UNIVERSITAT DE BARCELONA

Estudis sobre la contaminació i desinfecció de virus entèrics en contexts d'ajuda humanitària

Laura Guerrero Latorre

Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència ***Reconeixement- NoComercial – Compartirlgual 4.0. Espanya de Creative Commons***.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia ***Reconocimiento - NoComercial – Compartirlgual 4.0. España de Creative Commons***.

This doctoral thesis is licensed under the ***Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License***.

Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departament Microbiologia
Programa de doctorat:
Microbiologia Ambiental i Biotecnologia

Títol de la tesi

Estudis sobre la contaminació i desinfecció de virus entèrics en contexts d'ajuda humanitària

Memòria presentada per

Laura Guerrero Latorre

per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona

Directora

Rosina Girones Llop

Autora

Laura Guerrero Latorre

Al Martí,

Agraïments

Arribat aquest moment se'm fa difícil sintetitzar en unes poques línies els agraïments a totes aquelles persones que han fet possible que arribi fins aquí.

Agraeixo als responsables d'Oxfam Intermón que em va brindar la possibilitat de fer el treball final de Màster als camps de refugiats de l'Est del Txad l'any 2009 i així començar un camí de grans experiències. Especialment, agrair a l'**Alberto Ibáñez** per la seva confiança plena, amistat i aventures passades; per estar al peu del canó i treballar sense horaris per millorar les intervencions humanitàries. A la **Mariona Miret**, la **Simone Carter**, la **Cristina Alaman** i la **Maria Chalaux** gràcies per fer tot i més, sempre en mig d'una emergència, per tirar endavant els projectes de recerca.

Agrair enormement a la **Rosina** per obrir-me la porta del seu laboratori fa 8 anys per analitzar "unes aigües de camps de refugiats del Txad". Tot i no trobar l'apreciat virus de l'hepatitis E (algun dia ens veurem les cares!) va apostar per la branca ONGera i a poc a poc, projecte a projecte, hem construït una Tesi Doctoral, què es diu ràpidament! Moltes gràcies Rosina, he après moltíssim.

He de dir que em sento molt afortunada: vaig voler fer recerca aplicada en el món de la cooperació i amb Intermón Oxfam i el Laboratori de Virus Contaminants d'Aigua i Aliments, vaig trobar un bon tàndem amb el que he après a analitzar necessitats, avaluar sinergies, formular projectes, cercar finançament i portar els resultats a la practica de l'ajuda humanitària.

Gràcies tot l'equip del laboratori 8 per l'acollida, per fer *pinya* i fer d'aquella capsa de mistos una segona residencia amb caliu. Gràcies **Chus** per les interminables hores dedicades a ensenyar-me el laboratori i per les discussions frikies sobre ciència i altres. A l'**Ayalke** per les mil-i-una assistències sempre acompanyades d'una bona tertúlia política. A l'**Anna** per la càlida benvinguda i les estones al lab. I al **Byron** per ensenyar-me amb paciència com cuidar de les cèl·lules.

A tu **Martus,** gràcies per ser companya i amiga des del principi de l'aventura de la tesi que hem enllaçat amb la odissea de la maternitat... com ens va la "marxa", eh? Espero seguir fent *gins* de mitja tarda, formatgets de cabra i castells de sorra amb l'Anna i el Martí.

Ai **Xavi**, qui m'hagués dit a mi el primer dia de carrera que acabaria celebrant la tesi doctoral al teu costat? Ets com aquell germà que tot i ser completament oposat tu, sempre li escoltaràs un consell i de vegades hauràs de fotre-li "canya".

Moltes gràcies **Silvia Bofill** per recolzar els projectes i defensar el que ens queda de la paraula "pública" a la Universitat, espero tinguis el temps per mantenir la contraforça.

No oblidar-me de les darreres incorporacions, **Eloy, Sandra, David, Eva** gràcies per l'aire fresc i la paciència amb una "mare novell *pre*-tesica". Gràcies també **Aiora** per ajudar-nos a fer que arribi tot "per ahir". Als companys del costat, "Araujos", **Silvia Cervero, Carmina, Tarik, Edu**, gràcies per fer més amenes aquelles estones d'incubació. I a tots les companyes del Departament per acompanyar les estones de cafes i *tuppers* a la cuina.

Vaig tenir la fortuna de conèixer els Filtres d'Aigua Ceràmics i tirar endavant un projecte que va estar ple de troballes: recordo encara el primer dia al taller d'en **Josep Mates**, no ho podia creure, quina sort trobar un mestre ceramista apassionat pel seu ofici i la seva terra!. Gràcies de tot cor Josep per l'entusiasme que sempre transmets. Espero que els filtres de ceràmica negra que van néixer a Fonteta arribin ben lluny. Un altre descobriment va ser al laboratori de **la Maite i el Salvador**, els "geòlegs" que van obrir-me la porta i dedicar el seu esforç a descobrir que dimonis tenia d'especial aquesta ceràmica negra! Mil gràcies per les innombrables proves d'argila.

Treballar a "terreny" és arriscat, ple de reptes i moments durs, però la bona companyia fa que es transformin en experiències emocionants i inspiradores gravades per sempre a la memòria. Moltes gràcies a totes aquelles persones que m'han conegut com "la noia de la universitat" a Darfur, Txad, Cambotja, Etiòpia, Haití i Sudan del Sud. Gràcies a tota la gent amb la que m'he trobat treballant en els programes d'**Oxfam Intermón** per cuidar-me i ajudar-me en els mostrejos i visites, a ensenyarme a ballar *zouk* i salsa. Moltes gràcies als equips de **Metges Sense Fronteres** a Darfur i Sudan del Sud, per estar allà on ningú vol estar i donar tota la vostra professionalitat.

Especials gràcies, a totes les persones que he tingut la sort de conèixer en el camí, els desplaçats, damnificats,els ***invisibles***. Les vostres vides ja formen part de la meva memòria, m'heu ensenyat a tenir perseverança, força i humilitat. Espero que no perdeu mai la mirada endavant i l'esperança.

A mis compañeras de Master de Medicina Tropical, mis "tropis", un autentico tesoro. **Eva, Itzi, Andrea, Carolina, Quesé, Lurdes, Garbiñe, Laurita, Cristina, Zaira y Carole** gracias por compartir, no importa desde que lugar del planeta, vuestras luchas, aventuras y sueños. Espero que sigan aprovechandose las escalas en Barcelona para organizar "tropi-encuentros".

Als meus pares i germana, per tot i saber a mitges de què anaven les meves expedicions (ojos que no ven...) i patir per mi, m'han recolzat i animat a fer el que m'agrada, gràcies per la vostra incondicionalitat.

Joel (un altre gran descobriment), gràcies more per l'escolta, el suport i la paciència infinita en aquests últims mesos de criança i tesi. Ha estat magnífic compartir aquest projecte amb tu. Ara tinc ganes de més.

De tot cor, a totdon, moltes gràcies!

Contingut

1. INTRODUCCIÓ 1

1.1. ACCÉS A L'AIGUA POTABLE 1

1.2. AIGUA I SANEJAMENT EN CONTEXTS DE CRISIS HUMANITÀRIES 2

1.3. CONTAMINACIÓ FECAL DE L'AIGUA DE BEGUDA 3

1.4. PRINCIPALS VIRUS TRANSMESOS PER AIGUA I ALIMENTS 4

1.4.1. Norovirus 6

1.4.2. Adenovirus 8

1.4.3. Virus de l'Hepatitis A (VHA) 11

1.4.4. Virus de l'Hepatitis E (VHE) 13

1.4.4.1. Epidèmies causades pel VHE 16

1.4.4.2. Mesures de control i prevenció de la infecció pel VHE 19

1.5. CONTROL MICROBIOLÒGIC DE LA QUALITAT DE L'AIGUA 21

1.5.1. Indicadors de la qualitat microbiològica de l'aigua 21

1.5.2. Virus com a indicadors de contaminació fecal i com eines de Microbial Source Tracking 23

1.5.3. Mètodes de concentració de virus en aigua 25

1.5.4. Mètodes de detecció i quantificació 27

1.6. TRACTAMENTS DE DESINFECCIÓ D'AIGUA DE BEGUDA 29

1.6.1. Tractaments de desinfecció en els sistemes de proveïment 29

1.6.1.1. Cloració 29

1.6.1.2. Radiació ultraviolada 32

1.6.2. Tractaments d'aigua a nivell domiciliar 35

1.6.2.1. Filtres d'Aigua Ceràmics 37

1.6.2.2. Sobres de floculació-cloració 41

2. OBJECTIUS 45

3. PUBLICACIONS 49

3.1. LLISTAT DE PUBLICACIONS 49

3.2. INFORME DE COAUTORIA 50

3.3. INFORME SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE 52

4. ARTICLES 55

4.1. ARTICLE 1: DESENVOLUPAMENT DE FILTRES D'AIGUA CERÀMICS PER L'ELIMINACIÓ DE VIRUS EN EL CONTEXT HAITIÀ 55

4.2. ARTICLE 2: FONTS DE TRANSMISSIÓ DE VIRUS ENTÈRIC EN CAMPS DE REFUGIATS DEL SUDAN DEL SUD 67

4.3. ARTICLE 3: DESINFECCIÓ PER RADIACIÓ UV I PER SOBRES DE FLOCULACIÓ-CLORACIÓ DEL VIRUS DE L'HEPATITIS E EN AIGUA 75

5. DISCUSSIÓ 86

6. CONCLUSIONS 99

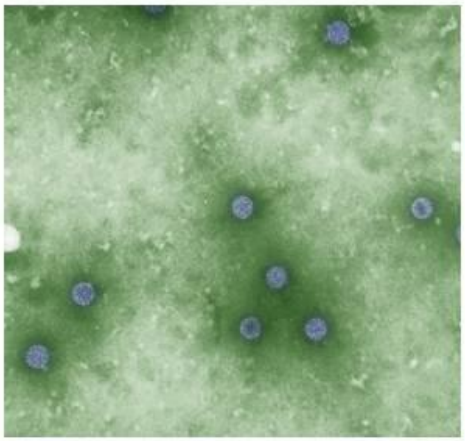
7. REFERÈNCIES **103**

8. ANNEXOS **129**

ANNEX I. ESTUDIS ANTERIORS: VIRUS ENTÈRICS EN CAMPS DE REFUGIATS AL TXAD **129**

ANNEX II. GUIA TÈCNICA PER LES INTERVENCIONS WASH EN EPIDÈMIES CAUSADES PEL VHE **141**

ANNEX III. ALTRES PUBLICACIONS **147**



Introducció

1. Introducció

1.1. Accés a l'aigua potable

La importància de l'aigua per a la vida està recollida al Dret Universal a l'Aigua i el Sanejament que demana per tothom "aigua suficient, segura, a més d'accessible física i econòmicament" (United Nations, 2010). Tot i així, a l'últim informe del *Join Monitoring Program for Water Supply and Sanitation* (JWPWS) estima que a finals de 2014 hi havia més de 663 milions de persones que no disposaven d'accés a fonts d'aigua millorades, més de la meitat d'aquestes vivien al continent africà (Figura 1) (WHO and UNICEF, 2015).

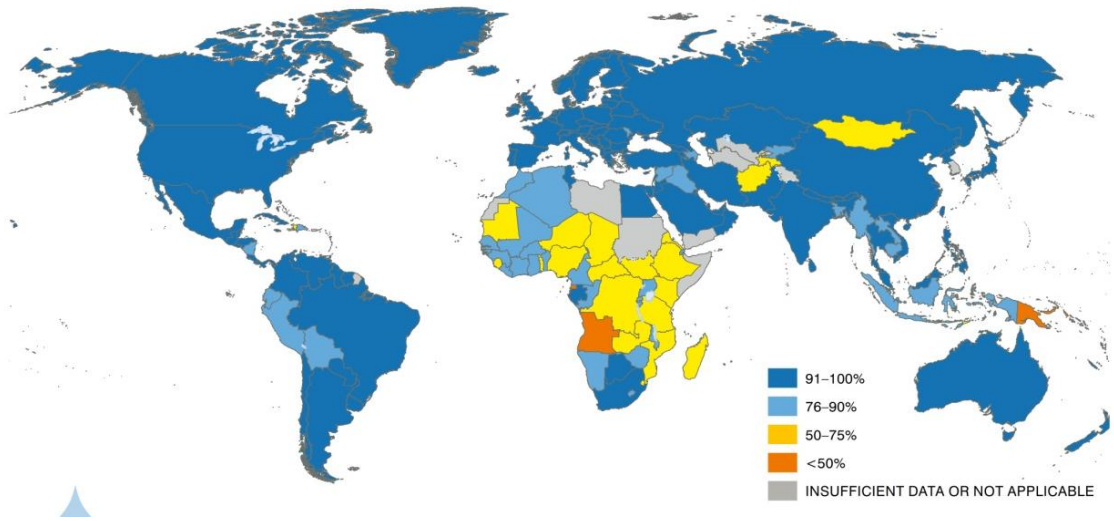


Figura 1. Proporció de població amb accés a fonts d'aigua protegides el 2015 (WHO and UNICEF, 2015)

L'aigua potable és aquella que reuneix les característiques fisicoquímiques i microbiològiques que la fan apta per al consum humà. Tot i que el terme font d'aigua millorada ("*improved water source*") és el que s'utilitza com indicador de la disponibilitat d'aigua de beguda, aquest no implica que sigui una font d'aigua potable, ja que no inclou paràmetres de qualitat microbiològica d'aigua (Shaheed et al., 2014). Una metanàlisi recent conclou que el JMPWS estaria, per tant, subestimant el nombre de persones que no disposen d'aigua segura (Bain et al., 2014b). Els sistemes d'abastiment d'aigua potable, tractada en plantes de potabilització, són generalitzats en països d'alta renta d'Europa, Amèrica i Asia amb un 99.5% de població urbana amb accés a aigua potable canalitzada, mentre que en països de baixa renta l'accés a aquestes fonts és inferior al 15% (Bain et al., 2014a).

Aquestes mancances d'accés, per part de la població de països de baixa renta, són degudes principalment a la baixa cobertura d'estructures bàsiques que responguin a necessitats de

primer ordre (agua, alimentació, salut primària, escolarització, etc...) que generen grans desigualtats en la població del planeta.

1.2. Aigua i Sanejament en contexts de crisis humanitàries

A més, un recurrent agreujant són les crisis humanitàries que esdevenen després d'un desastre natural o un desplaçament massiu de població per conflicte bèl·lic en zones ja de per si, vulnerables. El nombre de persones afectades per crisis humanitàries s'ha gairebé doblat en la darrera dècada. A l'inici del 2015, segons Nacions Unides, 57.5 milions de persones de 22 països necessitaven rebre assistència humanitària a causa de conflictes, desastres naturals o fragilitat social i/o econòmica (UNOCHA, 2015).

El nombre de refugiats i desplaçats a mitjans del 2015 superava els 15 milions, la xifra més alta dels darrers 20 anys, incrementada un 45% en els últims tres anys a causa del conflicte sirià. Els refugiats sota la protecció de l'Alt Comissionat de Nacions Unides pel Refugiat (ACNUR) estan repartits per tot el món, amb el número més gran a l'Àfrica subsahariana (4.1 milions), seguida d'Àsia i el Pacífic (3.8 milions), Europa (3.5 milions), l'Orient Mitjà i el Nord d'Àfrica (3 milions) i les Amèriques (753000) . Els camps de refugiats tenen condicions molt variables segons les condicions de seguretat i la facilitat d'accés a la zona on s'estableixen. Existeixen camps ben establerts, centres de refugi improvisats o refugiats vivint a la intempèrie (UNHCR, 2015a).

Els camps de refugiats són, per la seva naturalesa transitòria un constant flux i reflux de les persones en moviment. En primer lloc, l'afluència de refugiats que fugen durant l'inici d'una crisi arriba als campaments. I després hi ha les arribades posteriors de les persones que han aconseguit quedar-se una mica més en els seus punts d'origen. Aquests moviments constants fan que els camps de refugiats el perfecte brou de cultiu per a les malalties infeccioses importades. A més, sovint l'alta densitat de persones en els camps augmenta el risc de transmissió de malalties de transmissió fecal-oral per la inapropiada gestió dels residus fecals (Aghababian and Teuscher, 1992).

L'aigua, el sanejament i la higiene, "*Water Sanitation and Hygiene*" (WASH) són critiques per la supervivència als estadis inicials d'una emergència, ja que la població (especialment els nens) són més susceptibles a les malalties que normalment són causades per la manca de sanejament, fonts d'aigua inadequades i poca higiene. A més, sumats a l'impacte de les infeccions directament transmeses per l'aigua, s'han de tenir en compte els efectes col·laterals de la diarrea, que redueix la ingesta d'aliment i l'absorció de nutrients incrementant així el risc de malnutrició (Guerrant et al., 2012).

1.3. Contaminació fecal de l'aigua de beguda

S'estima que l'aigua de beguda no segura causa 502000 morts per diarrea a l'any, majoritàriament a la població infantil (Prüss-Ustün et al., 2014). Les fonts de contaminació de l'aigua de beguda poden ser diverses. En regions de baix nivell de sanejament, la principal font de contaminació de l'aigua als pous és la matèria fecal provinent de latrines a poca distància de la font d'aigua de consum (per filtració) i l'escorrentia superficial de residus, que arriben als pous a causa de la degradació de les estructures de protecció (Figura 2). Al risc de contaminació de la font d'aigua hem de sumar-hi el risc de contaminació durant el transport des del punt de recollida al domicili, on diversos estudis han observat una degradació important deguda majoritàriament al tipus de recipients emprats per la recollida i l'emmagatzematge (Wright et al., 2004)

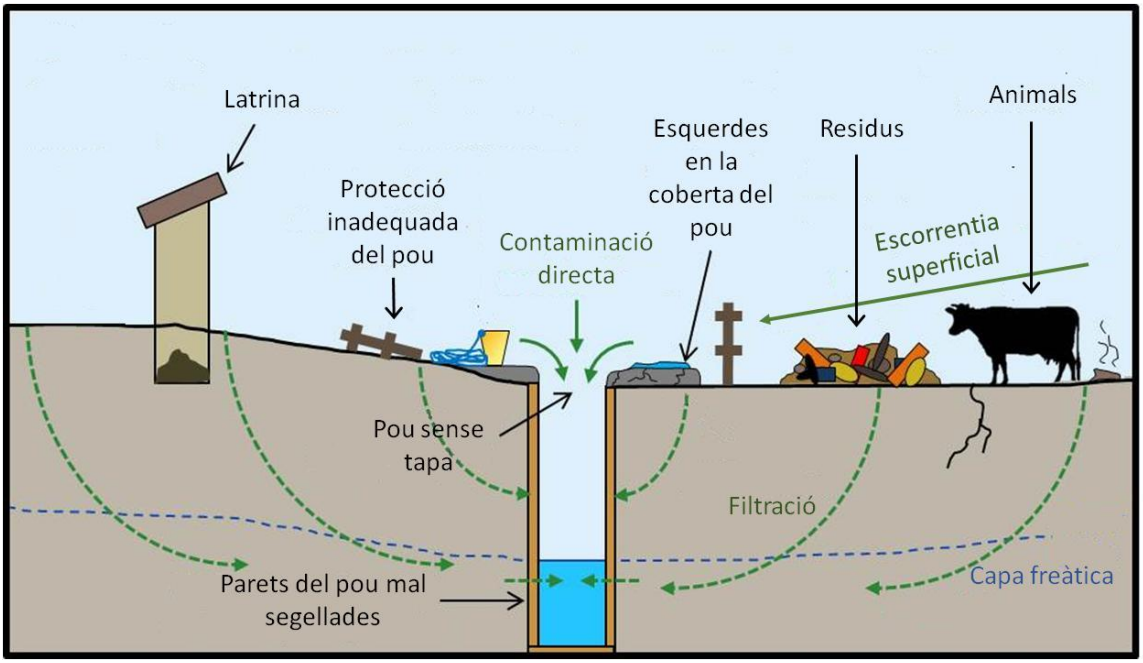


Figura 2. Vies de contaminació de l'aigua subterrània

Les malalties d'origen hídric es poden transmetre als humans per l'aigua i els aliments, el contacte amb mans o altres vectors i per inhalació d'aerosols. Tot i que poden causar diferents simptomatologies, sent la diarrea la més prevalent. Els agents etiològics de diarrea amb més mortalitat acumulada anualment al món són *Escherichia coli* enteropatogènica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigènica (ETEC), *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Vibrio cholerae* O1 i O139, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium spp.*, *Entamoeba hystolitica*, Rotavirus, Calicivirus humans (norovirus genogrup I i II i sapovirus), Astrovirus i Adenovirus (Lanata et al., 2013). A més, hi ha altres patògens transmesos per l'aigua causants de febres entèriques (*Salmonella tiphy* i *Salmonella paratiphy*), poliomielitis (Poliovirus, PV), hepatitis

(Virus de l'Hepatitis A (VHA) i Virus de l'Hepatitis E (VHE)) entre altres simptomatologies. A la Figura 3 es descriuen els principals microorganismes transmesos per l'aigua i les diferents vies de transmissió associades.

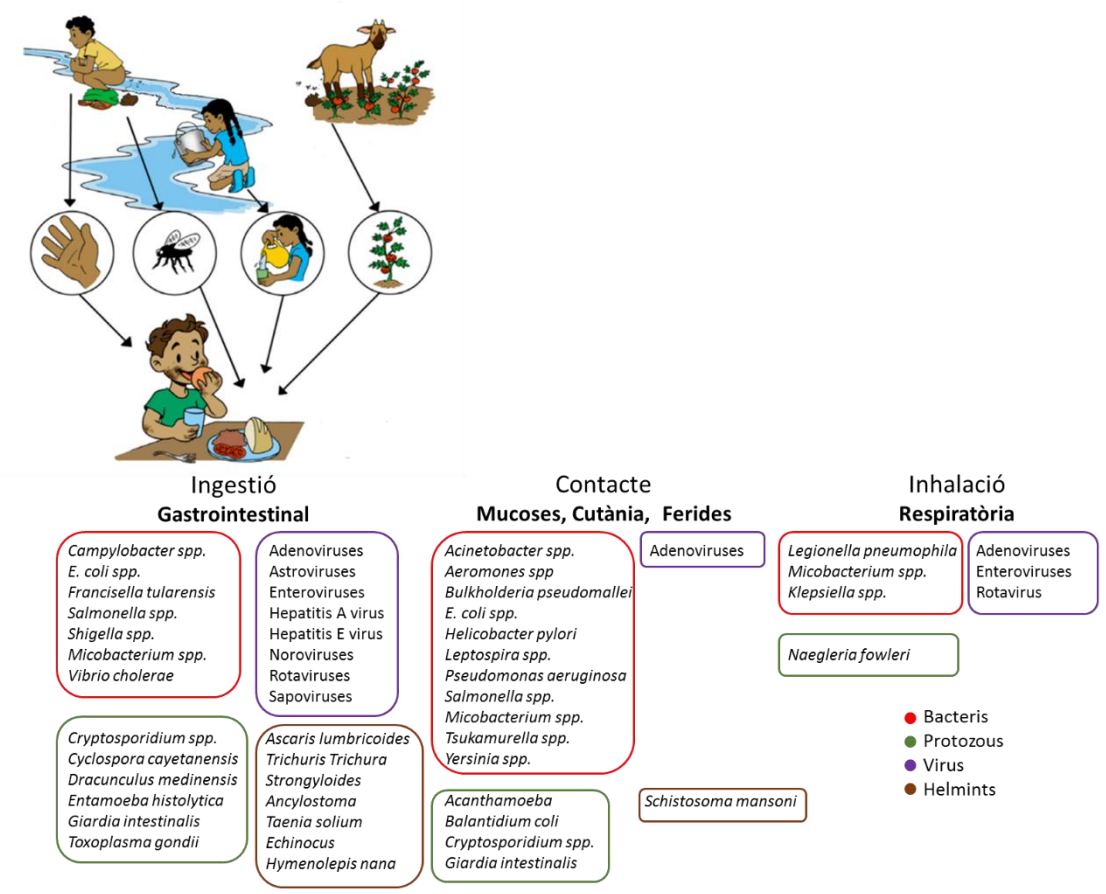


Figura 3. Vies de transmissió i patògens relacionats amb l'aigua

1.4. Principals virus transmesos per aigua i aliments

S'estima que aproximadament un 80% de les diarrees són causades per virus en països industrialitzats (Glass, 2013). Pel que fa als països de baixa renta, un estudi multicèntric recent ha estudiat la incidència dels principals agents etiològics de diarrea en nens a Gàmbia, Mali, Moçambic, Kenya, Índia, Bangladesh i Pakistan. Els resultats de l'estudi mostren com els agents virals són els que acumulaven més incidència atribuïble en els casos de diarrea moderada i severa en menors de 2 anys (Kotloff et al., 2013).

Tot i que els virus transmesos per aigua són capaços de causar diverses malalties (hepatitis, conjuntivitis o infeccions respiratòries) les gastroenteritis agudes són les més prevalents. Els virus entèrics són específics d'hoste i no es poden replicar en l'ambient fora del seu hoste. A més, es caracteritzen per tenir una dosis infecciosa baixa (<10–10^3 partícules víriques) (Gibson,

2014); llargs períodes d'excreció asimptomàtica (3–4 setmanes) i alta estabilitat en l'ambient gràcies a les seves càpsides no embolcallades resistents a canvis de pH (Rzeżutka and Cook, 2004). Els virus humans associats a la contaminació fecal de l'aigua pertanyen a les famílies *Adenoviridae, Astroviridae, Calciviridae, Hepeviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poliomaviridae* i *Reoviridae* (Taula 1).

