérias, nomeadamente a comum *E. coli*. Estes microrganismos indicadores da qualidade da água podem revelar uma contaminação fecal quer por fezes de animais ou de humanos, quer por água residual. O seu método de deteção/quantificação é relativamente rápido e simples.

Espera-se com este projeto contribuir para aumentar o conhecimento sobre a presença de vírus entéricos em água e assim permitir à Entidade Gestora o desenvolvimento do sistema de avaliação de risco para a qualidade da água e complementar o Plano de Segurança da Água.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento à Direção de Laboratórios, Área de Microbiologia do Laboratório de Lisboa da EPAL e à Equipa de Planeamento Amostragem e Tratamento de Dados pelo suporte e cooperação no presente estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Damania, R.; Desbureaux, S.; Rodella, A.; Russ, J.; Zaveri, E. Quality Unknown – The invisible water crisis. International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank (2019).
- Eifan, S. 2013. Enteric Viruses and Aquatic Environment. *The Internet Journal of Microbiology*, 12, 1 (2013), 1-7.
- Fong, T.; Lipp, E. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (2005), 357-37.
- Fout, G.S.; Cashdollar, J.L.; Varughese, E.A.; Parshionkar, S.U.; Grimm, A.C. EPA Method 1615. Measurement of Enterovirus and Norovirus Occurrence in Water by Culture and RT-qPCR. *Journal of Visualized Experiments*, 107 (2016), 1-13.
- Funari, E.; Kistemann, T.; Herbst, S.; Rechenburg, A. Technical guidance on water related disease surveillance. World Health Organization Europe (2011).
- Gall, A.; Mariñas, B.; Lu, Y.; Shisler, J. Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water. *PLoS Pathog*, 11, 6 (2015), 1-7.
- Guerrero-Latorre, L; Gonzales-Gustavson, E.; Hundesa, A.; Sommer, R.; Rosina, G. UV disinfection and flocculation-chlorination sachets to reduce hepatitis E virus in drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219, 4 (2016), 405-411.
- Haramoto, E.; Kitajima, M.; Hata, A.; Torrey, J.; Masago, Y.; Sano, D.; Katayama, H. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Research*, 135 (2018), 168-186.
- Lanrewaju, A.; Folami, A.; Sabiu, S.; Edokpayi, J.; Swalaha, F. Global public health implications of human exposure to viral contaminated water. *Frontiers in Microbiology*, 13 (2022), 1-18.
- Nações Unidas. 2015. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. [Consultado em 12 Agosto de 2023]. Disponível em <https://ods.pt/>.
- Rusiñol, M. Waterborne viruses in urban groundwater environments. *Plos Water*, 2, 8 (2023), 1-16.
- Salvador, D.; Neto, C.; Benoliel, M.J.; Filomena Caeiro, M. Assessment of the presence of hepatitis e virus in surface water and drinking water in Portugal. *Microorganisms*, 8, 761 (2020), 1-16.
- Salvador, D. Monitoring enteric viruses in different water matrices: implementation of methodologies and relevance of permanent surveys. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (2021). Tese de Doutoramento. Portugal.
- Sinclair, R.; Jones, E.; Gerba, C. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 6 (2009), 1769-80.
- Teixeira, P.; Salvador, D.; Brandão, J.; Ahmed, W.; Sadowsky, M.J.; Valério, E. Environmental and Adaptive Changes Necessitate a Paradigm Shift for Indicators of Fecal Contamination. *Microbiology Spectrum*, 8 (2020), 1-20.
- United Nations Children’s Fund (UNICEF). Ending child deaths from pneumonia and diarrhoea. New York. [Consultado em 20 Agosto de 2023]. Disponível em <https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2016/11/UNICEF-Pneumonia-Diarrhoea-report2016-web-version.pdf>.
- World Health Organization. Emerging Issues in Water and Infectious Disease. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data (2003), 1-23.
- World Health Organization. Waterborne disease related to unsafe water and sanitation. [Consultado em 12 Agosto de 2023]. Disponível em <https://www.who.int/sustainable-development/housing/health-risks/waterborne-disease/en/>.
- World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality (4th ed.). Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data (2017).
- Wyk, Y.; Ubomba-Jaswa, E.; Dippenaar, M.A. Potential SARS-CoV-2 contamination of groundwater as a result of mass burial: A mini-review. *Science of the Total Environment*, 835 (2022), 155473.