Família	Gènere	Propietats	Malalties associades
Adenoviridae	Mastadenovirus (Adenovirus humà)	90–100 nm dsDNA	Conjuntivitis, gastroenteritis, malalties respiratòries
Astroviridae	Astrovirus	28–30 nm ssRNA	Gastroenteritis
Picornaviridae	Enterovirus	24–30 nm ssRNA	Gastroenteritis, malaltia Boca-Mà-Peu, encefalitis, meningitis, conjuntivitis
	Hepatovirus (VHA)		Hepatitis Aguda
	Kobuvirus (Aichivirus)		Gastroenteritis
	Salivirus		Gastroenteritis
Hepeviridae	Orthohepatovirus (VHE)	25–30 nm ssRNA	Hepatitis Aguda
Caliciviridae	Norovirus	27–38 nm ssRNA	Gastroenteritis
	Sapovirus		Gastroenteritis
Reoviridae	Rotavirus	70–75 nm dsRNA	Gastroenteritis
Polyomaviridae	Poliomavirus	50-60 nm dsDNA	Nefropaties (BKPyV), leucoencepalopatia multifocal progressiva (JCPyV), càncer de pell (MCPyV)

Taula 1. Principals famílies de virus transmesos per la via fecal-oral

Els principals virus entèrics objectius d'estudi a la tesi han estat el Virus de l'Hepatitis E (VHE) i Adenovirus, també s'han analitzat el Virus de l'Hepatitis A (VHA) i Norovirus. En els següents apartats s'introdueixen les característiques principals d'aquests virus.

1.4.1. Norovirus

Els Norovirus són un gènere que pertany a la família *Calciviridae*, són virus petits de 27-30 nm de diàmetre, no embolcallats i simetria icosaèdrica amb un genoma linear d'ARN de cadena senzilla amb polaritat positiva de 7,3 i 8,3 kb de llargada. Els Calcivirus es classifiquen en cinc gèneres: Norovirus i Sapovirus causants de gastroenteritis en humans, i Lagovirus, Nebovirus i Vesivirus són gèneres que afecten animals. El genoma de Norovirus s'organitza en 3 ORFs i es caracteritza per tenir a l'extrem 5' una petita proteïna unida covalentment (Vpg) i un RNA subgenòmic a l'extrem 3'. La regió pròxima al 5' codifica per les proteïnes no estructurals i les proteïnes estructurals (VP1 i VP2) es troben pròximes a l'extrem 3' (Figura 4). Aquest gènere se subdivideix en 6 genogrups GI-GVI segons la seqüència de la proteïna estructural VP1. Alhora els genogrups I, II i III estan subdividits en 9, 21 i 3 genotips respectivament (Green K. Y, 2013).

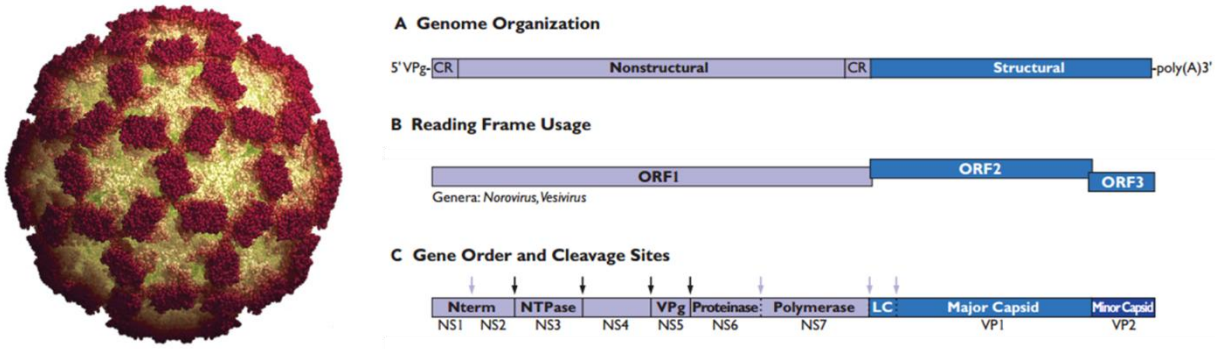


Figura 4. Estructura i mapa de l'organització genòmica de la transcripció dels Norovirus (Green K. Y, 2013)

Les infeccions per Norovirus esdevenen a tot el món sent comunes en població adulta e infantil, presentant una marcada estacionalitat hivernal. Tenen una incubació de 10-51 h, seguida d'una gastroenteritis auto limitada de 28-60 h (Glass et al., 2009). Són altament contagiosos perquè la seva dosis d'infecció és molt baixa (aproximadament 18 - 1000 partícules virals) (Teunis et al., 2008). A més, són la segona causa més important de gastroenteritis (després de rotavirus) en nens al món amb 20.000 morts/anys associades en menors de 5 anys a països de baixa renta (Ahmed et al., 2014). El GII i en particular el GII.4 és el genotip més freqüentment detectat en els brots causats per aquest patògena Europa i EUA, amb el 81.4% de brots associats a GII i 44.2% al GII.4 (Zheng et al., 2010).

No existeix cultiu cel·lular susceptible de replicar eficientment els Norovirus, per això la seva detecció es realitza principalment a través de mètodes moleculars. Tot i així, s'utilitzen alguns Norovirus animals per assajos d'infectivitat, com els Norovirus Murins (MNV) que han mostrat ser una bona aproximació a les soques humanes per la seva similaritat en propietats

genètiques i d'estabilitat (Wobus et al., 2006). Les qRT-PCR utilitzades en la tesi per la quantificació dels genogrups I i II de NoV amplifiquen la regió del genoma que transcriu per la proteïna de la càpsida, VP1 (da Silva et al., 2007; Kageyama et al., 2003; Loisy et al., 2005; Svraka et al., 2007).

Els brots causats per Norovirus tenen una ràtio d'atac del 90%, permetent la ràpida disseminació de la infecció (Ayukekbong et al., 2015). Les mesures higièniques que engloben la desinfecció de l'aigua, aliments i superfícies han mostrat reduir un 84% la transmissió entre individus (Heijne et al., 2009). Els Norovirus són molt estables en l'ambient, persistint viables en aigua subterrània i superfícies durant més de 60 dies (Mormann et al., 2015; Seitz et al., 2011). Són altament resistents a pH àcids, no mostrant reduccions significatives després de l'exposició a pH 2 durant 30 min, 37 °C (Duizer et al., 2004). Tot i així, sembla presentar cinètiques d'inactivació al clor i la radiació ultraviolada similar a altres virus ARN de cadena simple (Cromeans et al., 2010; De Roda Husman et al., 2004).

Estudis han mostrat que la immunitat adquirida per la infecció per Norovirus no es perllonga en el temps, a diferència de la immunitat adquirida de per vida després de la infecció pel VHA (Karst et al., 2003). Per altra banda, exiteixen persones resistents a la infecció per NoV a causa de polimorfismes als gens ABO, FUT2, i FUT3 que codifiquen diverses glucosiltransferases responsables d'afegir molècules de fucosa als antígens determinants en la unió al receptor (Ruvoën-Clouet et al., 2013). A més, està progressant el desenvolupament d'una vacuna per Norovirus que fins ara ha mostrat bons resultats en els assajos clínics de fase II en humans (Pringle et al., 2015).

1.4.2. Adenovirus

Els Adenovirus són una família que infecta gran varietat d'animals: *Mastadenovirus*, de mamífers; *Aviadenovirus*, d'aus; *Atadenovirus*, d'ovins, bovins i ànecs; i *Siadenovirus* de granotes i gall d'indi. Les especies que infecten humans són del gènere *Mastadenovirus*. Són virus de doble cadena d'ADN amb genomes d'entre 36 i 38 Kb, amb un diàmetre de 70-100 nm. Els genomes d'adenovirus humans contenen 5 unitats transcripció primerenca (E1a, E1b, E2, E3, i E4), quatre unitats de transcripció intermèdies que apareixen amb l'inici de la replicació de l'ADN viral (IX, IVa2, L4 intermedi i E2 tardà), i una unitat de transcripció tardana que es processa per generar cinc famílies dels ARNm tardans (L1-L5). En total el seu genoma codificarà per 13 proteïnes estructurals i 35 no estructurals. La càpsida no embolcallada icosaèdrica està composta principalment de 240 capsòmers homotrímers d'hexó (12 per cada una de les 20 cares triangulars de l'icosàedre), 12 pentons capsòmers en cada vèrtex de l'icosàedre, i 12 fibres que s'estenen des dels pentons (Figura 8) (Wold and Ison, 2013).

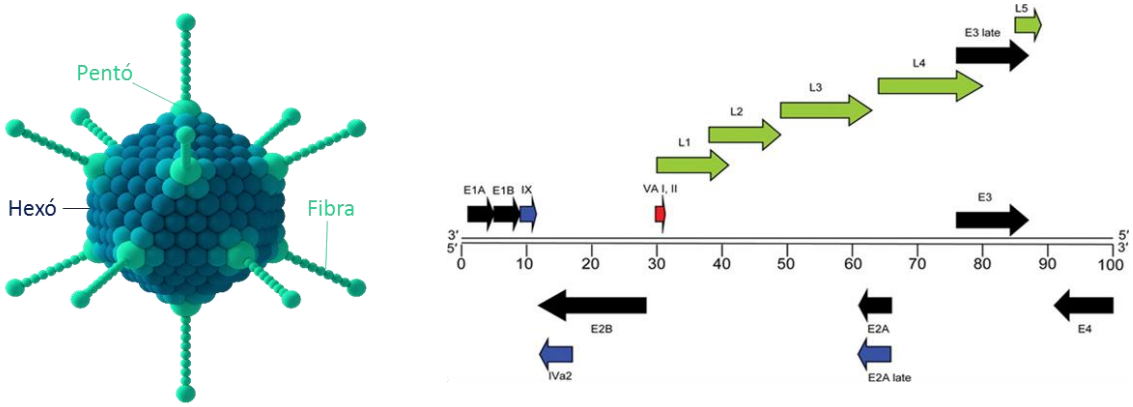


Figura 8. Estructura i mapa de l'organització genòmica de la transcripció dels Adenovirus (Hall et al., 2010)

Hi ha fins a 35 genotips distribuïts en 7 espècies que van del adenovirus-A al adenovirus-G humà. Causen una gran diversitat de simptomatologies que varien segons el tropisme de cada serotip (Taula 4). De les síndromes més importants causats per adenovirus humans (HAdV), les malalties respiratòries estan associades principalment als HAdV 3, 5 i 7, les gastroenteritis als HAdV 40 i 41 i les conjuntivitis als HAdV 8, 19 i 37, les cistitis hemorràgica aguda als HAdV 11 i 21 i en pacients immunodeprimits s'han descrit casos de meningoencefalitis associades als serotips 7, 12 i 32 (Mena and Gerba, 2009). Alguns adenovirus, a més, estan associats amb tumors en ratolins, però aquesta associació mai s'ha fet en l'home.

Especies	Genotips	Tropisme	Potencial Oncogènic
A	12, 18, 31	Sistema respiratori, Urinari, Digestiu	Alt
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55	Sistema Respiratori, Urinari, Digestiu, Ocular	Moderat
C	1, 2, 5, 6, 57	Sistema respiratori, Urinari, Digestiu	Baix
D	8-10,13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56	Sistema Digestiu, Ocular	
E	4	Sistema Respiratori, Digestiu	
F	40,41	Sistema Digestiu	Desconegut
G	52	Sistema Digestiu	Desconegut

Taula 4. Característiques de les espècies d'Adenovirus Humans

Els adenovirus poden ser cultivats i aïllats utilitzant múltiples línies cel·lulars com són les A549 (cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma pulmonar humà) i Caco-2 (cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma colorectal humà). La línia cel·lular 293 provinent de ronyó humà ha mostrat gran capacitat per replicar els serotips 40 i 41 (Shaw et al., 2002). Per altra banda les tècniques moleculars per detectar adenovirus fan servir com a diana la regió del hexó per la seva alta conservació entre serotips i per incloure regions variables que permeten la classificació posterior (Allard et al., 1994; Jiang, 2006; Pina et al., 1998b)

Les infeccions per HAdV estan esteses per poblacions de tot el món. S'estima que un 60% de les infeccions es produeixen en menors de 4 anys i que el 47-55% d'aquestes infeccions són asimptomàtiques (Carter, 2005). Les malalties respiratòries per HAdV són molt prevalents en nens amb un 5-10% de les infeccions respiratòries associades a HAdV (Pavia, 2011). Un estudi a Asia sobre agents vírics etiològics de diarrea en nens, va concloure que un 4% dels casos pediàtrics de diarrea eren causats per HAdV, sent els serotips 40 i 41 els que presentaven més prevalença (Subekti et al., 2002). Després d'una infecció primària, es confereix immunitat de per vida per al serotip causal específic. Després de la infecció aguda, alguns tipus d'adenovirus poden ser excretats en femta durant mesos-anys, i això és probablement responsable de la propagació endèmica a altres grups susceptibles a través de la via fecal-oral. Algunes infeccions poden persistir en una fase latent en els teixits com ara amígdales, adenoides, intestí i el tracte urinari de per vida (Neumann et al., 1987). En conseqüència, HAdV es detecta

consistentment en aigües residuals de diferents àrees geogràfiques. Això ha portat a suggerir que HAdV pot ser apropiat per a la indicació de la contaminació fecal en aigua (Pina et al., 1998b; Wyn-Jones et al., 2011).

Pel que fa a la desinfecció i eliminació del virus en l'ambient, els adenovirus són molt resistents. Per reduir la càrrega viral significativament, els HAdV necessiten temperatures de 85 °C durant almenys 2 hores (reducció de 6.2 logaritmes) (Sauerbrei and Wutzler, 2009). D'altra banda, referent als tractaments de desinfecció, els HAdV presenten també alta estabilitat. Davant de la desinfecció per clor, calen 30 min a 2.5 mg/L per una reducció de 2.7 logaritmes (de Abreu Correa et al., 2012; Girones et al., 2014). I davant la radiació UV una inactivació de 2 logaritmes calen 1400 J/m^2, dosis molts superiors a les establertes per les guies de tractament rutinari (Calgua et al., 2014). L'estabilitat dels adenovirus en condicions ambientals estressants també afavoreixen el seu ús com a indicador.

1.4.3. Virus de l'Hepatitis A (VHA)

El Virus de l'Hepatitis A (VHA) és l'únic membre del gènere *Hepatovirus* i està classificat dintre de la família *Picornaviridae* que actualment inclou 29 gèneres. És un virus no embolcallat d'uns 27 nm de diàmetre, amb cadena senzilla d'ARN de polaritat positiva d'uns 7.5 Kb de llargada. Com altres picornavirus el genoma del VHA té una petita proteïna covalentment unida a l'extrem 5', seguida d'un llarg i únic ORF que codifica per una poliprotena d'uns 2227 aminoàcids, que es processada proteoliticament en pèptids estructurals (P1-2A) i no estructurals (2B-C i P3) (Figura 5) (Hollinger and Martin, 2013).

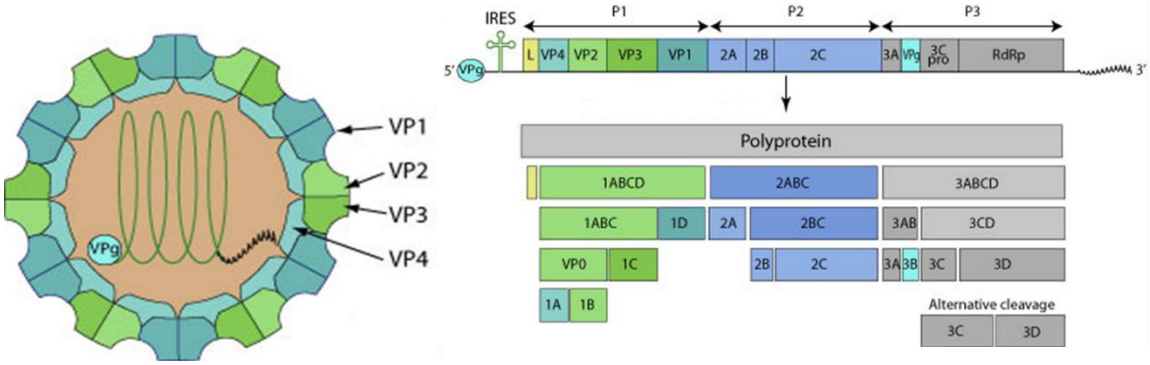


Figura 5. Estructura i mapa de l'organització genòmica de la transcripció del Virus de l'Hepatitis A (ViralZone, 2016)

Segons el coneixement actual, hi ha sis genotips de distribució mundial, sent els genotips I, II i III els que contenen les soques humanes, entre ells els subgenotips IA i genotip III els més prevalents (Vaughan et al., 2014). El VHA és un dels agents infecciosos causants d'hepatitis aguda al món més importants. Humans i primats són els reservoris naturals per aquest virus, tot i que s'han descrit soques relacionades genotípicament i fenotípicament al VHA (HAV-like) en animals no primats (Anthony et al., 2015; Drexler et al., 2015).

En zones del món on els nivells de sanejaments són baixos, els estudis de prevalença revelen que les infeccions pel VHA apareixen en edats primerenques i que aproximadament el 100% de la població infantil adquireix immunitat durant la primera dècada de vida. D'altra banda en societats amb sistemes de sanejament més desenvolupats han reduït la seroprevalença en persones joves i per tant, en regions on no està sistematitzada la vacunació, hi ha una gran part de la població susceptible d'infectar-se si entren en contacte amb el virus (Jacobsen and Wiersma, 2010), i s'incrementa la possibilitat que es produeixin casos clínics i complicacions que augmentarien amb l'edat.

El Virus de l'Hepatitis A presenta una certa estabilitat als tractaments de desinfecció químics com el clor, amb el que es requereix una concentració de 0.8 mg/L, 6 min d'exposició per 3 logaritmes de reducció (Grabow et al., 1983). Pel que fa a tractament tèrmic, el VHA presenta més resistència a altes temperatures sobretot si es troba associat a greixos (Bidawid et al., 2000). En canvi, no ha mostrat diferències de resistència respecte altres virus entèrics al tractament amb radiació UV, ja que una radiació de 200 J/m2 seria suficient per eliminar 3 logaritmes del VHA en suspensió (Battigelli et al., 1993).

Per prevenir de la infecció causada pel VHA existeix una vacuna del virus inactivat amb VHA produït en cultiu cel·lular, purificat, inactivat amb formalina i finalment absorbit a un adjuvant d'hidròxid d'alumini. Aquesta vacuna presenta una alta capacitat immunògena que protegeix de la infecció i malaltia envers totes les soques del VHA descrites (Martin and Lemon, 2006). La disponibilitat d'una vacuna eficient i assequible econòmicament fa pensar en la possible eradicació del virus en regions on hi pugui haver una alta cobertura vacunal (Murphy et al., 2016).

1.4.4. Virus de l'Hepatitis E (VHE)

Els virions de l'hepatitis E tenen una mida de 27 a 32 nanòmetres de diàmetre, una càpsida no embolcallada de simetria icosaèdrica i un genoma d'ARN de cadena senzilla amb polaritat positiva de 7.2 Kb (Ahmad et al., 2011). El seu genoma està estructurat en tres pautes de lectura obertes (ORFs) superposades, ORF1, ORF2 i ORF3. El més llarg, el ORF1 a l'extrem 5' codifica per les proteïnes no-estructurals incloent metiltransferasa, proteasa, helicasa i l'ARN polimerasa ARN depenent (RdRp) (Figura 6). A l'extrem 3' trobem el ORF2 que codifica per les proteïnes de la càpsida que participen en l'assemblatge, la unió amb la cèl·lula hoste i és la diana d'anticossos neutralitzants. Finalment, el ORF3 que se sobreposa al ORF2 i ORF1 en els seus extrems, codifica per una petita proteïna estructural implicada en la sortida del virus de la cèl·lula infectada i es troba present en la superfície de les partícules alliberades associada a lípids (Koonin et al., 1992; Yamada et al., 2009).

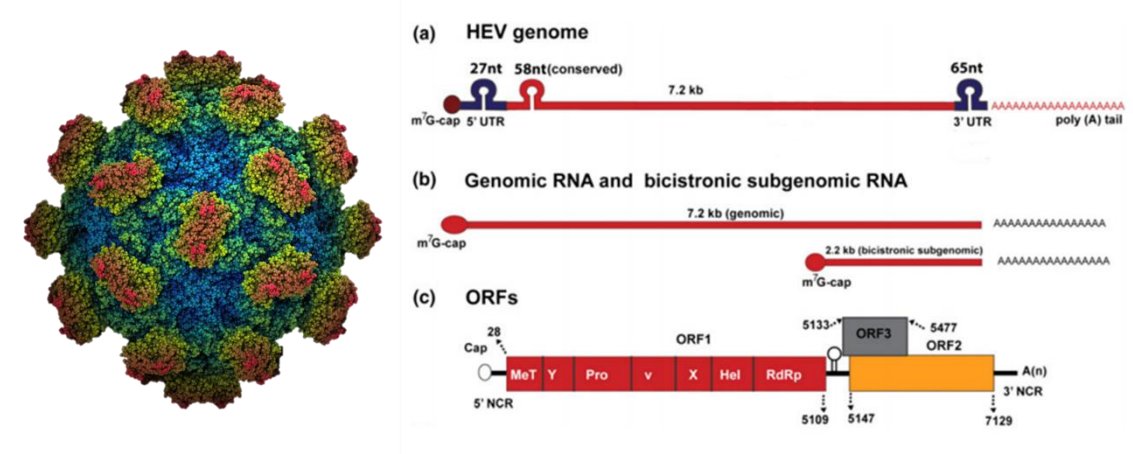


Figura 6. Estructura i mapa de l'organització genòmica de la transcripció del Virus de l'Hepatitis E (Khuroo and Khuroo, 2016; Yamashita et al., 2009)

El cicle de vida del VHE és poc conegut, en gran part per la falta de disponibilitat de mètodes de cultiu *in vitro* eficients. Sabem que les partícules virals es concentren a la superfície dels hepatòcits, i a través d'un receptor específic encara no caracteritzat s'internalitzen. Els virus llavors alliberen l'ARN genòmic que es tradueix en el citoplasma en proteïnes no estructurals (ORF1). L'ARN polimerasa ARN dependent replica l'ARN genòmic generant un ARN de sentit negatiu; aquests últims actuen llavors com plantilles per a la síntesi d'ARN subgenòmic de 2.2 kb, així com la transcripció en sentit positiu de l'ARN genòmic. L'ARN subgenòmic de sentit positiu és traduït en les proteïnes estructurals dels ORF2 i ORF3. Les proteïnes de la càpsida empaqueten l'ARN genòmic per crear nous virions que s'alliberen de la cèl·lula a través d'un mecanisme no caracteritzat (Chandra et al., 2008). Encara que originalment es considera un

virus sense embolcall, estudis recents mostren que el VHE en sang està embolcallat per membrana cel·lular del complex endosomal (Nagashima et al., 2014; Yin et al., 2016).

En l'actual classificació taxonòmica, el VHE es troba com a membre de la família *Hepeviridae* dins del gènere Orthohepevirus. El gènere té tres espècies que infecten aus (Orthohepevirus B), rosegadors, soricomorfs i carnívors (Orthohepevirus C), o ratpenats (Orthohepevirus D) i una espècie Orthohepevirus A, que comprenen 7 genotips que infecten als éssers humans (VHE 1, 2, 3, 4 i 7), porcs (VHE- 3 i 4), conill (VHE-3), senglar (VHE- 3, 4, 5 i 6), la mangosta comuna (VHE-3), cérvols (VHE-3), el iac (VHE-4) i camells (VHE-7) (Smith et al., 2016).

Dintre de l'espècie del VHE que infecta humans trobem 4 genotips reconeguts amb distribució geogràfica diferenciada (Figura 7). El genotip 1 és el més prevalent i consta de soques africanes i asiàtiques principalment. Una de les epidèmies més importants va ser registrada a Xinjiang, Xina entre el 1986-88 amb aproximadament 120.000 casos (Aye et al., 1992; Wang et al., 1991). Més recentment, l'any 2015, un brot de més de 7000 casos s'ha descrit a Biratnagar, Nepal (Shrestha et al., 2015). A més, epidèmies causades pel genotip 1 s'han notificat a diferents països del continent africà en camps de refugiats o població desplaçada: Namíbia, Sudan i Uganda (Guthmann et al., 2006; Isaäcson et al., 2000; Eyasu H Teshale et al., 2010). El genotip 2 va ser detectat per primer cop a Mèxic en un brot que va afectar 223 persones entre el 1986-87 (Velazquez et al., 1990). Posteriorment aquest genotip s'ha reportat al continent africà: Txad, República Centreafricana (RCA) i Namíbia (Nicand et al. 2005; Goumba et al. 2011; Maila et al. 2004). La via de transmissió més important descrita d'aquestes epidèmies causades pels genotips 1 i 2 és a través d'aigua contaminada (Hazam et al., 2010; Ippagunta et al., 2007). Tot i que la transmissió secundària persona-persona es considera poc important durant les epidèmies, estudis recents en Uganda i Sud Sudan indiquen que el contacte i cuida de persones malaltes és un factor de risc per adquirir la infecció (Epicentre, 2012; Howard et al., 2010).

El genotip 3 del VHE va ser descobert el 1997 en mostres de porcs als EUA (Meng et al., 1997) que més tard va ser associada a una soca descrita en pacients amb hepatitis aguda (Schlauder et al., 1998). Posteriorment molts estudis han detectat el genotip 3 en humans i diverses espècies animals amb una àmplia distribució geogràfica (Purdy and Khudyakov, 2011), sent el genotip més prevalent en països industrialitzats d'Europa, EUA i Japó. Les primeres dades de la seva circulació al continent africà han estat reportades en porcs del Camerun (S de Paula et al., 2013) i a països de Sud Amèrica: Colòmbia i Xile (Ibarra et al., 1997; Rendon et al., 2016). El genotip 4 va ser identificat al 1998 a Taiwan en humans i porcs de la mateixa regió (Hsieh et

al., 1999). La majoria de casos del VHE genotip 4 són endèmics a Xina i Japó on infecten humans i porcs (Liu et al., 2012; Sato et al., 2011). Recentment diversos estudis a Holanda, Bèlgica i França indiquen la seva propagació per Europa (Hakze-van der Honing et al., 2011; Jeblaoui et al., 2013).

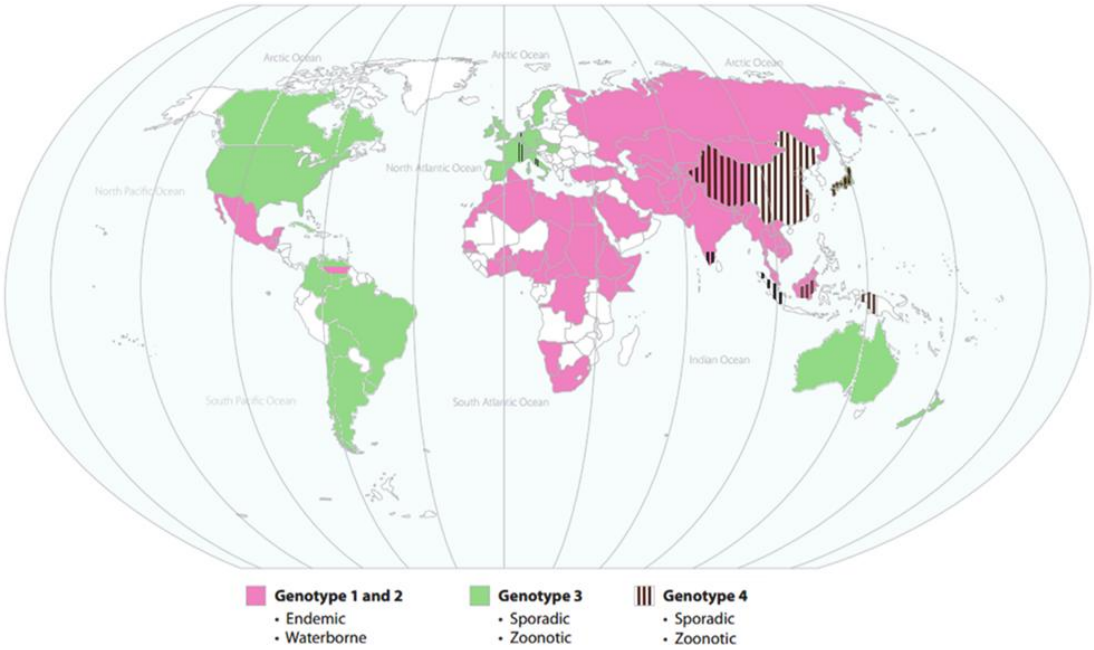


Figura 7. Distribució geogràfica dels genotips humans del Virus de l'Hepatitis E adaptada de Kamar et al. 2012, Fierro et al. 2016 i Mirazo et al. 2014

La via de transmissió més freqüent dels genotips 3 i 4 als humans està principalment relacionada amb el consum d'aliments contaminats i la zoonosi i no hi ha descrits importants brots epidèmics (Lewis et al., 2010). El nostre grup de recerca va descriure per primera vegada la circulació del VHE a Europa amb una alta diversitat ambiental de soques (Clemente-Casares et al., 2003; Pina et al., 1998a) En països industrialitzats d'Europa, Japó i EUA la seroprevalença d'anticossos específics per VHE en porcs domèstics remarca la importància de la font d'infecció animal (Pavio et al., 2010). Evidències moleculars han confirmat la ruta alimentaria del genotip 3 a través de la ingestió de carn de porc (Riveiro-Barciela et al., 2015), a més de la descripció d'algun brot associat al consum de carn a França (Berto et al., 2013). Recentment, estudis han suggerit altres vies potencials de transmissió en països endèmics del VHE: transmissió per administració de productes sanguinis i transmissió per trasplantament d'òrgans (Marion et al., 2016).

La infecció pel VHE és en la major part dels casos asimptomàtica, al voltant del 67-98% dels infectats no presentarà cap simptomatologia. Després d'un llarg període d'incubació de 4 a 8 setmanes algunes persones desenvolupen una hepatitis aguda generalment auto limitada en

adults joves d'entre 15-30 anys (Scobie and Dalton, 2013). La taxa de mortalitat està descrita al voltant de l'1%, on la majoria són dones embarassades durant el tercer trimestre de gestació, amb un 25% de mortalitat associada principalment als genotips 1 i 2 (Labrique et al., 2012). Recentment també s'han descrit trastorns neurològics en pacients infectats referents al genotip 3 (Dalton et al., 2015; Kamar et al., 2011), que a més també s'ha associat a infeccions cròniques en persones immunodeprimides (Kamar et al., 2013).

Actualment, s'han proposat alguns sistemes de cultiu en línies cel·lulars per replicar i aïllar el VHE de mostres ambientals o clíniques al laboratori (Okamoto, 2013). Els nous sistemes de replicació que han mostrat millors resultats provenen de soques del genotip 3 de pacients crònics que han sofert una recombinació a la regió ORF1 (Taula 2)

Soca VHE	Origen	Característiques	Línia cel·lular	Referència
Kernow-C1	Pacient crònic, UK	Inserció de gen ribosòmic humà al ORF1	HepG2/C3A	(Shukla et al., 2012)
LBPR000379	Pacient crònic, USA	Inserció de gen ribosòmic humà al ORF1	HepG2/C3A	(Nguyen et al., 2012)
47832	Pacient crònic, Alemanya	Inserció de seqüència de VHE genotip 1 al ORF1	A549	(Johne et al., 2014)

Taula 2. Sistemes de cultiu i replicació del Virus de l'Hepatitis E

1.4.4.1. Epidèmies causades pel VHE

La Taula 3 resumeix les epidèmies més importants conegudes causades pel Virus de l'Hepatitis E arreu del món. Des del 1988, unes 17 epidèmies han estat notificades al continent Africà causant uns 35300 casos i 788 morts. La majoria d'aquestes epidèmies s'han iniciat en camps de persones refugiades o campaments militars, contexts d'alta densitat poblacional i baix sanejament. Les taxes de mortalitat entre la població general han estat descrites entre 1,8 i 17,8%, sent el cas de Sudan 2004 el causant de més morts, associades al mal estat de salut de les persones refugiades del conflicte a Darfur (Boccia et al., 2006). Referent a les dones embarassades, la mortalitat descrita en les epidèmies africanes ha estat entre el 12,5 i el 41% (Kim et al., 2014).

El patró epidèmic dels brots es caracteritza per tenir una durada d'entre 4 a 20 mesos i iniciar-se després del període de pluges fortes sovint acompanyades d'inundacions (Bile et al., 1994; Boccia et al., 2006; Ahmed et al., 2013; Guerrero-Latorre et al., 2011). Tot i que el patró sembla indicar una clara transmissió del VHE a través de l'aigua, pocs estudis han avaluat la circulació del virus en aquests contexts, a causa de la dificultat d'accés a les zones de conflicte.

En el brot d'Uganda en camps de refugiats sudanesos el 2007 es va detectar el VHE en l'aigua de superfície en 2 de 4 mostres analitzades però en cap de les 15 mostres d'aigua de beguda (Howard et al., 2010). En el cas de l'epidèmia a Darfur el 2004, un estudi cas-control va indicar que un factor de risc de contraure la malaltia era veure aigua d'una font d'aigua que s'extreia del riu tractada amb clor (Guthmann et al., 2006), aquest estudi va posar en dubte l'eficiència dels tractaments de desinfecció pel VHE.

Un estudi realitzat per la doctoranda el 2009 als camps de refugiats del Txad on s'havien reportat casos del VHE, analitzant la presència d'adenovirus humans, va mostrar diferents fonts d'aigua de beguda que presentaven contaminació fecal. Es van analitzar pous d'aigua dels Camps de Goz Amir i Dogdoré després de l'època de pluges per virus indicadors de contaminació fecal humana (adenovirus humans) i pel VHE i el VHA. Cap font d'aigua va presentar contaminació pel VHE ni VHA, tot i així, 1/7 pous de Goz Amir i 3/9 de Dogdoré van resultar positius per HAdV. Aquests resultats indicaven que l'aigua de beguda dels camps estava contaminada amb matèria fecal humana i per tant, eren fonts potencials de transmissió fecal-oral del VHE si augmentava la seva circulació dintre els camps. Els resultats d'aquest estudi van ser publicats al *Journal of Water and Health* el 2011 (Annex I: Guerrero-Latorre et al. 2011).

	País	Any	Casos	Morts	Genotip	Referència
Àsia	Índia	1955	29300	75	-	(Arankalle et al., 1994)
		1976	2572	6	1	(Arankalle et al., 1994)
		1978-9	20000	600	-	(Arankalle et al., 1994; Khuroo M., 1991)
		1979-80	6000	180	-	(Arankalle et al., 1994; Khuroo M., 1991)
		1980	865	7	-	(Arankalle et al., 1994)
		1981	1169	10	-	(Arankalle et al., 1994; Khuroo M., 1991)
		1981-2	15000	450	-	(Arankalle et al., 1994; Khuroo M., 1991)
		1982	1072	-	-	(Arankalle et al., 1994)
		1984	3005	-	1	(Arankalle et al., 1994)
		1985	1395	-	-	(Arankalle et al., 1994)
		1986	1015	-	-	(Arankalle et al., 1994)
		1987	2215	-	-	(Dilawari et al., 1994)
		1990	>3000	-	1	(Arankalle et al., 1994)
		1991	1442	-	-	(Naik et al., 1992)
		2005	429	3	-	(Sarguna et al., 2007)
		2008	23 915	315	1	(Vivek et al., 2010)
		2012	5100	36	-	(Joon et al., 2015)
	Bangladesh	2008-9	4751	17	-	(Gurley et al., 2014)
	Indonèsia	1991	1688	17	1	(Corwin et al., 1995, 1999)
	Myanmar	1976-7	20000	-	-	(Uchida et al., 1993)
	Nepal	1973-4	10000	-	-	(Khuroo M., 1991)
		1981-2	4337	304	-	(Khuroo M., 1991)
		1987	7405	-	-	(Shrestha, 2006)
		2014	7000	14	1	(Shrestha et al., 2015)
	Pakistan	1993-4	3827	8	-	(Rab et al., 1997)
		2005	1200	-	-	(Baqir et al., 2012)
	Turkmenistan	1985	16175	-	1	(Albetkova et al., 2007)
	Iraq	2005	102	-	-	(Al-Nasrawi et al., 2010)
	Xina	1986	119280	1062	1	(Aye et al., 1992; Wang et al., 1991)
Àfrica	Botswana	1985	273	4	-	(Byskov et al., 1989)
	RCA	2002	222	4	1-2	(Goumba et al., 2011)
	Txad	2004	959	30	2	(Guerrero-Latorre et al., 2011; Nicand et al., 2005)
	Djibouti	1993	111	-	-	(Coursaget et al., 1998)
	Etiòpia	1988	423	-	-	(Tsega et al., 1991)
		2014-15	1117	21	-	(Browne et al., 2015)
	Kenya	1991	1765	63	-	(Mast et al., 1994)
		2012	223	4	-	(Ahmed et al., 2013)
	Namíbia	1983	201	7	1	(Isaäcson et al., 2000)
		1995	600	3	2	(Maila et al., 2004)
	Somàlia	1988-89	11413	346	-	(Bile et al., 1994)
	Sudan	2004	2621	45	1	(Boccia et al., 2006; Guthmann et al., 2006)
	Sud Sudan	2012-13	5080	101	-	(CDC, 2013; Epicentre, 2012)
	Uganda	2008	10535	160	1	(Eyasu H Teshale et al., 2010)
Amèrica	Mèxic	1986-7	223	3	2	(Velazquez et al., 1990)

Taula 3. Epidèmies causades pel Virus de l'Hepatitis E

1.4.4.2. Mesures de control i prevenció de la infecció pel VHE

Des del 2012 existeix una vacuna desenvolupada i amb llicència comercial a Xina que en assajos clínics va mostrar un 95% de protecció en els pacients que rebien la vacuna (Park, 2012); tot i així, no ha estat testada en dones embarassades ni en nens menors de 16 anys. Per aquest motiu, no ha estat aprovada per l'OMS per ser inclosa en programes nacionals de països endèmics (WHO, 2015), encara que s'està discutint el seu ús en contexts epidèmics per població especialment en risc (Labrique et al. 2012).

Com que no es disposa d'una vacuna segura, les mesures de control per prevenir nous casos en situacions de risc són enfocades a la qualitat de l'aigua de beguda, el sanejament i la higiene.

Davant d'epidèmies causades pel VHE, la majoria de guies d'intervenció en ajuda humanitària recomanen la cloració dels sistemes de distribució d'aigua (UNHCR, 2014; WHO, 2014a) com a tractament eficaç per la desinfecció del VHE. Tot i així, els protocols d'actuació de *Mediciens Sans Frontieres* (MSF) suggereixen que el clor podria ser un tractament ineficient per la desinfecció del VHE i recomanen instal·lar sistemes de radiació UV en situacions on se sospiti que el VHE pot estar transmès a través de l'aigua (MSF, 2010). Aquest posicionament de MSF va ser degut als resultats d'una avaluació epidemiològica durant l'epidèmia del 2004 a Darfur, on els resultats d'un estudi de cas-cohort en malalts d'Hepatitis E va indicar que consumir aigua d'una font clorada comportava un risc incrementat de ser infectat amb risc relatiu d'1.26 tot i no ser estadísticament significatiu (IC 95%: 0.61-2.59) (Guthmann et al., 2006).

La falta de cultius cel·lular eficients per replicar el VHE al laboratori ha retardat els estudis d'infectivitat tot i ser importants implementar polítiques d'actuació per la prevenció i contingència de la transmissió del virus.

L'estabilitat tèrmica del VHE ha estat estudiada per Sue Emerson i col·laboradors amb genotips VHE-2 i VHE-1 incubant les suspensions virals durant 1 hora a temperatures entre 45 i 70ºC. Les suspensions després del tractament van ser inoculades en la línia cel·lular HepG2/C3A i quantificades amb immunofluorescència després de 5 dies post-infecció. Els resultats van mostrar com el 95% de les partícules virals s'inactivaven després de 15 min a 56 °C, però un 1% romania infecciós després d' 1 hora a 60 °C i cap virus restava infecciós després d'1 hora incubant la suspensió a temperatures de 66 o 70 °C (Emerson et al., 2005). Reimar Johne i col·laboradors han treballat recenment amb una soca VHE-3 derivada d'un pacient crònic que replicava lleugerament en cèl·lules A549 per estudiar l'estabilitat a la temperatura. Els

sobrenedant del cultiu cel·lular incubats a 65°C per 2 minuts no van presentar infectivitat post-tractament (Johne et al., 2014).

L'efecte del clor com a desinfectant del VHE ha estat avaluat recentment. Es va estudiar l'efecte d'hipoclorit de sodi sobre una soca del genotip 1 VHE en un tampó lliure de demanda de clor (Buffer Demand Free, BDF) cultivada amb cèl·lules Caco-2 i determinant la infectivitat per immunofluorescència (Girones et al., 2014). Els assajos van ser realitzats amb presència i absència de 1% d'aigua residual per incrementar la concentració de matèria orgànica. Els resultats van mostrar que per aconseguir una reducció de 2 logaritmes es requerien valors de *Ct* de 0.41 en absència d'aigua residual i de 11.21 en la suspensió que contenia major càrrega de matèria orgànica. Aquest estudi indica que les dosis de clor recomanades per les guies d'intervenció en epidèmies causades pel VHE són suficients per a una inactivació del 99%.

Com a resultat dels estudis de desinfecció del VHE inclosos en la tesi, a més la revisió de la literatura existent, la doctoranda ha elaborat amb la supervisió de la seva directora de tesis una guia tècnica per Oxfam Internacional sobre les intervencions d'aigua i sanejament en contexts d'epidèmia causada pel VHE (Annex II: *Technical Brief Hepatitis E Outbreak Response*).

1.5. Control microbiològic de la qualitat de l'aigua

El control microbiològic de l'aigua és una eina de prevenció integrada en el control dels sistemes de proveïment i distribució d'aigua mundialment acceptat. Diferents regulacions estableixen les politiques de control i monitoratge de l'aigua de beguda en àmbit nacional, internacional e inclús en contexts d'emergència humanitària (Directiva Europea 98/83/CE, 1998; RD 140/2003, 2003; The Sphere Project, 2011; USEPA, 2012; WHO, 2011a).

Atès que la principal problemàtica que comporta la contaminació fecal de l'aigua en salut publica són les malalties infeccioses, la política més segura seria de controlar directament els patògens microbians a l'aigua. No obstant això, els patògens poden ser rars, difícils de cultivar, i desiguals en la seva distribució. A més, per controlar tots els patògens, es requeriria un gran nombre d'assajos; aquests assajos poden ser tècnicament costosos i complicats.

1.5.1. Indicadors de la qualitat microbiològica de l'aigua

Per tal d'avaluar la qualitat microbiològica de l'aigua utilitzem microorganismes com indicadors, la presència dels quals representa una disrupció que afecta la qualitat de l'aigua, i/o microorganismes índex, la presència dels quals apunta la possible existència d'un organisme patogènic similar. Aquests microorganismes indicadors/índex es classifiquen en tres categories (Ashbolt et al., 2001):

Indicadors de processos: grup de microorganismes que s'utilitzen per avaluar l'eficàcia del procés. Per exemple: mesura de coliformes totals en la desinfecció per clor.

Indicadors fecals: grup de microorganismes que indiquen la presència de contaminació fecal Per tant, només infereixen que els agents patògens poden estar presents. Per exemple: presència de bacteris termotolerants o *E. coli.*

Microorganismes Índex o Model: espècies indicatives de la presència de patògens del seu grup. Per exemple: *E. coli* com a índex de la presència de *Salmonella* o els adenovirus humans com a índex de virus entèrics humans.

Un bon indicador o índex de contaminació fecal ha d'estar correlacionat amb la presència de patògens; i ha de tenir un perfil de supervivència similar al dels patògens. A més, ha de ser relativament econòmic, ràpid de detectar i senzill d'analitzar (Field and Samadpour, 2007). Els criteris per determinar indicadors de contaminació fecal engloben: que no siguin patògens, que estiguin presents universalment en femtes humanes en grans quantitats, que persisteixin en l'aigua i responguin als tractaments de manera similar al patogen i que no multipliqui en

	Microorganisme	Característiques
Bacteris	**Coliforms**	Gram-, anaeròbics facultatius, oxidasa -, fermentadors de lactosa a 37 °C, 24-48 h.
	Escherichia coli (E. coli):	Coliforms termòfils (44 °C) i indol +.
	Coliforms termotolerants	Coliforms que produeixen àcid i gas a partir de lactosa a 44 °C, 24h.
	Enterococs	Grup d'estreptococs fecals que creixen a pH 9.6 i 45 °C amb 6.5% de NaCl.
	Clostridis reductors de sulfit (CRS)	Gram +, formadors d'espora, que redueixen el sulfit a àcid sulfhídric.
	Bifidobacteria	Gram +, anaerobis obligats, catalasa – i fermentadors de lactosa
	Bacteroides	Gram -, anaeròbics estrictes
Bacteriòfags	**Colifags somàtics**	Infecten soques de *E. Coli* i altres enterobacteris a través de paret cel·lular
	Bacteriòfags F-específics d'ARN	Infecten soques *E. coli* via el pili sexual i són RNA de cadena simple
	Bacteriòfags de Bacteroides fragilis	Infecten soques Bacteroides i són doble cadena d'ADN.
Virus entèrics	**Adenovirus**	Virus de doble cadena d'ADN linear
	Poliomavirus	Virus de doble cadena d'ADN circular
	Enterovirus	Virus ARN de cadena simple i polaritat positiva

Taula 5. Microorganismes indicadors de la contaminació fecal de l'aigua

l'ambient (WHO, 2011a). Diferents tipus de microorganismes han estat estudiats com a indicadors de contaminació fecal; a la Taula 5 es mostren els més rellevants.

Durant més d'un segle, els indicadors fecals bacterians (IFB) han estat seleccionats com els indicadors més apropiats per controlar la qualitat microbiològica de l'aigua pel seu baix potencial patogènic i a la seva alta concentració en aigua residual. Els IFB més utilitzats mundialment incloent coliforms fecals, *Escherichia coli* i Enterococs (Griffith et al., 2009; Leclerc et al., 2001). Tot i així, diversos estudis han mostrat les limitacions d'aquests microorganismes bacterians com indicadors. Estudis diversos han mostrat la falta de correlació entre la presencia de molts patògens, com els virus, i els IFB (Harwood et al., 2005; Prieto, 2001). Aquesta falta de correlació s'atribueix en part a què els IFB són excretats per molts tipus d'animals (Leclerc et al., 2001) i a diferencies en els nivells d'estabilitat a l'ambient i a tractaments de desinfecció. Altres factors que donen suport a la utilitat d'altres indicadors complementaris són l' existència de soques bacterianes naturals no provinents de contaminació fecal en terres, sediments aquàtics i vegetació aquàtica (Badgley et al., 2011;

Byappanahalli et al., 2003; Solo-Gabriele et al., 2000) i la seva capacitat de multiplicar fora de l'hoste.

Considerant les limitacions dels actuals IFB, alguns grups de virus han estat proposats com indicadors alternatius o complementaris per millorar el control de la qualitat microbiològica de l'aigua i per reduir el risc associat. Els virus transmesos per aigua i aliments són en general específics d'hoste, no repliquen en l'ambient i són més estables a l'ambient i als processos de desinfecció que els IFB (Wong et al., 2012).

1.5.2. Virus com a indicadors de contaminació fecal i com eines de *Microbial Source Tracking*

Els virus entèrics causen en la seva majoria infeccions subclíniques, tot i que una petita proporció de la població desenvoluparà la malaltia presentant en alguns casos simptomatologia greu o severa, com en les hepatitis agudes o les gastroenteritis en infants (Carter, 2005). Alguns virus humans i animals, com els adenovirus i el poliomavirus causen majoritàriament infeccions asimptomàtiques i recurrentment tenen patrons d'excreció crònics (Adrian et al., 1988; Hatakeyama et al., 2006; Kitamura et al., 1990). Per la seva capacitat de multiplicar-se en el cos humà en absència de malaltia com infeccions persistents, han estat considerats part del microbioma humà (Columpsi et al., 2016) i per tant, potencials marcadors de contaminació fecal a l'ambient. Des de 1998, el nostre grup ha proposat utilitzar els adenovirus humans com indicadors de contaminació fecal humana, mitjançant tècniques moleculars (Pina et al., 1998b) i posteriorment també els poliomavirus humans (Bofill-Mas et al., 2000). Diversos estudis han mostrat l'alta prevalença d'adenovirus humans en aigües contaminades d'arreu del món (Albinana-Gimenez et al., 2009b; Bofill-Mas et al., 2006), convertint-los en índex de contaminació humana. A més, estudis comparatius de mètodes MST, han conclòs que els adenovirus humans són els més específics, per presentar el menor percentatge de falsos positius amb mostres no humanes (Griffith et al., 2003).

A inicis del segle XXI es comença a discutir sobre la necessitat de definir microorganismes indicadors de l'origen de la contaminació en aigües ambientals (Scott et al., 2002). Aquest conjunt de mètodes per determinar la font de contaminació correspont al denominat *"Microbial Source Tracking"* (MST). El principi del MST es basa en la forta associació de certs microorganismes fecals a animals hostes en particular i que certs atributs d'aquests microorganismes específics d'hoste poden ser utilitzats com a marcadors de contaminació d'aquest hoste en concret (Field and Samadpour, 2007). Els virus usats en MST per detectar contaminació fecal específica d'hoste estan resumits en la Taula 6.

Origen Contaminació	Indicador MST	Referències
Humà	Bacteriòfag RNA F-específic	(AWPRC, 1991; Kirs and Smith, 2007)
	Bacteriòfag de B. fragilis spp.	(Gómez-Doñate et al., 2016)
	Adenovirus (HAdV)	(Hernroth et al., 2002; Pina et al., 1998b)
	Polyomavirus (JCPyV, BKPyV)	(Bofill-Mas et al., 2000)
	Enterovirus (EVH)	(Fong et al., 2005)
	Tobamovirus (PMMoV)	(Kuroda et al., 2015; Rosario et al., 2009)
Boví	Bacteriòfag RNA F-específic	(Schaper et al., 2002)
	Adenovirus (BAdV)	(Maluquer de Motes et al., 2004)
	Polyomavirus (BPyV)	(Hundesa et al., 2010, 2006)
	Enterovirus (BEV-2)	(Ley et al., 2002)
Porcí	Adenovirus (PAdV)	(Maluquer de Motes et al., 2004)
	Circovirus (PCV2)	(Viancelli et al., 2012)
	Teschovirus (PTV)	(Jiménez-Clavero et al., 2003)
Oví	Polyomavirus (OPyV)	(Rusiñol et al., 2013)
Aviar	Parvovirus (Ch/TyPV)	(Carratalà et al., 2012)

Taula 6. Virus utilitzats com a traçadors de la contaminació fecal en aigües ambientals (Bofill-Mas et al., 2016)

Tot i que molts d'aquests virus proposats com a eines de MST no poden ser cultivats en mostres ambientals, mètodes de concentració i detecció basats en regions específiques del genoma han estat desenvolupats per detectar la presència de contaminació fecal humana o animal (Bofill-Mas et al., 2013). Estudis multicèntrics han utilitzat les eines de MST desenvolupades al nostre laboratori i han mostrat ser específics d'hoste, cost-efectius i aplicables a totes les àrees geogràfiques estudiades (Rusiñol et al., 2014).

1.5.3. Mètodes de concentració de virus en aigua

Els virus estan presents a l'ambient i la seva transmissió pot ocórrer a través de diverses matrius d'aigua contaminades; incloent-hi aigües de beguda, aigües superficials, aigües subterrànies i el mar. La seva presència en aquestes matrius és relativament baixa i heterogènia, fet que obliga a afegir passos de concentració previs a l'anàlisi de virus contaminants pel seu correcte control microbiològic. Tot i la seva baixa concentració en les matrius d'aigua, els virus entèrics tenen dosis d'infecció molt baixes (entre 10-1000 partícules) en comparació amb bacteris (10^3-10^5 unitats), així que els mètodes de control microbiològic han de ser prou sensibles per poder detectar el nombre mínim possible de partícules a l'aigua.

La majoria dels mètodes de concentració descrits es basen en l'absorció i elució en membranes o filtres per càrrega elèctrica (VIRADEL), alternativament s'utilitzen altres mètodes físics com la ultracentrifugació i la liofilització per petits volums, la ultrafiltració per grans volums o els protocols de precipitació de proteïnes com la floculació orgànica (Taula 7).

Mètode	Volum inicial	Volum final	Factor	Matrius	Recuperacions descrites	Referències
Ultracentrifugació	42 ml	100 µl	X 720	Res Sup	70% EV	(Pina et al., 1998b)
Ultrafiltració	100 L	300 µl	X 33.333	Sup Sub Beg	3-6% HAdV 13-33% JCPyV	(Albinana-Gimenez et al., 2009)
Liofilització	50 ml	500 µl	X 100	Sup	-	(Calgua et al., 2013)
Membrana Electropositives (NanoCeram®)	100 L	5 ml	X 20.000	Sub Beg	6% EV	(Hsu et al., 2007)
Llana de Vidre (electronegativa)	20 L	5 ml	X 4.000	Sup Sub Beg	8-28% HAdV 16-45% NoV	(Albinana-Gimenez et al., 2009; Francy et al., 2013)
Floculació orgànica amb llet descremada	10 L	5 ml	X 2.000	Sup Sub Beg	30-95% HAdV 55-90% JCPyV 45-90% NoV	(Calgua et al., 2008) (Calgua et al., 2013)

Taula 7. Mètodes de concentració de partícules víriques en aigua

Els mètodes VIRADEL (*VIRal ADsortion and ELution*) es basen en el fet que els virus tenen punts isoelèctrics baixos, al voltant de 3.5 (Michen and Graule, 2010). Això vol dir que en matrius de pH neutre, els virus tenen càrrega negativa i que per sota de pH 3.5 la carrega canvia i esdevé positiva. Per tant, canviant el pH de les matrius ambientals podem absorbir o eluir els virus a diferents substrats (membranes, filtres, matèria orgànica) per tal de concentrar-los. Teòricament si el substrat (filtre o membrana) és electropositiu, en passar una matriu d'aigua els virus quedaran absorbits; tot i així, s'ha observat que un alt percentatge de virus no queda retingut (Hsu et al., 2007). En canvi, si treballem amb substrats electronegatius, haurem de condicionar la mostra prèviament, acidificant-la, per tal de canviar la polaritat de les partícules virals a positiva. Aquestes membranes electronegatives, incrementen les recuperacions però redueixen la possibilitat de concentrar grans volums a causa del pas de condicionament previ. Posteriorment, els virus són separats de les membranes mitjançant una elució amb tampons alcalins amb extracte de carn o glicina que ajuden a facilitar la separació. Finalment d'aquesta elució obtenim un volum encara massa gran i molts protocols afegeixen un darrer pas de concentració per floculació orgànica i centrifugació (Katzenelson et al., 1976).

La Floculació amb llet descremada ha estat descrit com a mètode de concentració eficient, repetible i de baix cost (Calgua et al., 2008). Aquest procediment fa servir la llet descremada com a substrat orgànic per concentrar les partícules virals. La caseïna (proteïna de la llet) és soluble en pH superiors a 4.6, en solucions per sota d'aquest pH s'afavoreix la floculació de les seves partícules en suspensió. A més, com més concentració de sals aquesta floculació de la caseïna es veu incrementada (Demetriades et al., 1997). Per aquest principi, com els virus al ser proteïnes floculen conjuntament amb la caseïna de la llet. El protocol desenvolupat per Calgua et al 2008, consisteix a condicionar la matriu a un pH de 3,5, una conductivitat superior als 1200 mS i afegir llet descremada pre-floculada. Aquests flòculs es deixen en agitació 8 hores i posteriorment es deixen precipitar 8 hores més. Es retira el sobrenedant i el flòcul sedimentat se centrifuga per finalment, recuperar-lo amb un volum de 5-10 mL de tampó fosfat.

1.5.4. Mètodes de detecció i quantificació

Posterior a la concentració de la mostra a analitzar, s'han de realitzar assajos de detecció i quantificació de les partícules virals. L'estudi dels virus es pot fer per observació directa amb el microscopi electrònic de transmissió, "*transmision electron microscopi"* (TEM), per observació indirecta a través de l'efecte citopàtic, "*citopatic effect"* (CPE) utilitzant cultiu cel·lular, per tècniques d'immunofluorescència o per detecció i/o quantificació del genoma del virus mitjançant tècniques moleculars.

En primer lloc, la microscòpia electrònica ha mostrat una sensitivitat limitada, ja que requereix matrius molt netes i concentracions superiors a 10^8 partícules víriques/mL per poder visualitzar-les (Atmar and Estes, 2001). A més, el seu elevat cost i complexitat fan d'aquesta una tècnica limitada a estudis de caracterització d'estructura de virus cultivables.

Les tècniques de cultiu cel·lular tenen l'avantatge de poder mesurar quantitativament la presència de virus infecciosos, sent de gran importància en estudis d'estabilitat i desinfecció (Wyn-Jones et al., 2011). Entre els protocols més utilitzats trobem els assajos d'unitats formadores de clapa "*Plaque Forming Units"* (PFU) i els de dosi infecciosa en cultiu de teixits 50%, *"Tissue Culture Infectious Dose 50%"* ($TCID_{50}$), basats en observar el CPE produït en monocapes de cèl·lules pel virus analitzat. També podem visualitzar la infecció a través de la immunofluorescència, en el cas de què no produeixen un clar CPE, mitjançant tinció sobre les monocapes infectades amb anticossos marcats per fluorocroms, els anomenats assajos d'immunofluorescència, *"Immunofluorescence Assay"* (IFA). Existeixen diverses línies cel·lulars continues (immortalitzades) disponibles per ser infectades per virus entèrics com les 293, les (cèl·lules embrionàries de ronyó humà), les MA104 i Vero (cèl·lules epitelials de ronyó de mico verd africà), les Hep2G (cèl·lules epitelials de càncer de fetge humà) o les A549 (cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma pulmonar humà). Per tant, requereixen l'existència d'una línia cel·lular susceptible de ser infectada pel virus problema que volem analitzar (Hamza et al., 2011).

Actualment, els mètodes més ràpids, específics, sensibles i econòmics són les tècniques basades en protocols d'amplificació genòmica com és la reacció en cadena de la polimerasa, *"Polymerase Chain Reaction"* (PCR) que pot ser simple (PCR/RT-PCR) o niada (nPCR/nRT-PCR) a més de quantitativa (qPCR/qRT-PCR) (Girones et al., 2010). Aquestes reaccions moleculars requereixen una extracció d'àcids nucleics prèvia a l'amplificació dels genomes. Existeixen diversos kits comercials que permeten extreure els àcids nucleics de la mostra problema. Els més utilitzats es basen en columnes de sílice (QIAgen®) o en boles magnètiques (Biomeriuex®).

La PCR detecta genomes i no dóna dades sobre la infectivitat, per obtenir informació sobre la infectivitat es poden fer assajos combinats amb cultiu cel·lular poden aproximar la capacitat infectiva del virus estudiat. Són les anomenades tècniques integrades de PCR-cultiu cel·lular, "*Integrated Cell Culture-PCR*" (ICC-PCR) (Dong et al., 2010), que analitzen la presència de d'àcids nucleics vírics en els cultius infectats amb la mostra problema, incrementant la sensibilitat.

Els mètodes de PCR quantitativa són els més extensament utilitzats per a la quantificació de virus en mostres ambientals, ja que són molt específics gràcies al disseny de primers i sonda corresponents a regions conservades del virus diana i permet analitzar un gran nombre de mostres al mateix temps. Tot i així, té certes limitacions que sovint poden reduir la seva sensibilitat, com són la presència d'inhibidors en la matriu concentrada que pot fer reduir l'eficiència de la transcripció reversa i de l'amplificació de la polimerasa i la incapacitat de discernir sobre el resultat si els genomes detectats provenen de virus infecciosos o ja inactivats (Girones et al., 2010).

En els darrers anys s'han proposat algunes aproximacions que ajuden a estimar la capacitat infectiva dels virus detectats per PCR amplificant regions més grans del genoma o múltiples regions, fent aproximacions matemàtiques per avaluar la infectivitat (Pecson et al., 2011, 2009). Altres, utilitzen pre-tractaments de la mostra com un pas prèvi a l'extracció d'àcids nucleics, i així eliminar genomes lliures amb DNAses o RNAses i quantificar únicament per qPCR partícules víriques estructurades (de Abreu Correa et al., 2012).

1.6. Tractaments de desinfecció d'aigua de beguda

Proveir d'aigua segura i canalitzada als domicilis és un objectiu prioritari per incrementar l'estat de salut i nutricional de la població, a més de contribuir a assolir a escala global els objectius internacionals la reducció de pobresa (WHO, 2014b). Actualment sabem que les malalties de transmissió fecal-oral tenen múltiples vies d'entrada, no tan sols l'aigua de beguda, i que són interdependents, per això es necessiten aproximacions que integrin les diferents vies de transmissió per reduir l'impacte de les malalties entèriques (Eisenberg et al., 2012). Tot i així, eliminar els patògens de l'aigua és una mesura essencial pel control de les malalties infeccioses de transmissió hídrica. Els mecanismes de desinfecció de l'aigua més estesos i utilitzats estan basats en l'ús de temperatura, l'addició de productes químics, o l'aplicació de processos físics com la filtració o la radiació ultraviolada (Cheremisinoff, 2002).

1.6.1. Tractaments de desinfecció en els sistemes de proveïment

1.6.1.1. Cloració

La cloració és el mètode químic de desinfecció més utilitzat arreu del món donat el seu baix cost i accessibilitat. Existeixen diferents compostos clorats utilitzats en desinfecció d'aigua disponibles comercialment (Taula 8). Les sals d'àcid hipoclorós (HOCl) són les més conegudes, com l' hipoclorit de calci (sòlid) o sodi (líquid) components principals del lleixiu. El clor és un agent oxidant que desinfecta per efecte de l'àcid hipoclorós format en solució (HOCl). L'àcid hipoclorós és un àcid dèbil que es dissocia en anió hipoclorit (OCl-) i catió hidrogen (H+) depenent del pH en aigua, sent més estable en condicions de pH àcides on per tant esperarem una major efectivitat a pH menors de 8, on l'àcid hipoclorós predomina (Deborde and von Gunten, 2008). Una vegada en contacte amb l'aigua, el clor reaccionarà irreversiblement amb els compostos inorgànics com el magnesi, el ferro i l'àcid sulfhídric presents, millorant les qualitats organolèptiques de l'aigua, ja que els elimina, però perdent potencial desinfectant. També es combinarà amb la matèria orgànica i l'amoni formant el que anomenem *clor combinat* que tindrà encara un potencial desinfectant tot i que disminuït. A més a més, actualment sabem que el clor pot combinar-se amb la matèria orgànica formant trihalometans, subproductes tòxics i mutagènics que s'han de controlar post-tractament per no superar els nivells acceptables pel consum (Krasner et al., 2006). Finalment, després de les reaccions del clor amb altres molècules, l'àcid hipoclorós i l'hipoclorit restants seran l'anomenat *clor lliure disponible* romanent a l'aigua com a desinfectant residual que pot ser útil en cas de contaminacions posteriors.

Les mono-cloramines (NH_2Cl) i el diòxid de clor (ClO_2) o el dicloroisocianurat de sodi (NaDCC) són alternatives a les sals d'hipoclorit, utilitzats amb l'objectiu d'incrementar l'estabilitat del clor en solució i reduir la formació de clor combinat, ja que aquests compostos clorats reaccionen menys amb elements inorgànics. Les mono-cloramines tenen cert potencial desinfectant però molt menor al de les sals d'hipoclorit i el diòxid de clor, tot i ser millor desinfectant, és molt més car i forma compostos secundaris perillosos per la salut com el clorit (Clasen and Edmondson, 2006; Sobsey, 2002).

Producte	**Component clorat**	**Preparat**
WaterGuard®	NaOCl	Solució liquida
Drinkwell™	NaOCl	Solució liquida
PUR® *Purifier of Water*	CaOCl	Pols
Hydroclonazone®	NH_2Cl	Tableta
Aquatabs®	NADCC	Tableta
WaterMaker™ *Water Purification Techonology*	NADCC	Pols

Taula 8. Productes comercials de compostos clorats per la desinfecció d'aigua de beguda

Pel que fa al mecanisme d'acció del clor, sabem que el seu potencial oxidant no selectiu afecta diversos compostos subcel·lulars (Albrich and Hurst, 1982). S'ha mostrat que el HOCl té com a diana principal l'embolcall cel·lular, tot i que el seu potencial germicida s'atribueix a la capacitat de penetrar a través de les membranes cel·lulars pel seu baix pes molecular i la seva neutralitat elèctrica (Cheremisinoff, 2002). A l'interior cel·lular l'efecte del HOCl inhibeix el transport d'ATP, electrons i metabòlits (Barrette, 1989; Small et al., 2007). Pel que fa als virus no embolcallats el mecanisme d'acció del clor lliure pot ser degut a la interacció amb les proteïnes de la càpsida o els àcids nucleics (Li et al., 2002; Nuanualsuwan and Cliver, 2003), afectant la replicació i injecció del genoma en la cèl·lula hoste (Wigginton et al., 2012). La inactivació dels diferents patògens, per tant, dependrà de la quantitat de clor lliure disponible, del pH i temperatura i de la matèria orgànica i inorgànica present en l'aigua.

L'efectivitat del clor com a desinfectant s'acostuma a expressar en *C* x *t* (Ct), on *C* correspon a la concentració de desinfectant (mg/L) i *t* al temps de contacte requerit per assolir una inactivació concreta (min) sota unes condicions determinades de pH i temperatura. El valor de *Ct* ens permet doncs, comparar entre diferent patògens l'efecte del clor sobre diferents microorganismes.

A la literatura podem trobar estudis en condicions controlades que descriuen el seu potencial desinfectant, mostrant-se molt eficient sobre els bacteris entèrics (Maier et al., 2009) excepte

en bacteris encapsulats i micobacteris (Goel and Bouwer, 2004; Lee et al., 2010). Pel que fa als protozous, es consideren resistents al clor, ja que requereixen altes concentracions i temps perllongats per la seva inactivació (Jarroll et al., 1981; Korich et al., 1990). Els virus entèrics són, en general, més resistents que els bacteris al tractament per clor, necessitant més temps de contacte i/o concentracions de clor majors. Les dades de sensibilitat al clor de diferents microorganismes estan resumides a la Taula 9.

	Microorganisme	**LRV[a]**	**Ct**	**Matriu**	**Referència**
Bacteris	*Escherichia coli*	2	0.04	Aigua BDF[b], pH6, 5 °C	(Maier et al., 2009)
	Escherichia coli	7	0.5	Aigua BDF, pH 8.5, 4 °C	(Lee et al., 2010)
	Klebsiella pneumoniae	3	13.06	Aigua BDF, pH7.2, 22 °C	(Goel and Bouwer, 2004)
	Mycobacterium fortuitum	2	36	Aigua BDF, pH 8.5, 4 °C	(Lee et al., 2010)
Protozous	*Giardia lambia*	2	120	Aigua BDF, pH7, 5 °C	(Jarroll et al., 1981)
	Giardia muris	2	44.8	Tampó fosfat , pH7, 25 °C	(Leahy et al., 1987)
	Cryptosporidium parvum	1	78	Aigua BDF, pH 7	(Korich et al., 1990)
	Acantamoeba spp.	2	28	Tampó fosfat, 30 °C	(Dupuy et al., 2014)
Virus	Bacteriòfag MS2	3	0.05	Aigua BDF, pH 6, 5 °C	(Shin and Sobsey, 2008)
	Poliovirus 1	3	2.87	Aigua BDF, pH 6, 5 °C	(Thurston-Enriquez et al., 2003)
	Adenovirus type 40	3	0.11	Aigua BDF, pH 6, 5 °C	(Thurston-Enriquez et al., 2003)
	Adenovirus type 5	4	0.22	Tampó borat, pH 8.5, 5 °C	(Baxter et al., 2007)
	Adenovirus type 2	4	0.27	Aigua BDF, pH 8, 5 °C	(Cromeans et al., 2010)
	FCV (surrogate NoV)	4	0.32	Aigua BDF, pH 6, 5 °C	(Thurston-Enriquez et al., 2003)
	MuNoV (surrogate NoV)	4	0.08	Aigua BDF, pH 8, 5 °C	(Cromeans et al., 2010)
	Hepatitis E Virus	2	0.41	Aigua BDF, pH 8	(Girones et al., 2014)
	Hepatitis A Virus (MMB strain)	3	2.85	Tampó fosfat, pH 6	(Grabow et al., 1983)
	Rotavirus (WA strain)	4	5.55	Aigua BDF, pH7.2, 20 °C	(Xue et al., 2013)

a. Valor de Reducció Logarítmica *"Logarithm Reduction Value"* (LRV)
b. Aigua Lliure de Demanda de Clor *"Buffered Demand Free"* (BDF)

Taula 9. Eficiències de la desinfecció de microorganismes en aigua per cloració

1.6.1.2. Radiació ultraviolada

La radiació ultraviolada (UV) ha guanyat popularitat com a desinfectant d'aigua perquè a diferència dels tractaments químics no genera cap subproducte tòxic residual i és més efectiu inactivant protozous que amb els compostos halogenats com el clor (Clancy et al., 2000; Linden et al., 2002). A més, com els temps de contacte són molt curts i l'espai per d'instal·lació molt petits, la desinfecció per UV s'està estenent ràpidament per tot el món pel tractament d'aigua de beguda. Tot i així, presenta algunes limitacions com són el seu alt cost, els alts requeriments de manteniment i la manca d'un efecte desinfectant residual (USEPA and EPA, 1990).

La llum ultraviolada es pot classificar en tres grups segons la seva longitud d'ona: la UVA emet entre 315-290 nm, la UVB entre 280-315 nm i la UVC entre 100-280 nm. La radiació ultraviolada C al estar a prop dels 260 nm, on absorbeixen els àcids nucleics incloent les citocines, els uracils i les timines, produeix danys al genoma dels microorganismes principalment per la dimerització de timines o uracils (Rastogi et al., 2010). Pel que fa als virus altres factors addicionals que contribueixen a la inactivació han estat descrits com el dany sobre la càpsida proteica per radicals hidroxil produïts durant la fotocatàlisi (Mayer et al., 2015)

En la desinfecció amb radiació UV s'utilitzen diferents tipus de làmpades. Les làmpades de baixa pressió (LP) són quasi monocromàtiques a una longitud d'ona de 253.7nm, en canvi les làmpades de mitja pressió (MP) són policromàtiques i emeten amb més intensitat però tenen un rang més ampli de longitud d'ona on només el 15-20% correspon a la UVC (Oppenländer, 2007).

Un desavantatge de la desinfecció per radiació UV és l'existència de mecanismes de reparació de l'ADN per revertir el dany causat per la radiació UV i que permeten que microorganismes de genoma d'ADN inactivats es puguin reactivar (Harm, 1980). El mecanisme de reparació de major importància en la desinfecció UV és fotoreactivació, en la qual les cèl·lules utilitzen l'energia lluminosa (300-500 nm) i l'enzim fotoliasa per dividir els dímers de timina en l'ADN cel·lular. Altres mecanismes descrits en el cas dels virus de doble cadena d'ADN són la reparació dels dímers de timina mitjançant la maquinaria de la cèl·lula hoste (Turnell and Grand, 2012). Una vegada que s'han reparat els llocs danyats en l'ADN, el microorganisme a continuació, serà capaç de dur a terme la seva replicació. Això redueix l'eficàcia de la desinfecció UV i pot conduir a la proliferació de patògens en l'aigua tractada (Bitton, 2005). Per tal d'assegurar la desinfecció es plantegen dosis augmentades de radiació UV considerant

l'efecte de reparació o bé la combinació amb altres desinfectants químics (Yoon et al., 2007). Les unitats habituals en les quals es defineix la desinfecció per UV són la dosis de radiació UV que integra la intensitat de la radiació UV i el temps d'exposició expressada normalment en joules per metre quadrat (J/m2), els mili-joules per centímetre quadrat (mJ/cm2) o els micro-Watt-segon) per centímetre quadrat (mWs/cm2) (1J/m2 = 0.1mJ/cm2= 0.1mWs/cm2) (EPA, 2003). Les cinètiques de desinfecció observades són lineals quan es presenten en funció de la dosi aplicada, tot i que s'han observat efectes no recíprocs de dosis i inactivació en alguns bacteris estudiats, anomenats *tailing effect* principalment associats a agregacions dels microorganismes que impedeixen l'exposició homogènia a la radiació UV i als fenòmens de recombinació (Mattle and Kohn, 2012; Sommer et al., 1998). A més a més de l'agregació i altres factors que poden afectar la inactivació per radiació UV com la presència de sòlids en suspensió, la terbolesa i la mateixa absorció de la matriu aquosa (Oppenländer, 2007). La Taula 10 resumeix diferents estudis realitzats sobre la eficiència en la inactivació de microorganismes indicadors i patògens al tractament d'aigua per radiació UV. Els bacteris són altament susceptibles a la inactivació per UV (Oguma et al., 2002), juntament amb els protozous com la

	Microorganisme	**LRV[a]**	**Dosi (J/m2)**	**Matriu**	**Referència**
Bacteris	*Escherichia coli*	6	150	Aigua destil·lada	(Oguma et al., 2002)
	Campylobacter jejuni	5.3	60	Aigua destil·lada	(Butler et al., 1987)
	Yersinia enterocolitica	5	50	Aigua destil·lada	(Butler et al., 1987)
	Salmonella enteriditis	2.6	100	Aigua peptonada	(Koivunen and Heinonen-Tanski, 2005)
Protozous	*Giardia lambdia*	2.5	10	Aigua pH7.3	(Linden et al., 2002)
	Cryptosporidium parvum	3	30	Efluent secundari	(Clancy et al., 2000)
	Acantamoeba spp.	3	700	Ringer 1/40	(Sílvia Cervero-Aragó et al., 2014)
Virus	Human Adenovirus t 2	2	1400	Tampó fosfat pH 7	(Calgua et al., 2014)
	Human Adenovirus t 2	3	1190	Tampó fosfat	(Gerba et al., 2002)
	Human Adenovirus t 40	2	1030	Aigua subterrània	(Thurston-Enriquez et al., 2003)
	JC Polyomavirus	2	1400	Tampó fosfat pH 7	(Calgua et al., 2014)
	Poliovirus 1	3	230	Tampó fosfat	(Gerba et al., 2002)
	MS2	2	400	Tampó fosfat pH 7	(Calgua et al., 2014)
	MS2	3	650	Aigua d'aixeta	(De Roda Husman et al., 2004)
	HAV	3	200	Tampó fosfat	(Battigelli et al., 1993)
	Rotavirus SA-11	4	360	Tampó fosfat	(Li et al., 2009)
	Murine Norovirus	4	600	Tampó fosfat	(Rönnqvist et al., 2013)
	Feline Calcivirus	3	120	Aigua d'aixeta	(De Roda Husman et al., 2004)

a. Valor de Reducció Logarítmica *"Logarithm Reduction Value"* (LRV)

Taula 10. Eficiències de la desinfecció en aigua de microorganimes per radiació ultravioleta

Giardia i el *Cryptosporidium*, fet que va incrementar l'interès per aquest mètode desinfectant en comparació amb el clor (Clancy et al., 2000; Linden et al., 2002). Per altra banda els virus són més resistents a la radiació UV especialment els virus de doble cadena d'ADN, que a través dels mecanismes de reparació de la cèl·lula hoste són capaços de reparar danys causats al seu genoma (Shin et al., 2009).

En línies generals podem dir que per una inactivació d'entre 3 i 4 logaritmes seria suficient una dosis de 400 J/m2 de radiació UV de longitud d'ona 253.7nm per patògens virals importants com el Virus de l'Hepatitis A, Rotavirus, Poliovirus i els Calcivirus, tot i que no ho seria per l'Adenovirus humà.

Algunes regulacions i guies pel tractament d'aigua de beguda amb radiació UV fan servir de referència els adenovirus per ser el patogen més resistent i marquen dosis de 1860 J/m2 per la inactivació de 4 logaritmes (USEPA and EPA, 2006). Altres marquen els 400 J/m2 per inactivar a la major part dels microorganismes (DVGW, 2006; ÖNORM, 2001).

1.6.2. Tractaments d'aigua a nivell domiciliar

Els tractaments d'aigua a nivell domiciliar, "*Household Water Treatments and Safe Storage*" (HWTS) o altrament dits, tractaments d'aigua al punt d'ús, "*Point-of-Use water treatments*" (POU) com bullir, filtrar o clorar aigua a casa, han mostrat ser efectius en millorar la qualitat microbiològica de l'aigua de beguda (Sobsey, 2002). En regions on el sistema de proveïment d'aigua potable no és segur en contextos urbans i rurals, els HWTS són una alternativa per accedir a aigua més segura microbiològicament (WHO, 2007). Tractar l'aigua a nivell domiciliar minimitza el risc de recontaminació que s'observa després d'agafar aigua de fonts protegides (Wright et al., 2004). A més, sabem que l'ús de diferents tecnologies HWTS té un efecte protector contra la diarrea (Mohamed et al., 2015) i per això han estat promogudes per l'OMS i UNICEF en les darreres dues dècades.

Conjuntament amb el creixent interès cap als HWTS van aparèixer desenes de diferents tecnologies al mercat. A l'any 2002 l'OMS va encarregar un informe per avaluar quines eren les millors candidates basant-se en les característiques tècniques i d'ús, incloent-hi l'efectivitat microbiològica, l'impacte en salut, la dificultat tècnica, l'accessibilitat, el cost, l'acceptabilitat, la sostenibilitat i el potencial per implementar-les (Sobsey, 2002). El resultat de l'estudi va revelar que cinc entre trenta-set tecnologies avaluades eren les més prometedores: Filtres d'aigua ceràmics, cloració en recipients tancats i amb aixeta, desinfecció amb llum solar, desinfecció tèrmica en cuines solars i la combinació de sistemes de floculació i cloració.

Des d'aleshores diversos estudis han avaluat l' eficiència microbiològica d'aquests tractaments davant de bacteris, virus i protozous. En la Figura 9 es representen els valors màxims de reducció descrits en els microorganismes estudiats de les diferents taules resum pels tractaments per cloració (Taula 9), radiació UV (Taula10), Filtres d'Aigua Ceràmics (Taula 12) i Sobres de Floculació Cloració (Taula 13). A més, s'hi han representat els LRV del tractament tèrmic (Cervero-Aragó et al., 2014; Sauerbrei and Wutzler, 2009; Spinks et al., 2006), desinfecció solar (Boyle et al., 2008; Heaselgrave and Kilvington, 2011; Polo et al., 2015) i Filtres de sorra (Elliott et al., 2008; Palmateer et al., 1999).

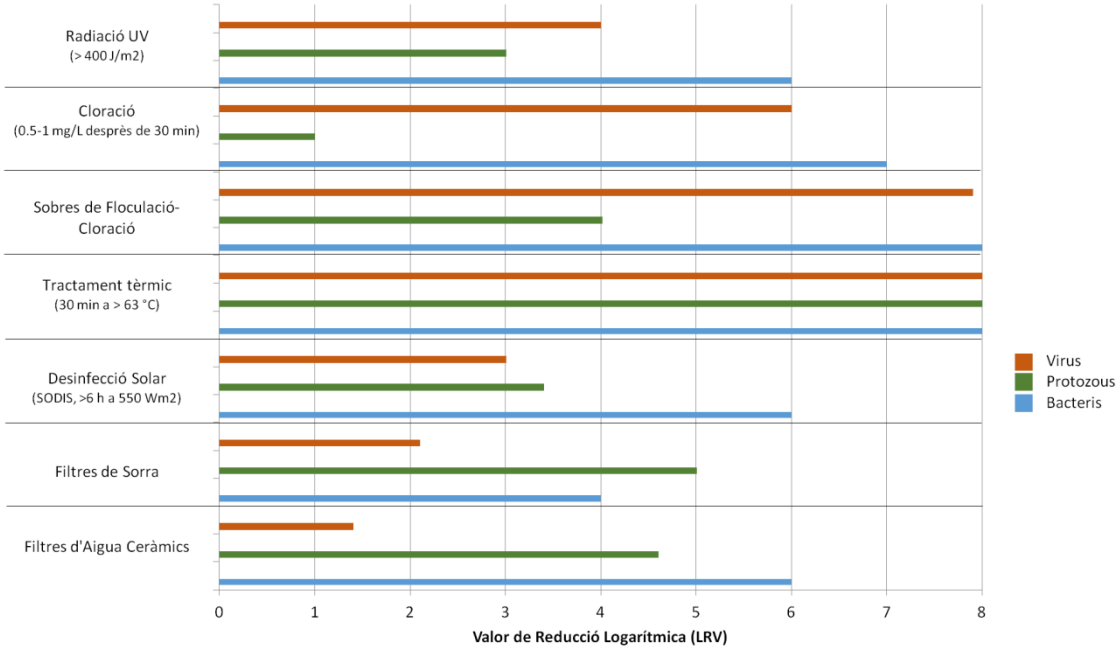


Figura 9. Reduccions logarítmiques de microorganismes segons tractament

Per poder establir unes mesures i requeriments de qualitat, l'OMS va redactar una guia que estableix tres categories de HWTS segons la seva capacitat de reduir la càrrega microbiològica i els riscos derivats de l'exposició a agents patògens en l'aigua de beguda (Taula 11) (WHO, 2011b).

	Patògens de referència pels models dosi-resposta	**Concentració microorganismes per litre assumida pels càlculs de risc**	**LRV requerides**		
			Interina	**Protectora**	**Altament Protectora**
Bacteris	*Campylobacter jejuni*	1	Ha de complir el nivell de protectora per dos tipus de micro-organismes	**≥2**	**≥4**
Protozous	*Cryptosporidium*	0,1		**≥2**	**≥4**
Virus	Rotavirus	1		**≥3**	**≥5**

Taula 11. Classificació de nivells de protecció dels HWTS segons LRV per patogen (WHO, 2011b)

1.6.2.1. Filtres d'Aigua Ceràmics

Els Filtres d'Aigua Ceràmics han estat promoguts per agències internacionals en els darrers anys i han guanyat popularitat com a HWTS gràcies a múltiples factors: la seva eficiència intrínseca de reduir la càrrega microbiològica de l'aigua; es poden produir localment incrementant la seva sostenibilitat ambiental i econòmica; i són àmpliament acceptats culturalment. En l'actualitat, el model més extensament distribuït de la producció local dels Filtres d'Aigua Ceràmics es basa en un disseny desenvolupat el 1981 pel Dr. Mazariegos de l'institut d'investigació industrial de Guatemala ICAITI (*Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial*) i recentment actualitzat pel Grup de Treball de Fabricació Ceràmica (The Ceramics Manufacturing Working Group, 2011). Des de 1998 l'ONG "*Potters for Peace*" ha treballat per formar comunitats i organitzacions de tot el món a fabricar i distribuir els seus filtres localment per preus entre 5-15 US dollars. Actualment hi ha al voltant de 40 fabriques en funcionament arreu del món (Potters for Peace, 2016). El filtre sembla un simple test de ceràmica. Aquests testos estan suspesos en contenidors que poden ser de ceràmica o plàstic d'una capacitat de 50 litres. L'aigua s'introdueix al test i s'escola per gravetat a través del filtre, s'acumula al contenidor on es pot accedir a l'aigua tractada a través d'una petita aixeta (Figura 10).

Els filtres estan fets amb mà d'obra i materials locals, típicament argila, aigua i un material orgànic com serradures, farina, closques d'arròs o gra de cafè triturats. L'argila ha de provenir d'una font d'extracció consistent per una producció estandarditzada, ha de tenir una composició adequada que li atorgui plasticitat i que tingui una temperatura de sinterització al voltant dels 900 °C. L'argila una vegada obtinguda, s'ha d'assecar i tamisar per obtenir pols d'entre 0.6 i 0.7 mm. El material orgànic s'ha de triturar i tamisar per obtenir trossos entre 0.25 i 0.6 mm. Aquests dos compostos s'hauran de barrejar en sec a una proporció de pes 1:3 de matèria orgànica : argila. Obtinguda la barreja s'afegirà aigua fins a aconseguir la textura optima per emmotllar el test i deixar assecar abans de coure. Una vegada el test està ben sec, entrarà al forn de cocció que farà una combustió lenta

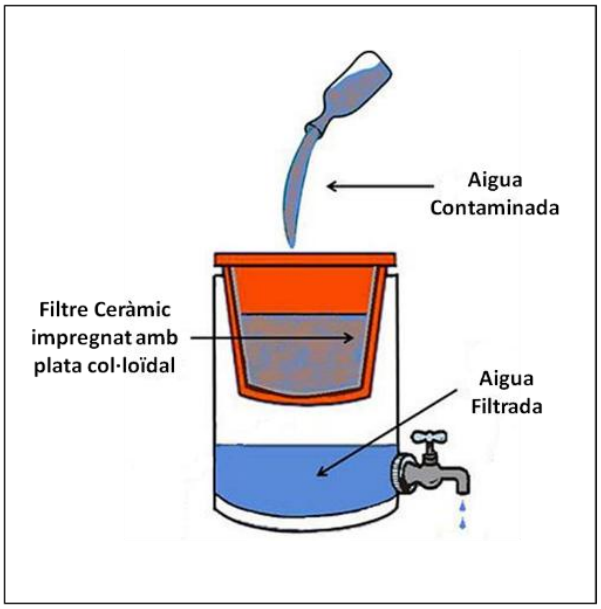


Figura 10. Esquema Filtres d'Aigua Ceràmics

(≈8h) fins a arribar als 990 °C en atmosfera oxidant on tota la matèria orgànica haurà estat cremada i l'argila sinteritzada. Sortint del forn es realitza un test de flux que seleccionarà els filtres aptes si filtren 1-2 L/h. Finalment, els filtres són impregnats amb 300 mL d'una solució de plata col·loïdal (concentració d'1 g/L) que presenta activitat bactericida de la plata i impedeix el creixement de biofilm a la paret del filtre (Figura 11) (The Ceramics Manufacturing Working Group, 2011).

Figura 11. Materials i producció dels Filtres d'Aigua Ceràmics

Els mecanismes de desinfecció descrits d'aquesta tecnologia consisteixen en la combinació de l'exclusió per mida i adsorció a la paret del filtre i el temps de contacte amb la plata col·loïdal. La porositat absoluta avaluada dels filtres és al voltant del 40%, la mida mitjana de por de 8.18 µm (0.02-490 µm) i la velocitat de transport de 0.05 cm/min (Oyanedel-Craver and Smith, 2008). Considerant la mida dels porus podem assumir que gran part dels protozous i bacteris quedaran retinguts al filtre i per tant, l'efecte d'exclusió/adsorció per separat al de la plata té una eficàcia desinfectant significant descrita al voltant de 2 logaritmes (van Halem, 2006). La plata col·loïdal, tot i no estar definit ben bé el seu mecanisme, aplicada a la superfície porosa del filtre s'ha associat a una major reducció de càrrega bacteriana de fins a 7 logaritmes (Bloem et al., 2009; van Halem, 2006), però no s'ha observat cap efecte sobre la reducció dels virus assajats (Brown and Sobsey, 2010). El resum dels estudis que han avaluat l'eficiència desinfectant de microorganismes mitjançant els Filtres d'Aigua Ceràmics està presentat en la Taula 12.

L'eliminació de virus pels Filtres d'Aigua Ceràmics ha estat avaluada principalment amb bacteriòfags com l'MS2. Van Halem va trobar reduccions per MS2 de 0.6-0.9 logaritmes

després de 5 setmanes, el que va augmentar a 1.1 a 1.8 després de 13 setmanes amb plata impregnada als filtres (van Halem, 2006). Les proves amb aigua desionitzada van mostrar una baixa reducció de 0.21 i 0.45 d'MS2 (Salsali et al., 2011). Altres (Brown and Sobsey, 2010) utilitzant l'aigua de pluja i l'aigua de superfície van trobar una reducció de 1.4 i 1.3 logaritmes per MS2 respectivament. En un estudi utilitzant microesferes de mida de virus de 0.02 i 0.1 mm el LRV va ser molt variable que oscil·la entre 0.43 i 2.4 (Bielefeldt et al., 2010). Així doncs, l'eficiència en l'eliminació de virus de l'actual model de Filtres d'Aigua Ceràmics és inferior als 3 logaritmes que les guies de l'OMS estableixen per designar-lo un tractament protector (WHO, 2011b).

	Microorganisme	**LRV[a]**	**Matriu**	**Estat del filtre**	**Referència**
	E. Coli CN13	2.2	Aigua de pluja	Després >600 L filtrats	(Brown and Sobsey, 2010)
	E. Coli CN13	2.3	Aigua de superfície	Després >600 L filtrats	(Brown and Sobsey, 2010)
Bacteris	*E. Coli* K12	6.55	Aigua de canal	Després 12 set. d'ús	(van Halem, 2006)
	E. Coli K12	4.5	Aigua de l'aixeta	Nou	(Bielefeldt et al., 2009)
	E. Coli K12- WR1	1.2	Aigua de canal	Després >300 L filtrats	(van der Laan et al., 2014)
	Clostridium oocyst	4.3	Aigua de canal	Després 12 set. d'ús	(van Halem, 2006)
Protozous	*Cryptosporidium parvum*	4.6	Aigua filtrada	Nou	(Lantagne, 2001)
	Giardia Lambia cysts	4.3	Aigua filtrada	Nou	(Lantagne, 2001)
	MS2	1.24	Aigua de canal	Després 13 set. d'ús	(van Halem, 2006)
	MS2	0.29	Aigua desionitzada	Nou	(Salsali et al., 2011)
Virus	MS2	1.4	Aigua de pluja	Després >600 L filtrats	(Brown and Sobsey, 2010)
	MS2	1.3	Aigua de superfície	Després >600 L filtrats	(Brown and Sobsey, 2010)
	MS2	0.6	Aigua de canal	Després >300 L filtrats	(van der Laan et al., 2014)

a. Valor de Reducció Logarítmica *"Logarithm Reduction Value"* (LRV)

Taula 12. Eficiències de la desinfecció en aigua de microorganismes per Filtres d'Aigua Ceràmics

Pel que fa a la qüestió de la retenció viral en les estructures de fang, a la literatura trobem diferents aproximacions per millorar l'eliminació de virus. Hi ha diversos estudis que mostren com els virus en suspensió s'uneixen a partícules i superfícies carregades positivament, especialment els òxids metàl·lics i altres materials carregats positivament presents en el medi ambient, com ara argiles que són riques en òxid de ferro (Gerba, 1984; Landry et al., 1979; Loveland et al., 1996; Zhuang and Jin, 2003).

Brown i Sobsey (Brown and Sobsey, 2009) van descriure com els òxids metàl·lics com ara el α-FeO (goethita), Fe_3O_4 (magnetita), Fe_2O_3 (hematites) i Al_2O_3 (alúmina) , elements presents a l'argila, a altes concentracions podien capturar eficaçment a bacteriòfags en solució (fins a 8

logaritmes), tot i que no van provar aquestes composicions d'argila en filtres cuits. Altres han mostrat que amb l'addició d'òxid de magnesi als filtres ceràmics (MgO) s'incrementa l'eliminació viral, malgrat que el rendiment esdevé molt variable a mesura que passa el temps d'ús, i per tant no compleix amb els requisits establerts per tractament segur d'aigua de beguda (Michen et al., 2013).

Altres factors relacionats amb les interaccions hidrofòbiques, el medi ambient i la química de superfície també podrien ser importants en l'adsorció de virus i la seva inactivació. S'ha descrit que la cocció ceràmica en atmosfera reductora té un efecte sobre la càrrega superficial de la peça i per tant pot tenir un efecte sobre la retenció viral (Wegmann et al., 2008). El canvi del punt isoelèctric (IEP) a càrrega positiva fa que aquest material pugui ser utilitzat en forma de filtre d'adsorció de virus tenint en compte que els virus entèrics tenen una càrrega superficial neta negativa (Michen and Graule, 2010).

Aquest tema ha estat un objectiu de la tesi: avaluar l'aplicabilitat i eficiència en l'eliminació de virus amb filtres ceràmics d'alta composició amb òxids minerals o cuits en atmosfera reductora que siguin fàcils d'implementar en àrees de limitat accés a fonts d'aigua potable.

1.6.2.2. Sobres de floculació-cloració

Els sobres de floculació-cloració, "*Flocculation-Chlorination Sachets*" (FCS) són preparacions comercials que combinen agents floculant i sals de clor. Aquest tractament combinat ha estat promogut per superar les limitacions del clor davant d'aigües tèrboles, que molt sovint són l'única font d'aigua disponible després de desastres naturals i inundacions (WHO, 2003). Els FCS serveixen per tractar entre 5 i 20 litres d'aigua i incorporen passos com la floculació, sedimentació i cloració, habituals en les plantes de tractament d'aigua potable (Figura 12).

El Centre de Desenvolupament i Enginyeria de l'armada americana (U.S. Army Natick Research) l'any 1987 va desenvolupar un producte que permetés purificar l'aigua d'alta terbolesa. El resultat van ser unes pastilles anomenades Chlor-Floc produïdes per *Control Chemical Company*, combinaven NaDCC (compost clorat) amb propietats floculants (propietat comercial) que ajudaven a aclarir l'aigua (Powers et al., 1994). El 2008 va ser formulat en sobres sota el nom de WaterMaker™ *Water Purification Techonology* i validat per UNICEF per la seva utilització en ajuda humanitària (UNICEF, 2008).

D'altra banda, *Proctor & Gamble Company* en col·laboració amb *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) van desenvolupar i avaluar el preparat amb el nom de PUR® *Purifier of Water* que es van popularitzar després de la seva promoció durant la intervenció d'ajuda humanitària a Haití per les inundacions post huracà Jeanne del 2004 (Colindres et al., 2007). El producte és una petita bosseta que conté sulfat ferrós en pols (floculant) i CaOCl (compost clorat).

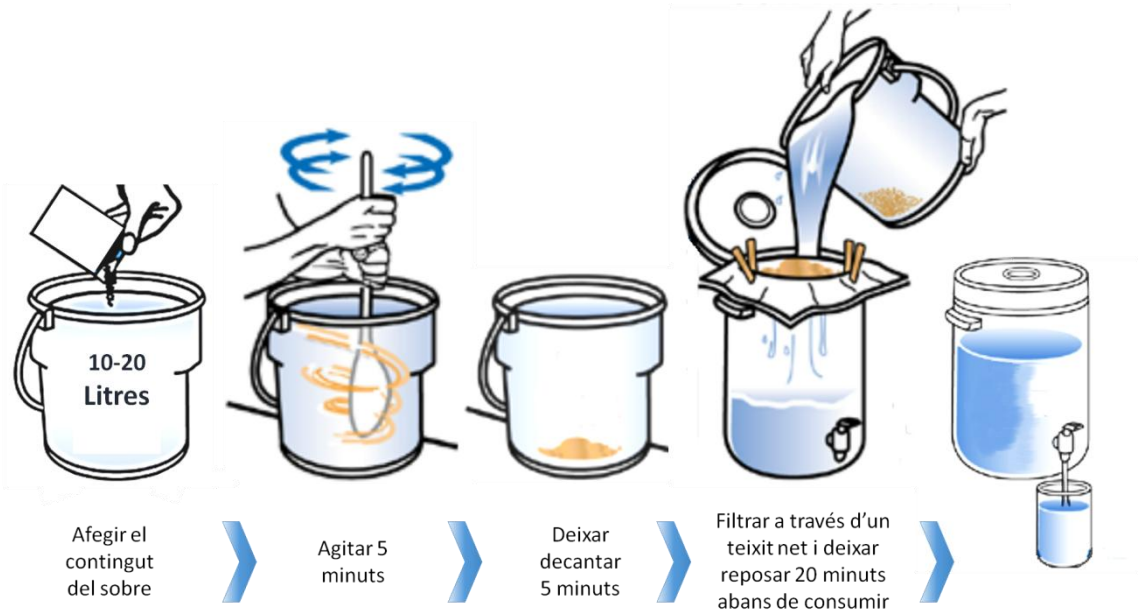


Figura 12. Procediment d'ús de les preparacions comercials de Floculació-Cloració

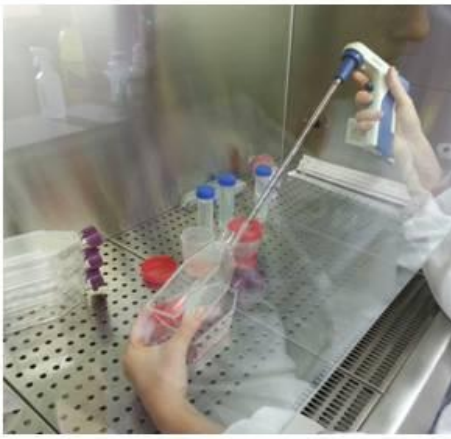
L'eficiència de desinfecció al laboratori ha estat estudiada per diferents autors i les dades descrites es resumeixen en la Taula 13. Alts nivells de desinfecció són reportats per bacteris i virus, sent més limitada la seva capacitat d'eliminar protozous a causa de la baixa eficiència del clor per aquest grup de microorganismes (Souter et al., 2003).

	Microorganisme	LRV	Matriu	Preparació Comercial	Referència
Bacteris	*Vibrio cholerae*	8	Aigua superficial	PUR	(Souter et al., 2003)
	Vibrio cholerae	7.5	Aigua dura	Chlor-Floc	(Rodda et al., 1993)
	Salmonella typhi	8	Aigua superficial	PUR	(Souter et al., 2003)
	Salmonella typhi	8	Aigua dura	Chlor-Floc	(Rodda et al., 1993)
	Escherichia coli	5.5	1:10 aigua residual: pou	PUR	(McLennan et al., 2009)
	Escherichia coli E25	7	Aigua dura	Chlor-Floc	(Kfir et al., 1989)
	Enterococcus	4.5	1:10 aigua residual: pou	PUR	(McLennan et al., 2009)
	Clostridium	2.5	1:10 aigua residual: pou	PUR	(McLennan et al., 2009)
	Escherichia coli	5.5	1:10 aigua residual: pou	PUR	(McLennan et al., 2009)
Protozous	*Cyrptosporidium parvum*	4.01	Aigua superficial	PUR	(Souter et al., 2003)
	Giardia lambia	3.55	Aigua superficial	PUR	(Souter et al., 2003)
	Giardia muris	3	Aigua crua	Chlor-Floc	(Hamilton and Jackson, 1990)
Virus	Poliovirus	6.8	Aigua superficial	PUR	(Souter et al., 2003)
	Poliovirus	2.5	Aigua superficial	Chlor-Floc	(Powers et al., 1994)
	Poliovirus	5	Aigua dura	Chlor-Floc	(Kfir et al., 1989)
	Rotavirus	7.9	Aigua superficial	PUR	(Souter et al., 2003)
	Rotavirus	4	Aigua superficial	Chlor-Floc	(Powers et al., 1994)
	Rotavirus	6.5	Aigua dura	Chlor-Floc	(Rodda et al., 1993)
	Coliphage V1	5	Aigua dura	Chlor-Floc	(Kfir et al., 1989)
	Somatic coliphages	1	1:10 aigua residual: pou	PUR	(McLennan et al., 2009)

a. Valor de Reducció Logarítmica *"Logarithm Reduction Value"* (LRV)

Taula 13. Eficiències de la desinfecció en aigua de microorganismes per sobres de floculació-cloració

Estudis cas-control en poblacions de zones rurals han mostrat una reducció en la incidència de diarrea dels usuaris dels FCS respecte als usuaris control del 40% a Guatemala (Chiller et al., 2006) i del 25% en un altre estudi a Kènia (Crump et al., 2005).



Objectius

2. Objectius

L'objectiu general plantejat en aquesta tesi és contribuir a millorar el control de la qualitat de l'aigua de beguda per reduir el risc de malalties infeccioses especialment en els contexts d'ajuda humanitària. La primera part consta de l'avaluació de la contaminació fecal en aigües utilitzades com a fonts d'aigua potable en contexts d'ajuda humanitària: a l'àrea metropolitana de Port-au Prince, Haití, després del terratrèmol 2010 i en els camps de refugiats de Maban, Sudan del Sud, durant l'epidèmia causada pel VHE l'any 2013. En segon lloc el desenvolupament de nous filtres d'aigua ceràmics per la reducció de virus contaminants. I finalment, l'estudi sobre la reducció del Virus de l'Hepatitis E davant processos de desinfecció.

Els objectius específics són:

1. Avaluar la presència de virus entèrics en aigües superficials i fonts d'aigua de beguda en zones afectades per emergència humanitària en context urbà (Port-au-Prince, Haití, post-terratrèmol, 2010) i en context rural (Camps de refugiats del Sudan del Sud, 2013).

2. Dissenyar i desenvolupar nous prototips de filtres d'aigua ceràmics més eficients en l'eliminació de virus entèrics de l'aigua de beguda, respectant la sostenibilitat de la producció en àrees sense accés a fonts d'aigua potable.

3. Desenvolupar sistemes de cultiu del Virus de l'Hepatitis E utilitzant tècniques d'infecció en cultiu cel·lular i tècniques de transfecció.

4. Estudiar l'efectivitat del tractament de desinfecció per radiació UV en la inactivació del Virus de l'Hepatitis E en aigua.

5. Estudiar l'efectivitat de les preparacions de Floculació - Cloració en la reducció de virus d'ARN en aigua.

Publicacions

3. Publicacions

3.1. Llistat de publicacions

La present tesi està constituïda per les publicacions detallades a continuació:

- **Guerrero-Latorre L, Rusiñol M, Hundesa A, Garcia-Valles M, Martinez S, Joseph O, Bofill-Mas S, Girones R.** Development of improved low-cost ceramic water filters for viral removal in the Haitian context. Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development 2015 Març; 5(1):28-38. doi: 10.2166/washdev.2014.121

- **Guerrero-Latorre L, Hundesa A, Girones R.** Transmission sources of waterborne viruses in South Sudan refugee camps. CLEAN – Soil, Air, Water. Publicat *online* 2016 Març. doi: 10.1002/clen.201500358.

- **Guerrero-Latorre L, Gonzales-Gustavson E, Hundesa A, Sommer R, Girones R**. UV disinfection and flocculation-chlorination sachets to reduce hepatitis E virus in drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* Publicat *online* 2016 Abril. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.04.002

3.2. Informe de coautoria

- **Guerrero-Latorre L, Rusiñol M, Hundesa M, Garcia-Valles M, Martinez S, Joseph O, Bofill-Mas S, Girones R.** Development of improved low-cost ceramic water filters for viral removal in the Haitian context. Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development 2015 Mar; 5(1):28-38. doi: 10.2166/washdev.2014.121

  L'estudi és el resultat de dos projectes de cooperació en col·laboració d'Intermon Oxfam. El primer projecte va ser part de la resposta d'ajut humanitari post terratrèmol 2010 i un altre de cooperació interuniversitari entre la Universitat de Barcelona i la Universitat de Quisqueya, Haití. En ambdós la doctoranda va participar activament en el disseny experimental, desenvolupament de prototips i la realització dels mostrejos a terreny i anàlisis de laboratori juntament amb els altres coautors. Addicionalment la doctoranda ha escrit el manuscrit sota la supervisió de la seva directora de tesis.

- **Guerrero-Latorre L, Hundesa A, Girones R.** Transmission sources of waterborne viruses in South Sudan refugee camps. CLEAN – Soil, Air, Water. Publicat *online* 2016 Març. doi: 10.1002/clen.201500358.

  L'estudi és part del projecte WADHE (*Water Disinfection Protocols for Hepatitis E Virus)* en el que la doctoranda va participar activament del disseny experimental, mostreig a terreny i anàlisis de laboratori juntament amb els coautors. Aquest treball es va realitzar en col·laboració de Metges Sense Fronteres-Holanda a l'abril del 2013 durant una epidèmia causada pel VHE als camps fronterers de Sud Sudan amb Sudan. La doctoranda va realitzar el mostreig i organitzar el transport de mostres als laboratoris de Barcelona per la seva anàlisis. Finalment la doctoranda ha escrit el manuscrit sota la supervisió de la seva directora de tesis.

- **<u>Guerrero-Latorre L</u>, Gonzales-Gustavson E, Hundesa A, Sommer R, Girones R.** UV disinfection and flocculation-chlorination sachets to reduce hepatitis E virus in drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* Publicat *online* 2016 Abril.

  L'estudi és part del projecte WADHE (*Water Disinfection Protocols for Hepatitis E Virus)* en el que la doctoranda va participar activament del disseny experimental i anàlisis de laboratori juntament amb els coautors. Els estudis de desinfecció amb radiació UV part d'aquest treball es va realitzar en col·laboració del Institut d'Higiene i Immunologia aplicada de Viena dirigit per la Dra. Regina Sommer. La doctoranda va realitzar els treballs de cultiu i infectivitat per la descripció de l'estabilitat del VHE després del tractament per radiació UV i sobres floculació-cloració. Finalment la doctoranda ha elaborat el manuscrit sota la supervisió de la seva directora de tesis.

Signat,

Dra. Rosina Girones Llop
Barcelona, Abril 2016

3.3. Informe sobre el Factor d'Impacte

Els treballs que formen part de la present tesis, han estat publicats o sotmesos en revistes científiques de la línia de recerca rellevants per a la línia d'investigació en la qual la doctoranda ha participat al llarg de la seva tesis.

L'article "**Development of improved low-cost ceramic water filters for viral removal in the Haitian context**" s'ha publicat a la revista *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development* l'any 2015. L'índex d'impacte d'aquesta revista al 2014 era de **0.54** (Q3 water science and technology).
L'article "**Transmission sources of waterborne viruses in South Sudan refugee camps**" ha estat publicat a a revista *CLEAN – Soil, Air, Water* l'any 2016. L'índex d'impacte d'aquesta revista al 2014 era de **2.00** (Q1 water science and technology).
L'article " **Disinfection strategies for drinking water in Hepatitis E Virus risk and endemic areas**" ha estat publicat a la revista *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (l'índex d'impacte al 2014 va ser de **3.75**, (Q1 Public Health, Environmental and Occupational Health).

Signat,

Dra. Rosina Girones Llop
Barcelona, Abril 2016

Articles

4. Articles

4.1. Article 1: Desenvolupament de Filtres d'Aigua Ceràmics per l'eliminació de virus en el context Haitià

Resum

Els Filtres d'Aigua Ceràmics s'utilitzen per tot el món com a tractament d'aigua a nivell domiciliar per millorar la qualitat de l'aigua. Són una tecnologia sostenible i estan segons les recomanacions de l'OMS compleixen amb els rendiments desinfectants per bacteris i protozous, però les eficiències d'eliminació virals descrites fins ara són insuficients per reduir significativament el risc associat d'infecció viral.

Amb l'objectiu de millorar els rendiments d'eliminació virals de filtres d'aigua de ceràmica en aquest estudi s'han desenvolupat i avaluat nous prototips amb diferents composicions d'òxids i atmosferes de cocció. L'eficiència dels prototips va ser avaluada per adenovirus humans, el bacteriòfag MS2 i l'*Escherichia coli*.

Un nou model cuit en atmosfera reductora va presentar una reducció de virus i bacteris superiors a 3 i 2 logaritmes respectivament, complint així, amb els llindars protectors recomanats per l'OMS. La caracterització de la ceràmica d'aquests prototips seleccionats, cuits en atmosfera reductora, va mostrar que tenien una major superfície específica respecte a la dels filtres control i una major fracció positiva de Z potencial, diferencies que expliquen augment en l'eliminació de virus.

28 © IWA Publishing 2015 Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development | 05.1 | 2015

Development of improved low-cost ceramic water filters for viral removal in the Haitian context

L. Guerrero-Latorre, M. Rusiñol, A. Hundesa, M. Garcia-Valles, S. Martinez, O. Joseph, S. Bofill-Mas and R. Girones

ABSTRACT

Household-based water treatment (HWT) is increasingly being promoted to improve water quality and, therefore, health status in low-income countries. Ceramic water filters (CWFs) are used in many regions as sustainable HWT and have been proven to meet World Health Organization (WHO) microbiological performance targets for bacterial removal (2–4 log); however, the described viral removal efficiencies are insufficient to significantly reduce the associated risk of viral infection. With the objective of improving the viral removal efficiencies of ceramic water filters, new prototypes with different oxide compositions and firing atmospheres have been developed and evaluated. For removal efficiencies human adenoviruses, MS2 bacteriophage and *Escherichia coli* were quantified in all prototypes. A new model of CWF that was fired in a reductive atmosphere presented virus and bacteria removal efficiencies greater than 3.0 log and 2.5 log, respectively, which would fulfill the viral targets that are recommended by the WHO. Ceramic characterization of the selected filters, which were fired in a reductive atmosphere, showed that a larger specific surface area than those of control filters and higher fraction of a positive Z-potential fraction are the most likely explanations for this increase in virus removal.

Key words | ceramic fired in reductive atmosphere, ceramic water filters, household water treatment and safe storage, viral removal efficiencies, waterborne viruses

L. Guerrero-Latorre
M. Rusiñol
A. Hundesa
S. Bofill-Mas
R. Girones (corresponding author)
Laboratory of Virus Contaminants of Water and Food, Department of Microbiology, Faculty of Biology,
University of Barcelona,
Barcelona 08028, Spain
E-mail: *rgirones@ub.edu*

M. Garcia-Valles
S. Martinez
Department of Crystallography, Mineralogy and Mineral Deposits,
University of Barcelona,
Barcelona,
Spain

O. Joseph
Laboratoire de Qualité de l'Eau et de l'Environnement,
Université Quisqueya,
Port-au-Prince BP 796,
Haïti

ABBREVIATIONS

BET	Brunauer, Emmett, Teller
CFU	colony forming unit
CWF	ceramic water filter
E. coli	*Escherichia coli*
GC	genomic copies
HAdV	human adenoviruses
HWT	household water treatment
ICAITI	Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industria
IEP	isoelectric point
IU	international units
JCPyV	JC polyomavirus
LRV	log reduction value
NoV (GI and GII)	Norovirus (Genotype I and Genotype II)
nPCR	nested PCR
PCR	polymerase chain reaction
PFU	plaque forming units
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
RT-PCR	reverse transcription PCR
SD	standard deviation
WaSH	water, sanitation and hygiene
WHO	World Health Organization
XRF	X-ray fluorescence

doi: 10.2166/washdev.2014.121

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) estimates that 780 million people worldwide (42% in sub-Saharan Africa) were still without access to improved sources of drinking water in 2010 (Onda 2012). Estimates of global young-child (<age 5 years) mortality from 2010 suggest that 2 million young children die due to diarrheal disease, and approximately 1.4 million (70%) of these are localized in low-income countries (Bryce 2005; Black 2010; Liu 2012). Recent data on diarrhea burden in low-income countries have reported 685,000 diarrhea deaths related to the deaths attributable to inadequate water and sanitation in 2012 (Prüss-Ustün 2014). The etiological origins of diarrhea had been traditionally associated with bacteria and protozoa; however, in recent years, improved diagnostic methods have made possible detection of other etiological agents, such as enteric viruses, which altered the distribution of the most common cause of diarrheal illness worldwide toward enteric viruses (e.g. norovirus (NoV), rotavirus, adenovirus) (Huilan 1991; Parashar 2003; Kotloff 2013).

Large numbers of viruses are excreted in human feces and urine into the environment, and, even at low concentrations, they can cause illness when ingested (Leclerc 2002). Consequently, sewage and fecal contamination, if not well contained and treated is the main source of microbiological risk in water and food. In countries with poor sanitation systems, such as in Haiti, where only 17% of the population has improved sanitation (Onda 2012), microbiological contamination in water sources is a major cause of morbidity and mortality.

Most potable water-treatment methods are not suitable or available for the majority of rural areas in low-income countries without reliable access to safe drinking water. For those populations, household water treatments and storage (HWTS) have been promoted to improve water quality and prevent diarrhea because of two important characteristics low cost and the capacity, from some of them, to be produced locally. Among all of the technologies tested at the laboratory and field levels, ceramic water filters (CWFs) have shown the highest impact on long-term health due to the high-adherence of users and their capacity to reduce approximately 50% of the diarrhea incidences (Clasen 2004, 2005; Brown 2008; Preez 2008; Hunter 2009; Levine 2010).

Currently, the most widely available, locally produced model of CWF is based on a design developed in 1981 by the Guatemalan industrial research institute ICAITI (*Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial*), and recently updated by The Ceramics Manufacturing Working Group (2011).

The performance of this CWF with and without colloidal silver has been investigated over the years by researchers who have studied its efficiency at reducing waterborne pathogens in the laboratory and in the field. In the literature, the removal efficiency of bacteria by CWF is described to be within the range of 2–4 logs using the standard types of silver-impregnated CWFs (Halem 2006; Oyanedel-Craver 2008; The Ceramics Manufacturing Working Group 2011); however, viral removal efficiencies have been shown to be much lower, between 0.21 and 0.45 log in CWF impregnated or not impregnated with silver described by the Salsali *et al.* (2011) study, and around 1.5 log reduction in the Brown & Sobsey (2010) study with no significant differences between impregnated and non-impregnated filters.

On the other hand, the levels of viral removal by the actual model of CWF would not be effective in decreasing the microbial risk regarding the prevalence and concentration of viruses in surface waters, which has been recently reviewed and showed a prevalence as high as 2–4 logs/L of human adenoviruses (HAdV) in surface waters from different geographical areas worldwide (Bofill-Mas 2013).

Regarding the question of viral retention/inactivation in clay structures, different approaches have been presented in the literature, which have faced the challenge of viral removal from water. A substantial body of literature on virus attachment to various, positively charged particles and surfaces, especially metal oxides and positively charged media in the environment such as clays, which are rich in ferric oxides, exists (Landry 1979; Gerba 1984; Loveland 1996; Zhuang 2003).

Brown (2009) found that metal oxides such as α-FeO (OH) (goethite), Fe_3O_4 (magnetite), Fe_2O_3 (hematite) and

Al_2O_3 (alumina) that were amended to clay material could effectively capture bacteriophages (up to 8 log) from a solution, although no assays were performed using real filters. Moreover, ceramic depth filters with added magnesium oxide showed an improved viral removal, however, the experiments presented high-variability in performance with filter operation time, and hence were discarded for drinking water production (Michen 2013).

Other factors related to hydrophobic interactions, surface environment and chemistry could also be important in virus-media adsorption and inactivation. It also has been described in the context that firing ceramics in a reductive atmosphere has an effect on the surface charge of the piece and therefore can have an effect on viral retention (Wegmann 2008). The shift of the isoelectric point into positive charge at pH 7 makes ceramics fired in a reductive atmosphere interesting for use in a virus adsorption filter considering the fact that most enteric viruses have a net negative surface charge (Michen 2010).

We hypothesized that the efficiency of the removal of viruses from water using CWFs might be increased by using CWFs that were produced with clays amended to natural oxides (Fe_2O_3, Fe_3O_4, Al_2O_3), which increase the positive charges. Moreover, clays from Girona (Spain) and Haitian local clays were used to create CWFs by firing in a kiln with a reductive atmosphere, which might affect viral retention as described previously.

This study has as a main objective to design a CWF applicable in Haiti and other areas presenting improved efficiencies for the removal of human viral pathogens from water. Moreover, the concentration of viral pathogens in urban sewage and water sources in Haiti has been tested by evaluating if concentrations of viruses in urban sewage are similar to those in other reported studies worldwide (Bofill-Mas 2013), thus highlighting the need for developing improved CWFs that also remove waterborne viral pathogens.

METHODS AND MATERIALS

Environmental screening was performed in the Metropolitan Area of Port-au-Prince, the capital of Haiti. Sampling took place in July 2011 during the rainy season. Water samples of 10 L were collected for viral analysis from six sampling points two different sites along the main river (*Riviere Grise*) that flows through the cities (each in triplicate) that are potentially used at domestic level, one borehole and three different sites (at least in duplicate) at open canals that receive domestic wastewater and discharge directly into the Caribbean Sea.

Water samples were analyzed within 6 h after collection to determine *Escherichia coli* concentration at the University of Quisqueya facilities in Port-au-Prince using direct plate analysis on ChromoCult© Coliform Agar (Merck) (ISO 8199:2005). On the same day, viruses were concentrated from the 10 L water samples by flocculation using a protocol based on organic flocculation with skimmed milk (Calgua 2008). The resulting, neutralized floccule was kept at −20 °C until shipment to Barcelona for analysis of viruses by polymerase chain reaction (PCR). Floccules of a total 10 L sample were then centrifuged and resuspended in 10 mL of phosphate buffer before nucleic acid extraction of 140 μL. Viral nucleic acids from concentrates were extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit® (Qiagen, Valencia, Spain) following the manufacturer's instructions. Each sample was eluted in a final volume of 80 μL. HAdV, JC polyomavirus (JCPyV) and NoV were quantified using quantitative PCR (qPCR) and quantitative reverse transcription PCR as previously described (Jothikumar 2005; Bofill-Mas 2006; Pal 2006), and direct samples and their 10-fold dilutions were tested. Standard controls were used in all assays, including negative and positive controls (viral suspensions of human adenovirus 2 (HAdV2) and clinical samples that were positive for NoV), with external controls for inhibition using standard DNA (Albinana-Gimenez 2009).

Positive samples of HAdV by qPCR were amplified by nested PCR (Allard 2001), and purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, USA). Both strands of the purified DNA amplicons were sequenced with the ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit with Ampli Taq® DNA polymerase FS (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The results were analyzed using the ABI PRISM 3730 XL automated sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems), and the sequences were compared with the nucleotide sequences present in

GenBank using the BLAST program of NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

The production of CWF took place in the ceramic workshop of *Josep Matés* (Fonteta, Girona, Spain). Several batches of small-scale-sized filters (1:2.5) were produced by following the production instructions from The Ceramics Manufacturing Working Group, and different compositions were tested. After analyzing the microbiological removal efficiencies, a real-scale-size filter was created to test the selected prototype. Small-scale-sized prototypes with different amended oxides and different firing atmospheres (oxidative vs. reductive) were obtained with clay and rice husks from La Bisbal (Girona, Spain). The natural oxides that were selected for testing included Fe_2O_3, Fe_3O_4 and Al_2O_3, and these were added at 16% weight into the milled clay before forming the filter. Each clay batch was mixed with pulverized rice husk that was screened with a sieve (250 μm) at 23% weight. Filters were pressed in a plaster mold, removed, stamped with a number and dried before firing at 950–990 °C for 8–9 h in an oxidative atmosphere, except for those produced to test the effect of different firing atmospheres. Those filters with no added oxides and the same proportion of rice husks were fired in oxidative or reductive atmospheres (two replicates per atmosphere) with three different origin clays from La Bisbal (non-calcareous) and two samples from Haiti Artibonite clay (calcic based) and Aquin clay (non-calcareous).

Firing in a reductive atmosphere consists of firing in a traditional kiln with wood up to the desired temperature (950–990 °C), and then sealing the kiln with the last coal inside the firing chamber. By this technique, the oxygen is totally consumed and a reduction atmosphere affects all clay components and as the iron oxide from the clay becomes ferrous oxide, we can observe, how the color within the wall of the components is gray, rather than brown or red.

After firing, the filters were cooled down and immersed in water over night. The flow rate was measured after filling the wet filters with water, and filters with acceptable flow rates between 1 and 3 L/h were approved for consequent analysis. No colloidal silver solution was added at any step. A modification of the filtering protocol was also tested by adding a 5-cm layer of crushed ceramic sitting inside the pot in the final prototype to increase the removal efficiency. Ceramic gravel was produced with crushed clay from broken filters fired in a reductive atmosphere. After manual crushing, gravel was sieved with a superior 2.0 mm and inferior 0.5 mm sieve size. A 5-cm layer was selected as the maximum depth to maintain an acceptable flow rate.

Finally, two replicates of the final prototype in real scale (1:1) were performed to evaluate the long-term efficiencies and applicability of the best-performing prototypes. The total numbers of filter units analyzed are shown in Table 1.

To characterize the chemical and mineralogical composition and texture of the raw material that was used and the ceramics that were obtained in this work, several assays were performed on a representative sample after homogenizing the material X-ray fluorescence analysis using a

Table 1 | Prototypes of the produced CWF

References	Ceramic additives	Clay origin	Firing atmosphere	Scale	Layer of ceramic gravel (cm)	Replicates
1	None	Bisbal, Spain	Oxidative	1:2.5	–	4
2	+16% Fe2O3	Bisbal, Spain	Oxidative	1:2.5	–	2
3	+16% Fe3O4	Bisbal, Spain	Oxidative	1:2.5	–	2
4	+16% Al2O3	Bisbal, Spain	Oxidative	1:2.5	–	2
5	None	Bisbal, Spain	Reductive	1:2.5	–	4
6	None	Bisbal, Spain	Reductive	1:2.5	5	2
7	None	Artibonite, Haiti	Reductive	1:2.5	–	2
8	None	Aquin, Haiti	Reductive	1:2.5	–	2
9	None	Bisbal, Spain	Reductive	1:1	5	2

Sequential X-ray Spectrophotometer Phillips PW 2400, X-Ray diffraction by an automatic PANalytical X'Pert system, pore-size-distribution measurements by Mercury Intrusion Porosimeter (MIT, AutoPore IV 9500 Series, Micrometrics©), gravimetric nitrogen Brunauer–Emmett–Teller (BET) analysis using a Micromeritics ASAP 2000 Micropore Analyzer, and Z-potential distribution analysis using Zeta Master of Malvern Instruments.

Prototypes of the small-scale filters were prepared and tested using fresh water spiked with *E. coli*, HAdV2, DNA virus, and the coliphage MS2 as a representative of smaller sized ssRNA viruses (27 nm). Water from the tap (with turbidity <5 NTU and pH 8) was conditioned by adding sodium thiosulfate at 10% to inactivate free chlorine and stocks of challenge micro-organisms were added to reach a minimum final concentration of 10^5 IU/mL.

To quantify the efficiencies of bacterial reduction, *E. coli* (Spanish Collection of Type Cultures, CECT 515) was cultured in tryptone soya broth and quantified after filtration and phosphate buffer solution dilution by plating on tryptic-case soy agar.

The viruses spiked were HAdV2 and MS2 as DNA and RNA viral models, respectively. HAdV2 was cultured in A549 cell culture and quantified by qPCR (Bofill-Mas 2006). MS2 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC 15597-B1), was multiplied by adding MS2 suspension to a log-phase host culture (Salmonella WG49, CECT 4625) and was enumerated following the double agar layer procedure. At the same time, NoV GII obtained from clinical samples was used to spike-challenge the water samples to add evidence for the viral removal of the selected filters.

To assess the capability of the ceramic filter prototypes and to eliminate viruses and bacteria, the small filters (1:2.5) that were amended with metal oxides and filters fired in different atmospheres (reductive vs. oxidative) were tested in a set of microbiological-removal efficiency studies. Each prototype was tested at least in two parallel filters. After production, the ceramic filters were saturated in mineral water overnight, and blank tests were performed by pouring mineral water through the filter. One liter of the challenge water was filtered in each test at least twice for each prototype.

Log reduction values (LRVs) were calculated by subtracting the $\log_{10}$ of the final concentration from the $\log_{10}$ of the initial concentration, and mean values and standard deviations were calculated. The Wilcoxon rank-sum test was applied to detect significant differences in LRV between tested filters prototypes vs. the control filters (no added oxides + oxidative firing); *p*-values are shown in Table 6.

The black filter (fired in a reductive atmosphere) with an extra 5-cm layer of ceramic gravel (2–5 mm) was the selected prototype based on the microbiological reduction values of the previous experiments. To evaluate its long-term performance, the WHO-testing recommendations for HWTS (WHO 2011) were used with two 1:1-scale prototype replicates of fired pieces with a final diameter of 320 mm and height of 230 mm. The performance of the selected models was monitored for over 1,000 filtered liters and a daily dosing of 40 L of dechlorinated, municipal tap water. Challenge waters were spiked with the selected micro-organisms (as in previous experiments) once per week and allowed to filter for 4 h before the effluent was collected to evaluate filter performance. Water quality parameters such as pH and flow rate were measured daily.

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained in the water samples in Haiti showed high-levels of human fecal contamination in the superficial waters of the Metropolitan Area of Port-au-Prince during July 2011 and are summarized in Table 2. HAdV were detected in high amounts in water from open canals that were considered to contain urban sewage (4.35×10^4 GC/100 mL, 6/6), as well as at the two river-water-sampling sites (1.03×10^2 GC/100 mL, 4/6) and at the borehole level (3.9×10^4 GC/100 mL). These results are in accordance with previous studies, which showed the abundance of HAdV and its use as indicators of human contamination (Bofill-Mas 2006). Important viral enteric pathogens that produce gastroenteritis were also detected: HAdV types 40–41, NoV GI and NoV GII, which emphasizes the importance of implementing water and sanitation programs that are focused on the reduction of viral infections in the population. *E. coli* mean levels were 1.93×10^4 cfu/100 mL (6/6) in the river samples and 1.74×10^6 cfu/100 mL (6/6) in the

Table 2 | Microbiological contamination in superficial waters of Port-au-Prince

			E.coli	HadV	JCPyV	NoV GII	NoV GI
Location	**Type**	**N**	**cfu/100 ml (positive/total)**		**GC/100 ml (positive/total)**		
Cité du Soleil	Canal	1	9.00×10^5	1.61×10^3	3.25×10^1	ND	ND
Bois Chene	Canal	1	3.00×10^6	3.91×10^3	2.64×10^1	3.63×10^3	ND
		2	5.00×10^6	6.15×10^3	1.36×10^3	ND	ND
		3	1.70×10^5	1.66×10^5	ND	ND	ND
Canal Brea, Martisand	Canal	1	1.20×10^6	3.31×10^4	3.11×10^1	ND	ND
		2	1.40×10^5	5.03×10^4	2.81×10^2	ND	2.55×10^2
Mean value Canal			1.74×10^6 (6/6)	4.35×10^4 (6/6)	3.46×10^2 (5/6)	3.63×10^3 (1/6)	2.55×10^2 (1/6)
Riviere Grise, Croix de la Mission	River	1	1.70×10^3	ND	ND	ND	1.68×10^2
		2	4.00×10^4	7.77×10^1	ND	ND	ND
		3	4.00×10^3	ND	ND	ND	ND
Riviere Grise, Pont sur la route #9	River	1	1.00×10^4	1.17×10^2	ND	ND	ND
		2	2.00×10^4	7.49×10^1	ND	ND	ND
		3	4.00×10^4	1.41×10^2	ND	6.01E + 02	ND
Mean value River			1.93×10^4 (6/6)	1.03×10^2 (4/6)	– (0/6)	6.01×10^2 (1/6)	1.68×10^2 (1/6)
Tabarre	Borehole	1	2.60×10^1	3.94×10^4	5.17×10^1	ND	ND

ND: not detected.

sewage samples. The mean values of another viral indicator of human origin, JCPyV, were quantified, and the mean value in sewage was 3.46×10^2 GC/100 mL (5/6); it was not detected in river samples, but it was found in borehole water. NoVs were quantified, presenting NoV GI mean values of 2.12×10^2 GC/100 mL (2/13), and NoV GII mean values of 2.12×10^3 GC/100 mL (2/13).

The results obtained using the bacterial standards, viral indicators and tested pathogens are a strong indication of the need for using household-based water treatments and improving CWFs that reduce the level of viral contamination in water.

The prototypes of the CWFs that was developed in this study and tested for microbiological efficiency are shown in Table 1. At the same time, the analysis of the chemical composition of the clays used to produce those CWFs indicates that silica is the major component, and the main difference between the three clays is the calcium content: Artibonite clay had the highest percentage (Table 3). After firing, all prototypes presented acceptable levels of water filtration capabilities and robustness. The main mineralogical differences between the ceramics that were fired in reducing and oxidizing atmospheres were the presence of magnetite or hematite, respectively, as quartz and feldspar were the dominant phases in both samples. Moreover, we observed that, in oxidizing conditions, the proportion of calcite ($CaCO_3$) in the ceramic was lower and the content of gehlenite ($Ca_2Al(AlSi)O_7$) was increased because, in this case, the decomposition was more efficient.

Table 3 | Chemical analysis of clays used to make CWFs

	Weight (%)		
Chemical composition	**LaBisbal, Girona, Spain**	**Artibonite, Haiti**	**Aquin, Haiti**
SiO_2	62.87	43.77	66.60
Al_2O_3	15.88	12.86	17.32
Fe_2O_3	5.56	6.96	3.12
MnO	0.07	0.07	0.02
MgO	1.20	3.65	0.45
CaO	1.53	11.94	0.33
Na_2O	0.41	1.16	0.66
K_2O	3.17	1.57	0.19
TiO_2	0.78	0.75	0.24
P_2O_5	0.13	0.14	0.04

However, during reductive firing, the atmosphere seems to restrain the decomposition, which is indicated by the remaining values of calcite (Table 4). Pore size distribution studies of the two firing conditions did not show significant differences between ceramics fired in different atmospheres regarding the pore size distribution showing larger dimensions than viral diameters (Figure 1). Nevertheless, significant differences were found regarding the analysis of the surface area of the ceramic filters, which indicated that filters fired in a reductive atmosphere had greater surface areas, with a mean value of 6.65 m^2/g, than the filters that were fired in an oxidative atmosphere, with a mean surface area of 2.41 m^2/g (Table 5). Moreover, studies of Z-potential distribution of ceramics comparing both firing condition shows a fraction of the crushed reductive clay being positive, suggesting a potential effect into viral absorption (Figure 2).

Table 4 | Mineralogical analysis of ceramics filters fired in different atmospheres in percentages (%)

	Artibonite		La Bisbal	
Mineral (%)	**Reductive**	**Oxidative**	**Reductive**	**Oxidative**
Quartz	31	23	51	47
Sericite-heated	–	–	44	40
Diopside	11	11	–	–
Calcite	4	2	–	–
Lime	1	0.5	–	–
Gehlenite	4	6	–	–
K feldspar	12	13	3	5
Plagioclase	35	43	–	7
Hematite	–	2	–	1
Magnetite	1	–	2	–

Table 5 | Specific surface areas of Artibonite and La Bisbal filters that were fired in different atmospheres

	BET (m^2/g)	
Firing atmosphere	**Artibonite**	**La Bisbal**
Reductive	6.8713 (±0.0475)	6.4371 (±0.0120)
Oxidative	2.6185 (±0.0281)	2.2036 (±0.0152)

The microbiological removal efficiency of the diverse prototypes was tested with a minimum of two filter replicates per prototype, and the results are shown in Table 6. The filter control, which was produced as a reference model of a non-silver-impregnated filter, presented viral and bacterial removal efficiencies of 0.57 for MS2 and 0.68 for *E. coli*, results that are equivalent to previously reported studies (Van der Laan 2014).

The prototype ceramic filters that were amended with Fe_2O_3, Fe_3O_4 and Al_2O_3 oxides did not significantly increase the efficiency of disinfection when compared with the control filters. The LRVs that were observed were lower than 1 logarithm for all types and for each microorganism that was tested, except for the filters with Al_2O_3, which showed a slightly significant increase in *E. coli* removal of 1.34 LRV (p value 0.046). In contrast, filters that were fired in a reductive atmosphere and produced from three clays of different origins (Spain and Haiti) had greater removal efficiencies for viruses (HAdV, MS2 and NoV) and bacteria (*E. coli*) around 3.0 log and 2.5 log, respectively, being significant compared to control filters

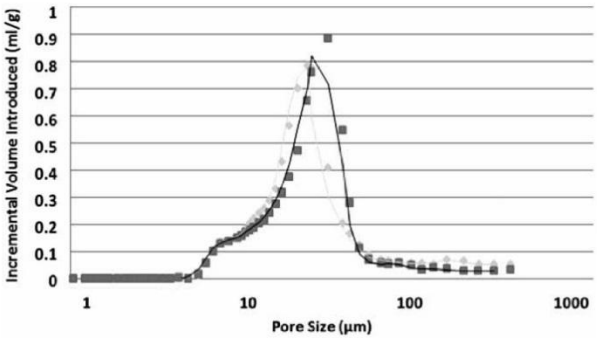


Figure 1 | Pore-size distribution of ceramics that were fired in oxidative (squares) and reductive (rhombus) atmospheres.

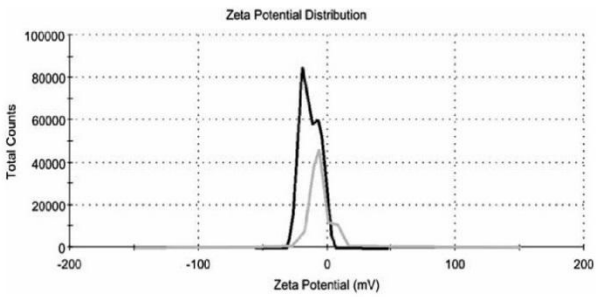


Figure 2 | Zeta potential distribution of clay from la Bisbal fired in oxidative atmosphere (black line) and clay fired in reductive atmosphere (gray line).

Table 6 | Microbiological effectiveness of different ceramic water filter prototypes in $\log_{10}$ reduction values and statistical significance levels from Wilcoxon rank-sum test

			Log reduction value			
References	**Filter**	**Micro-organism**	**Mean**	***n*[a]**	**Standard deviation**	***p* value**
1	CWF-Bisbal-oxidative	HAdV	0.62	18	0.43	ref
		MS2	0.57	8	1.04	
		NoV	0.96	2	0.32	
		E. coli	0.68	12	0.62	
2	CWF-Bisbal-oxidative + Fe_2O_3	HAdV	0.67	10	0.47	0.74
		MS2	0.54	2	0.11	0.27
		E. coli	0.59	8	0.69	0.87
3	CWF-Bisbal-oxidative + Fe_3O_4	HAdV	0.57	9	0.37	0.72
		MS2	0.25	2	0.01	0.26
		E. coli	0.53	8	0.82	0.46
4	CWF-Bisbal-oxidative + Al_2O_3	HAdV	0.85	9	0.37	0.21[b]
		MS2	0.26	2	0.03	0.27
		E. coli	1.34	7	0.55	0.046
5	CWF-Bisbal-reductive	HAdV	3.54	14	0.73	<0.001[b]
		MS2	2.33	8	0.61	0.02[b]
		E. coli	2.32	8	0.85	0.005[b]
6	CWF-Bisbal-reductive + gravel	HAdV	4.15	2	0.12	0.008[b]
		MS2	2.97	2	0.11	0.024[b]
		NoV	3.56	2	0.23	0.667
		E. coli	2.90	2	0.28	0.035[b]
7	CWF-Artibonite-reductive	HAdV	3.36	2	0.62	0.008[b]
		MS2	2.98	2	0.12	0.024[b]
		E. coli	2.37	2	0.47	0.035[b]
8	CWF-Aquin-reductive	HAdV	2.86	2	0.24	0.008[b]
		MS2	1.27	2	0.02	0.027[b]
		E. coli	2.40	2	0.43	0.035[b]

[a]n = number of assays.
[b]Significance levels of 5% or less ($p \leq 0.05$).

(Table 6). The analysis of the log removal efficiencies among reductive atmosphere filters were not significant ($p > 0.05$). These filters achieved the performance requirements for the HWTS protective technologies that were recently established by the WHO (2011).

Filters fired in a reductive atmosphere with an extra layer of ceramic gravel were selected to test long-term performance in real-size scale and showed consistent removal values after 1,000 L (Figure 3). During the long-term study, logarithm reduction values were between 2.5 and 4 LRV for the tested viruses (HAdV and MS2), but higher variations occurred for *E. coli*, with a range of 1.5–4 LRV. Flow rates were recorded at 1.5–3 L/h and were stable throughout the experiment, and the effluents had a slightly increased pH, from seven in the input water up to eight in the output water, as previously recorded (data not shown) (Halem 2006).

The new models of a CWF made by firing in a reductive atmosphere and without colloidal silver that have been proposed in this paper showed removal efficiencies for viruses and bacteria that were significantly higher than the current standards and what was previously reported in the literature. Furthermore, they reach the WHO targets for HWTS technologies. Black ceramics, which are clay fired in a reductive atmosphere, seems to increment the internal specific surface area and the Z-potential becoming the most feasible model for achieving advantageous results in viral removal of the proposed models. This model seems to be a low-cost option whose production can be easily adapted for a widespread model

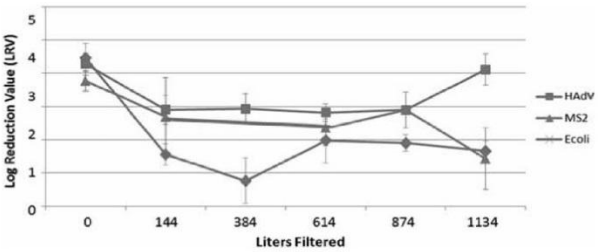


Figure 3 | Monitoring of long-term microbiological effectiveness of the selected CWF (reductive atmosphere +5-cm ceramic gravel layer).

of CWF to increase microbiological effectiveness without increasing costs.

CONCLUSIONS

High levels of waterborne viruses are present in superficial waters of Port-au-Prince, Haiti, highlighting the importance to improve household water technologies for viral removal efficiencies. A new prototype of CWF fired in a reductive atmosphere, a variation that maintains the product as non-expensive, improves viral removal efficiencies up to 3 logs, accomplishing the WHO requirements for HWTS technologies. Long-term assays with this new prototype show consistent removal values after 1,000 L filtered. Ceramics fired in a reductive atmosphere show greater surface area and higher Z-potential, the most feasible explanation for viral disinfection properties of this new model.

This new improved prototype can be easily implemented in CWF factories as firing in a reductive atmosphere will just require a specific kiln that can be built with local materials (traditional bricks, sand and concrete) or even current kiln models can be accommodated to fire in reductive conditions. Moreover, the fact that colloidal silver can be replaced by a layer of ceramic gravel will also reduce environmental and toxicity hazards as well as economic cost (around 1 euro per filter). At the same time, the addition of this layer made of ceramic gravel will entail a step of maintenance by users because regular cleaning of the gravel will be needed. However, this modification will also improve the microbial performance of the filter and highlights the importance of performing hygiene promotion campaigns alongside the implementation of this product toward users.

ACKNOWLEDGEMENTS

Intermon Oxfam and University of Barcelona (International cooperation and development grant, 2011) funded this study. We acknowledge Josep Matés for his tremendous contribution in the production of ceramic prototypes for this study. We thank the collaboration Montserrat Español from the Department of Materials Science and Metallurgical Engineering (CMEM), from Polytechnic University of Catalonia (UPC) and the Physicochemical Department of Pharmacy Faculty, University of Barcelona (UB), participating in the study. During the development of this study, Marta Rusiñol was a fellow of the Catalan Government "AGAUR" (Grants for universities and research centers for the recruitment of new research personnel, FI-DGR).

REFERENCES

Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J. M., Courtois, S. & Girones, R. 2009 Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* **158**, 104–109.

Allard, A. & Albinsson, B. O. 2001 Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 498–505.

Black, R. E., Cousens, S., Johnson, H. L., Lawn, J. E., Rudan, I., Bassani, D. G., Jha, P., Campbell, H., Walker, C. F., Cibulskis, R., Eisele, T., Liu, L. & Mathers, C. 2010 Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* **375**, 1969–1987.

Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M. & Girones, R. 2006 Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7894–7896.

Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A. & Girones, R. 2013 Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. *BioMed Res. Int.* 2013, Article ID 192089. doi:10.1155/2013/192089

Brown, J. & Sobsey, M. D. 2009 Ceramic media amended with metal oxide for the capture of viruses in drinking water. *Environ. Technol.* **30**, 379–391.

Brown, J. & Sobsey, M. D. 2010 Microbiological effectiveness of locally produced ceramic filters for drinking water treatment in Cambodia. *J. Water Health* **8**, 1–10.

Brown, J., Sobsey, M. D. & Loomis, D. 2008 Local drinking water filters reduce diarrheal disease in Cambodia: a randomized, controlled trial of the ceramic water purifier. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **79**, 394–400.

Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K. & Black, R. E. 2005 WHO Estimates of the causes of death in children. *Lancet* **365**, 1147–1152.

Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A. P., López-Pila, J. M. & Girones, R. 2008 Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Methods* **153**, 79–83.

Clasen, T. F., Brown, J., Collin, S., Suntura, O. & Cairncross, S. 2004 Reducing diarrhea through the use of household-based ceramic water filters: a randomized, controlled trial in rural Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**, 651–657.

Clasen, T., Garcia Parra, G., Boisson, S. & Collin, S. 2005 Household-based ceramic water filters for the prevention of diarrhea: a randomized, controlled trial of a pilot program in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**, 790–795.

Gerba, C. 1984 Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.* **30**, 133–168.

Huilan, S., Zhen, L. G., Mathan, M. M., Mathew, M. M., Olarte, J., Espejo, R., Khin Maung, U., Ghafoor, M. A., Khan, M. A., Sami, Z. & Sutton, R. G. 1991 Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. *Bull. World Health Organ.* **69**, 549–555.

Hunter, P. R. 2009 Household water treatment in developing countries: comparing different intervention types using meta-regression. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 8991–8997.

ISO International Standardisation Organisation 2005 *Water Quality – General Guidance on the Enumeration of Microorganisms by Culture.* ISO 81992005.

Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Vincent, R., Lu, X., Sobsey, M. D.,

Leclerc, H., Schwartzbrod, L. & Dei-Cas, E. 2002 Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**, 371–409.

Levine, D., Ave, O. R. & Francisco, S. 2010 End-user preferences for and performance of competing POU water treatment technologies among the rural poor of Kenya. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 4426–4432.

Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., Rudan, I., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C. & Black, R. E. 2012 Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* **379**, 2151–2161.

Loveland, J., Ryan, J. N., Amy, G. L. & Harvey, R. W. 1996 The reversibility of virus attachment to mineral surfaces. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **107**, 205–221.

Michen, B. & Graule, T. 2010 Isoelectric points of viruses. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 388–397. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x

Michen, B., Fritsch, J., Aneziris, C. & Graule, T. 2013 Improved virus removal in ceramic depth filters modified with MgO. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 1526–1533.

Onda, K., LoBuglio, J. & Bartram, J. 2012 Global access to safe water: accounting for water quality and the resulting impact on MDG progress. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **9**, 880–894.

Oyanedel-Craver, V. A. & Smith, J. A. 2008 Sustainable colloidal-silver-impregnated ceramic filter for point-of-use water treatment. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 927–933.

Pal, A., Sirota, L., Maudru, T., Peden, K. & Lewis, A. M. 2006 Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J. Virol. Methods* **135**, 32–42.

Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A. & Glass, R. I. 2003 Global illness and deaths caused by rotavirus

4.2. Article 2: Fonts de transmissió de virus entèric en camps de refugiats del Sudan del Sud

Resum

El Virus de l'hepatitis e (VHE) és un virus emergent causant de diversos brots d'hepatitis aguda principalment a Àsia i Àfrica, causant epidèmies de mitja i gran escala amb una mortalitat atípicament incrementada en les dones embarassades. Els brots causats pel VHE són associats normalment amb una font d'aigua potable contaminada. Un brot recent VHE (2012-14) al Sudan del Sud ha afectat més de 10000 persones.

Aquest estudi va avaluar diferents matrius d'aigua i aliments durant l'última fase d'aquest brot mitjançant l'anàlisi de VHE i adenovirus humà (HAdV) com a indicador de contaminació viral humana en dos camps de refugiats afectats per l'epidèmia: els camps de Batil i Jamam, amb un mostreig ambiental puntual a l'Abril de 2013.

Els resultats van revelar que les fonts d'aigua analitzades van ser negatius i que només les mostres de llars presentaven contaminació fecal per HAdV, identificant així una possible ruta de transmissió viral dins de la població.

CLEAN Soil Air Water

Laura Guerrero-Latorre
Ayalkibet Hundesa
Rosina Girones

Faculty of Biology, Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

Short Communication

Transmission Sources of Waterborne Viruses in South Sudan Refugee Camps

Outbreaks of hepatitis E virus (HEV) are typically associated with contaminated drinking water. A recent HEV outbreak (2012–14) in South Sudan affected ≥10 000 people. This study evaluated different water matrices and food during the last phase of the outbreak by analyzing HEV and human adenovirus (HAdV) as viral indicator of human contamination. The results revealed that the water sources analyzed were negative and that only household samples presented HAdV contamination, identifying a possible route of viral transmission within the population.

Keywords: Hepatitis E virus; Household transmission; Human viral contamination; Refugee camp; Waterborne outbreak

Received: May 25, 2015; *revised:* February 8, 2016; *accepted:* February 15, 2016

DOI: 10.1002/clen.201500358

1 Introduction

In the majority of emergencies and disasters, the greatest health risk to the population is the transmission of waterborne pathogens due to inadequate sanitation, hygiene, and protection of water sources. Waterborne viruses are considered to be one of the primary causes of both sporadic cases and outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis worldwide [1]; however, little is known about their dissemination in water sources.

Hepatitis E virus (HEV) is recognized as one of the two leading causes of acute hepatitis in adults in North and Central Africa, Asia and the Middle East. Estimates indicate that approximately three million acute cases of HEV and 56 600 HEV-related deaths occur every year [2]. This virus has been responsible for medium to large waterborne epidemics. For example, an HEV outbreak that has spread across refugee camps that border South Sudan over the last 2 years (2012–14) and that has caused more than 10 000 cases of acute hepatitis in this population [3] and has already crossed neighboring borders to cause 367 additional cases of acute hepatitis in Ethiopian camps as of July 2014 (www.unhcr.org/53e4a6379.html).

The clinical manifestations of HEV can range from asymptomatic infections, which are estimated to comprise 73% of HEV infections, to acute viral hepatitis (17%) and acute liver failure (2%). Hepatitis E is distinguishable from other types of hepatitis by its high prevalence in young adults and its increased morbidity and mortality in pregnant women. Symptomatic, infected pregnant women experience a case-fatality rate (CFR) as high as 40%, whereas the CFR of the general population is between 1 and 2% [4].

The fecal–oral route is the predominant mode of transmission of HEV and therefore, measures aimed at the proper treatment of drinking water, safe disposal of human excreta and improvements in personal hygiene are the keystones of its control; however, other routes of transmission have been described, such as parenteral transmission and vertical transmission from mother to child [5]. The excretion of infectious HEV in the stools of patients who have acute hepatitis E generally persists for less than a month following symptom onset, and an incubation period of 4–10 wk has been reported during hepatitis E outbreaks in which the timing of water contamination was known [6].

Fecal contamination of drinking water supplies has been associated with several HEV outbreaks. Outbreaks occur most frequently during the rainy season due to overflowing drains and the consumption of contaminated drinking water [7–11]. Moreover, recent publications have suggested the important role of household level transmission, especially in highly populated settlements, such as in refugee or displaced persons camps [12]. In the South Sudan outbreak, a case-control study that was carried out in the Batil camp (Maban) described a lack of risk associated to the point sources, and the only significant risk factor for acquiring HEV infection that was found was associated with close intrapersonal contacts (living with or caring for) with infected individuals [13]. Overall, previous findings have suggested that during HEV outbreaks transmission can be multifactorial and that it varies depending on the scenario, such as whether the affected individuals live in urban, rural, or sporadic settlements. However, the long incubation period of the disease (4–10 wk) typically hinders the identification of consistent risk factors or sources of infection in epidemiological studies; therefore, environmental analysis of water quality helps to provide a complete picture of potential transmission sources, as it assesses viral indicators of human fecal contamination [14]. The quantification of human adenovirus (HAdV) by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) has been proposed to serve as a molecular index of human viral contamination in water, as it is more stable and specific to human contamination than bacterial standards. Human adenovirus is only present in humans, and it produces long asymptomatic infections as well as gastroenteritis, respiratory infections, eye infections, acute hemorrhagic cystitis, and meningoencephalitis [15]. Furthermore, it is excreted by populations across the world and found in surface and ground environmental waters

Correspondence: Prof. R. Girones, Faculty of Biology, Department of Microbiology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain
Email: rgirones@ub.edu

Abbreviations: AJS, acute jaundice syndrome; **CFR**, case fatality ratio; **GC**, genomic copy; **HEV**, hepatitis E virus; **HAdV**, human adenovirus; **MSF**, Médicéens Sans Frontières; **qPCR**, quantitative polymerase chain reaction.

© 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

contaminated by human feces [14, 16–18]. Its presence in water matrices indicates that contact with human fecal material has occurred and that a risk of waterborne transmission exists.

To complement epidemiological evidence that has been previously collected in South Sudan, this study was designed to identify the potential routes of HEV transmission that occur during a real outbreak scenario by quantifying HEV and human adenoviruses as a viral marker of human contamination in water and food.

2 Materials and methods

2.1 Study-sites and sampling program

Sampling programs were defined in two selected settlements: Batil and Jamam refugee camps (Fig. 1) in South Sudan. The analysis took place in April 2013 at the peak of the dry season.

Epidemiological information from South Sudan refugee camps (Upper Nile State, Maban County) was collected from Médicéens Sans Frontières (MSF)-Holland and MSF-Belgium medical teams. The suspect case of hepatitis E was described as a patient who experienced a recent onset of sclera icterus, or "yellow eyes," in addition to the presence of one or more typical symptoms of hepatitis E (malaise, anorexia, epigastria discomfort, or nausea) and the exclusion of malaria by rapid test or microscopy examination. The sampling points primarily consisted of sources of drinking water, such as wells, boreholes, and pipelines prior to disinfection (10–20 L), as well as surface water samples from *hafirs*, local ponds (1–10 L). Moreover, drinking water (2–10 L) and food samples were collected from households in each of the camps that had at least two reported onsets of jaundice in the prior month. The samples were treated to concentrate the viruses and were stored at −20°C until being shipped to the reference laboratory.

In the Batil camp, three surface water samples were collected from water point drainages that were not being used for human consumption but were reported as being used for sources of drinking water for domestic animals and as locations where children played. Additional four groundwater samples were taken of nine existing hand pumps inside of Batil camp, and one groundwater sample was additionally taken from an open well by a river bed a few kilometers outside of the camp. Four different households that had reported at least two episodes of acute jaundice (AJS) syndrome in the prior month were visited, and samples of their stores of drinking water and of food that was prepared on the same day as the visit were collected for analysis.

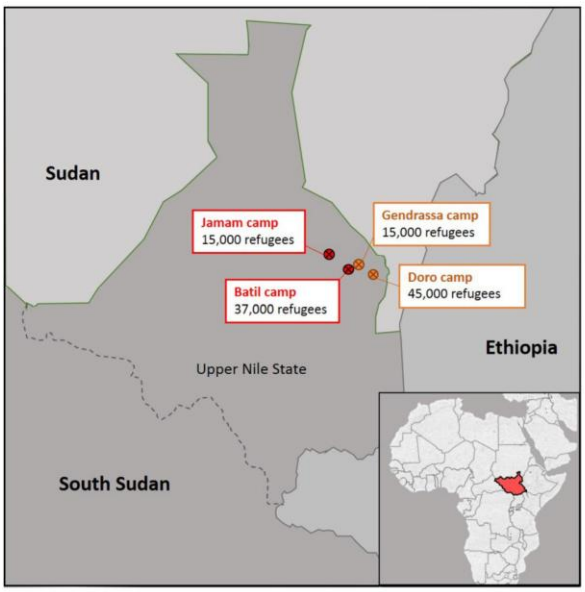


Figure 1. Location of Sudanese Refugee Camps in Upper Nile State, South Sudan (Source: MSF).

Four *hafirs* (local ponds) in the Jamam camp were sampled, as they were the only ones still containing water remaining from the rainy season. The only two groundwater points from Jamam located outside the camp were sampled before treatment, as they were motor-pumped sources of the pipeline water supply that was being treated by chlorination before distribution. Four households with at least two episodes of AJS that were reported in the prior month were visited, and samples of their stores of drinking water and of food that was prepared on the same day as the visit were collected for analysis.

Residual free chlorine was tested in each household water sample at the moment of the visit prior to sampling following the 4500-Cl US EPA method [19]. Ten milliliters of water were taken into a recipient, then a DPD#1 tablet was added and finally by observation of the colorimetric scale the free chlorine content was determined. Information on the container type used for storage water was collected in households, mainly covered buckets and narrow-mouthed jerry cans were used. In both camps, the food samples that were collected consisted of the same type of sorghum pancake, called "Kisra," which was the principal source of nutrition in both of these populations. This local food was collected uncooked and cooked in each house when possible (in Jamam only cooked samples were found), prioritizing the analysis of the uncooked samples.

2.2 Virus concentration and recovery

The method used to concentrate the viral particles from all different types of collected water samples was chosen on the basis of previous studies and was executed by employing glass wool columns and gravity flow [20]. The quantity of each water sample that was filtered was variable and ranged up to a volume of 20 L depending on filter clogging (shown in Table 1); the filtrates were frozen until being shipped in a cool box to the laboratories of the University of Barcelona for further analysis. The food samples that were collected from the chosen households were frozen and send to the laboratories in Barcelona to be processed by concentration of virus according to ISO/TS 15216-1:2013, which has been previously described [21] using minor modifications. Briefly, the virus was eluted from the food matrix during agitation with alkaline buffer, separated by low-speed centrifugation, precipitated from the resulting supernatant using polyethylene glycol and pelleted by low-speed centrifugation. The phosphate buffer suspended pellet was kept frozen at −80°C as the viral concentrates from water samples until the analysis of the samples.

2.3 Molecular assays for detection and quantification of viruses

Viral RNA and DNA were extracted using a QIAamp Viral RNA Extraction kit (Qiagen). HAdV was used as a fecal viral indicator to quantify human fecal contamination. Water and food samples were

© 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

CLEAN Soil Air Water

Table 1. Oligonucleotide primers and probes used for the detection and quantification of viral pathogens

Virus	Position[a)]	Primer and probe	Sequence (5′–3′)	Reference
Human adenovirus (HAdV)	Hexon gene 18869–18937	AdF	CWTACATGCACATCKCSGG	[22]
		AdR	CRCGGGCRAAYTGCACCAG	
		AdP	FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-BHQ1	
MS2 bacteriophage (MS2)	Maturation protein 344–678	Pecson-2F	AAGGTGCCTACAAGCGAAGT	[23]
		Pecson-2R	TTCGTTTAGGGCAAGGTAGC	
		Pecson-2P	FAM-ATCGTGGGGTCGCCCGTACG-BHQ1	
Hepatitis E Virus (HEV)	Overlapping region ORF2/ORF3 5302–5465	HE361 (F1)	GCRGTGGTTTCTGGGGTGAC	[24]
		HE364 (R1)	CTGGGMYTGGTCDCGCCAAG	
		HE366 (F2)	GYTGATTCTCAGCCCTTCGC	
		HE363 (R2)	GMYTGGTCDCGCCAAGHGGA	

[a)] The sequence positions are referred to strains J01917.1 (HAdV), NC_001417 (MS2) and AB089824 (HEV).

tested for the presence of HEV by RT-PCR using primers (Table 1) that targeted the HEV ORF2/ORF3 overlapping region; these primers are capable of detecting a wide spectrum of HEV types. In order to ensure correct performance of the RT-PCR assay positive controls were added using extractions from viral suspensions of HEV, as well as negative and inhibition controls that were also run at each assay. Hepatitis E virus stocks were produced with HEV Genotype 3 Kernow p6 strain (originally provided by Sue Emerson, National Institutes of Health, Bethesda, USA) infecting Hep2G/C3A cells (ATCC reference: CRL-10741).

Specific real-time qPCR assays were used to quantify HAdV and MS2. Each qPCR assay contained a set of specific primers and a TaqMan® fluorogenic probe. Both HEV, HAdV and MS2, were detected or quantified using primers, probes and methods previously described (Table 1). Undiluted and 10-fold dilutions of the nucleic acid extracts were analyzed in duplicate. All qPCR assays included more than one non-template control, NTC, to demonstrate that the mix did not produce fluorescence. The MS2 bacteriophage (an RNA virus) was used as the control process in the study to ensure correct performance during concentration in the field. Two field water samples, 10 L, collected in South Sudan were spiked with 1 mL MS2 suspension at 3E + 08 genomic copies (GC)/mL: surface water (SW4) and household water (HW5). Following this, they were filtered, transported, and analyzed together with other viral parameters at the reference laboratory.

3 Results and discussion

Clinical assessments that were provided by MSF-Holland indicated that the first onsets of AJS appeared in the Jamam camp in week 22 (June) of 2012. In both camps, true clusters of patients began forming in August 2012, and they increased in incidence, especially in Batil, until the highest peak was reached, which was reported in January 2013, when 500 cases were being reported per week in the Batil MSF-clinic. Since then, the number of cases has decreased consistently, coinciding with the dry season. The sampling program took place when the outbreak was significantly reduced with respect to the number of cases that were being reported in each of the affected camps (Fig. 2).

Hepatitis E virus was not detected in any of the water or food samples from either the Batil camp or the Jamam camp (figures not shown). The controls were satisfactory, and the theoretical limits of detection were between 1.76 and 24 viral particles/L of water sample (mean = 7.24 GC/L) and between 1.7 and 0.9 viral particles/10 g of food sample (mean = 1.02 GC/10 g). The explanation of not finding HEV in the environment is probably because of the reduction in HEV incidence that was observed during this period and also because of the scarcity of superficial water and rain (dry season) and high temperatures; such environmental conditions have previously been indicated to reduce HEV levels [25].

Positive identification of the control MS2 bacteriophage was made in both of the spiked samples (figures not shown). The concentration observed in the two samples was 6.9E + 04 GC/10 L for surface water (SW4) and 1.45E + 05 GC/10 L household water (HW5). The calculated recoveries in the two pre-acidified water samples were 0.5% in surface water and 1% in household water. These recoveries are similar to the results that have been described in a previous study [26], indicating that acceptable performance was achieved with respect to the concentration method.

Human adenovirus (and therefore human viral contamination) was not detected in any of the analyzed groundwater samples probably because of the well-protected boreholes and absence of water infiltrations during the dry season. The shallow well analyzed was located far from the camp (2 km approx.) and from any identified source of contamination. Contamination was also not detected in surface water samples probably due to the high temperatures (max. 50 °C) and high degree of sunlight irradiation. Although contamination at drinking water source points was not detectable, indicators of human fecal viral contamination were present in 3/4 of the water samples that were taken from households in the Batil camp, as well as in two of the four household water samples that were analyzed from the Jamam Camp (figures not shown). These findings are consistent with an epidemiological study that was conducted by Epicentre were increased risk of acquiring infection was associated at household level [13]. The drinking water sources in all distribution points were disinfected with chlorine; however, free chlorine was not detected at the household level. Moreover, inconsistent chlorination levels at the point of source were found during the reported period [27]. A food sample was also contaminated with HAdV in a household from the Batil camp (figure not shown), which was at the same time positive for HAdV in their storage water (Table 2). The standard curve slope determines the amplification efficiency in the qPCR assays (slope values -3.4 ± 0.2 and correlation coefficient $R^2 = 0.99$). The obtained qPCR standard curve was in the correct range and the targeted samples showed positive amplification signals between 35 and 39 threshold cycles (Fig. 3). The information obtained contributes to the identification of water and food as sources of viral contamination at household level in the analyzed period, independent from the potential role that flooding or heavy rain may have on the microbiological quality of water sources [28].

© 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

CLEAN Soil Air Water

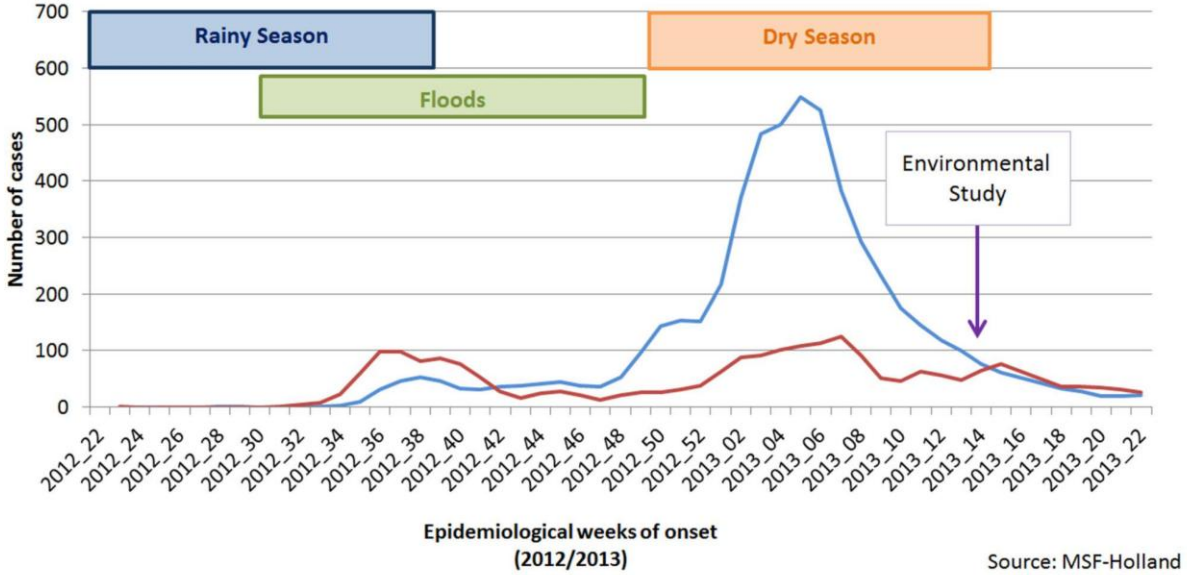


Figure 2. Incidence of AJS in Batil (blue) and Jamam (red) camps.

Table 2. Results of human adenoviruses and hepatitis E virus[a)] in water sources and food samples

Type of sample	Camp	Sampling location	Quantity (L or g)	Human adenovirus (GC/L or GC/g)
Surface water	Batil	SW1. Tapstand runover	10	ND
		SW2. Handpump runover	1	ND
		SW3. Tapstand runover	5	ND
	Jamam	SW4. Hafir	10	ND
		SW5. Hafir	8	ND
		SW6. Hafir	5	ND
		SW7. Shallow well	10	ND
		SW8. Hafir	5	ND
Ground water	Batil	GW1. Open Well	10	ND
		GW2. Borehole	10	ND
		GW3. Borehole	20	ND
		GW4. Borehole	20	ND
		GW5. Borehole	10	ND
	Jamam	GW6. Shallow well	10	ND
		GW7. Borehole	10	ND
Household water	Batil	HW1. Water storage, B[b)]	10	ND
		HW2. Water storage, B	5	**130.75**
		HW3. Water storage, B	2	**2.18**
		HW4. Water storage, B	10	**2.71**
	Jamam	HW5. Water storage, B	10	**71.87**
		HW6. Water storage, B	7	ND
		HW7. Water storage, JC	10	ND
		HW8. Water storage, JC	8	**16.55**
Household food	Batil	HF1. Uncooked Kisra[c]	34.45	ND
		HF2. Uncooked Kisra	24.3	ND
		HF3. Uncooked Kisra	30.8	ND
		HF4. Uncooked Kisra	30.5	**0.7**
	Jamam	HF5. Cooked Kisra	26.25	ND
		HF6. Cooked Kisra	30.6	ND
		HF7. Cooked Kisra	28.5	ND
		HF8. Cooked Kisra	30.8	ND

Kisra is a type of thin pancake made from whole sorghum flour.
[a)] HEV was not detected (ND) in any of the samples collected.
[b)] Type of container: B, buckets; JC, jerry can.

© 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

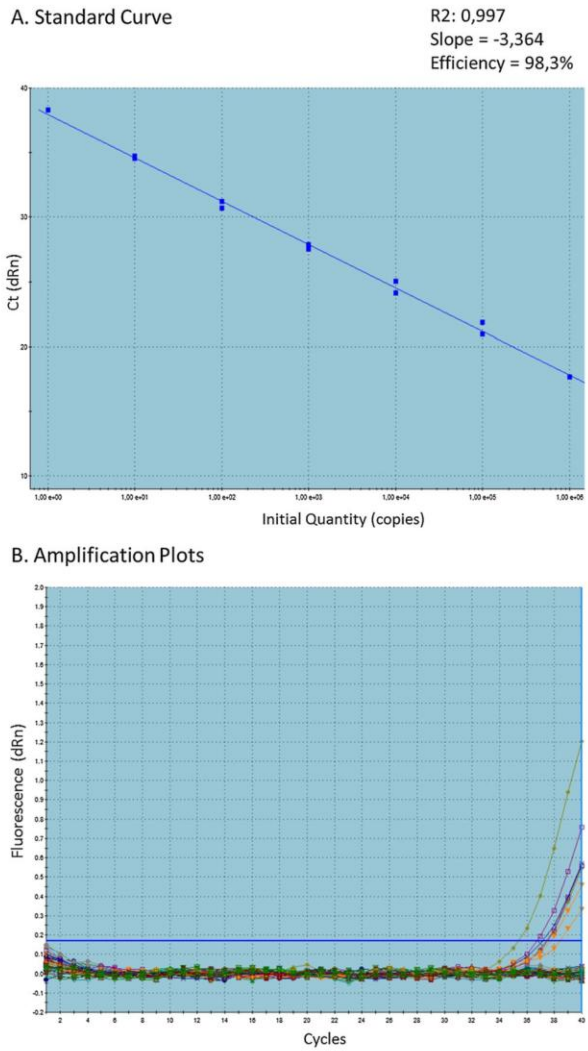


Figure 3. Human adenovirus qPCR assay. A: Standard curve. B: Amplification plots.

Prevention of future HEV outbreaks in refugee camps located in endemic areas of HEV would require the control of the microbiological quality and/or disinfection of drinking water, improving hygiene practices and sanitation and the identification of water sources presenting fecal contamination, which could be a route of transmission of HEV. The environmental monitoring of viral markers of human contamination is greatly needed in those situations of high risk of water-borne outbreaks, *i.e.* new migrating population from endemic areas or heavy rain and flooding.

4 Concluding remarks

This study evaluated different water matrices and food during the last phase of a recent HEV outbreak in two refugee camps in South Sudan. Environmental analysis of contaminant viruses helps to provide information on the most significant potential transmission sources. Hepatitis E virus was not detected in water sources at the end of the outbreak during dry season. Human adenovirus considered an indicator of human viral contamination was the only virus detected in the study and was detected in household water samples and food, showing the risk of contamination, and therefore, transmission at household level. Environmental monitoring of viral contaminants of water should be considered a prevention measure of waterborne transmission in endemic areas of HEV and will be more useful during the highest risk periods, such as after heavy rains or flooding.

The authors have declared no conflict of interest.

References

[1] K. L. Kotloff, J. P. Nataro, W. C. Blackwelder, D. Nasrin, T. H. Farag, S. Panchalingam, Y. Wu, et al. Burden and Aetiology of Diarrhoeal Dsease in Infants and Young Children in Developing Countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A Prospective, Case-Control Study, *Lancet* **2013**, *382*, 209–222.

[2] D. B. Rein, G. A. Stevens, J. Theaker, J. S. Wittenborn, S. T. Wiersma, The Global Burden of Hepatitis E Virus Genotypes 1 and 2 in 2005, *Hepatology* **2012**, *55*, 988–997.

[3] CDC, Investigation of Hepatitis E Outbreak Among Refugees – Upper Nile, South Sudan, 2012–2013, *Morbidity Mortality Weekly Rep* **2013**, *62*, 2006–2013.

[4] J. H. Kim, K. E. Nelson, U. Panzner, Y. Kasture, A. B. Labrique, T. F. Wierzba, A Systematic Review of the Epidemiology of Hepatitis E Virus in Africa, *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 308–321.

[5] S. Mirazo, N. Ramos, V. Mainardi, S. Gerona, J. Arbiza, Transmission, Diagnosis, and Management of Hepatitis E: An Update, *Hepat. Med.* **2014**, *6*, 45–59.

[6] S. Kumar, S. Subhadra, B. Singh, B. K. Panda, Hepatitis E Virus: The Current Scenario, *Int. J. Infect. Dis.* **2013**, *17*, 228–233.

[7] V. Arankalle, M. S. Chadha, S. Tsarev, S. U. Emerson, R. Risbud, K. Banerjee, R. H. Purcell, Seroepidemiology of Water-Borne Hepatitis in India and Evidence for a Third Enterically-Transmitted Hepatitis Agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3428–3432.

[8] K. Bile, A. Isse, O. Mohamud, P. Allebeck, L. Nilsson, H. Norder, I. K. Mushahwar, et al. Contrasting Roles of Rivers and Wells as Sources of Drinking Water on Attack and Fatality Rates in a Hepatitis E Epidemic in Somalia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1994**, *51*, 466–474.

[9] M. Rab, M. K. Bile, M. M. Mubarik, H. Asghar, Z. Sami, S. Siddiqi, S. Dil, et al. Water-Borne Hepatitis E Virus Epidemic in Islamabad, Pakistan: A Common Source Outbreak Traced to the Malfunction of a Modern Water Treatment Plant, *Am. J. Trop. Med. Hyg* **1997**, *57*, 151–157.

[10] A. L. Corwin, N. T. Tien, K. Bounlu, J. Winarno, M. P. Putri, K. Laras, R. P. Larasati, et al. The Unique Riverine Ecology of Hepatitis E Virus Transmission in South-East Asia, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *93*, 255–260.

[11] J. Guthmann, H. Klovstad, D. Boccia, N. Hamid, L. Pinoges, J. Nizou, M. Tatay, et al. A Large Outbreak of Hepatitis E Among a Displaced Population in Darfur, Sudan, 2004: The Role of Water Treatment Methods, *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 1685–1691.

[12] C. M. Howard, T. Handzel, V. R. Hill, S. P. Grytdal, C. Blanton, S. Kamili, J. Drobeniuc, et al. Novel Risk Factors Associated with Hepatitis E Virus Infection in a Large Outbreak in Northern Uganda: Results From a Case-Control Study and Environmental Analysis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *83*, 1170–1173.

[13] Epicentre, *Risk factors for Hepatitis E in Yusuf Batil refugee camp, October-November 2012 Maban County, Upper Nile State, South Sudan*, A Case-Cohort Study, Epicentre, Paris **2012**.

[14] L. Guerrero-Latorre, A. Carratala, J. Rodriguez-Manzano, B. Calgua, A. Hundesa, R. Girones, Occurrence of Water-Borne Enteric Viruses in Two Settlements Based in Eastern Chad: Analysis of Hepatitis E Virus, Hepatitis A Virus and Human Adenovirus in Water Sources, *J. Water Health* **2011**, *9*, 515–524.

© 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[15] K. D. Mena, C. P. Gerba, Waterborne Adenovirus, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2009**, *198*, 133–167.

[16] S. Bofill-Mas, N. Albinana-Gimenez, P. Clemente-Casares, A. Hundesa, J. Rodriguez-Manzano, A. Allard, M. Calvo, et al. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 7894–7896.

[17] R. J. Hunt, M. A. Borchardt, K. D. Richards, S. K. Spencer, Assessment of Sewer Source Contamination of Drinking Water Wells Using Tracers and Human Enteric Viruses, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 7956–7963.

[18] L. Ogorzaly, I. Bertrand, M. Paris, A. Maul, C. Gantzer, Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific RNA Phages in Raw Groundwater, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 8019–8025.

[19] US EPA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd ed., US Environmental Protection Agency, Washington, DC **2012**.

[20] N. Albinana-Gimenez, M. P. Miagostovich, B. Calgua, J. M. Huguet, L. Matia, R. Girones, Analysis of Adenoviruses and Polyomaviruses Quantified by qPCR as Indicators of Water Quality in Source and Drinking-Water Treatment Plants, *Water Res* **2009**, *43*, 2011–2019.

[21] ISO/TS 15216-1:2013, *Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR – Part 1: Method for quantification*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland **2013**.

[22] B. E. Hernroth, A. C. Conden, A. S. Rehnstam-Holm, R. Girones, A. K. Allard, Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: The First Scandinavian Report, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 4523–4533.

[23] B. M. Pecson, L. V. Martin, T. Kohn, Quantitative PCR for Determining the Infectivity of Bacteriophage MS2 Upon Inactivation by Heat, UV-B Radiation, and Singlet Oxygen: Advantages and Limitations of an Enzymatic Treatment to Reduce False-Positive Results, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 5544–5554.

[24] J. Inoue, M. Takahashi, Y. Yazaki, F. Tsuda, H. Okamoto, Development and Validation of an Improved RT-PCR Assay With Nested Universal Primers for Detection of Hepatitis E Virus Strains With Significant Sequence Divergence, *J. Virol. Methods* **2006**, *137*, 325–333.

[25] S. U. Emerson, V. Arankalle, R. H. Purcell, Thermal Stability of Hepatitis E Virus, *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 930–933.

[26] D. S. Francy, E. A. Stelzer, A. M. G. Brady, C. Huitger, R. N. Bushon, H. S. Ip, M. W. Ware, et al. Comparison of Filters for Concentrating Microbial Indicators and Pathogens in Lake Water Samples, *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 1342–1352.

[27] S. I. Ali, S. Ali, J. Fesselet, Effectiveness of Emergency Water Treatment Practices in Refugee Camps in South Sudan, *Bull. World Health Organ.* **2015**, *93*, 550–558.

[28] K. F. Cann, D. R. Thomas, R. L. Salmon, A. P. Wyn-Jones, D. Kay, Extreme Water-Related Weather Events and Waterborne Disease, *Epidemiol. Infect.* **2012**, *141*, 671–686.

© 2016 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

4.3. Article 3: Desinfecció per radiació UV i per sobres de floculació-cloració del Virus de l'Hepatitis E en aigua

Resum

El Virus de l'hepatitis E (VHE) és una causa important de brots d'origen hídric en zones de baix nivell de sanejament. El proveïment d'aigua potable és clau per prevenir brots causats pel VHE, per això és necessari tenir dades sobre l'eficàcia dels tractaments de desinfecció sobre aquest patogen.

En aquest treball es va avaluar la capacitat de la radiació UV i els sobres de floculació-cloració per reduir el VHE en matrius d'aigua. La soca del VHE-p6-kernow es va multiplicar en la línia cel·lular HepG2/C3A, es va quantificar el nombre de genomes usant qRT-PCR i es va mesurar la infectivitat usant un assaig d'immunofluorescència (IFA).

Els assajos d'irradiació UV usant radiació de baixa pressió van demostrar unes cinètiques d'inactivació pel VHE de 99.99% amb una radiació d'UV de 232 J/m^2 (IC del 95%, 195.02-269.18). Per altra banda, els sobres de floculació-cloració redueixen significativament les concentracions virals, tot i que els resultats d'inactivació estan per sota el llindar de reducció protector (4.5 logaritmes de reducció) proposat per l'OMS.

International Journal of Hygiene and Environmental Health xxx (2016) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Hygiene and Environmental Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijheh

UV disinfection and flocculation-chlorination sachets to reduce hepatitis E virus in drinking water

Laura Guerrero-Latorre[a], Eloy Gonzales-Gustavson[a], Ayalkibet Hundesa[a], Regina Sommer[b], Girones Rosina[a,*]

[a] Laboratory of virus contaminants of water and food. Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

[b] Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Institute for Hygiene and Applied Immunology, Water Hygiene, Medical University Vienna, Kinderspitalgasse 15, 1095 Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 February 2016
Received in revised form 5 April 2016
Accepted 5 April 2016

Keywords:
Hepatitis E virus
Water disinfection
UV radiation
Flocculation-chlorination sachets

ABSTRACT

Hepatitis E Virus (HEV) is a major cause of waterborne outbreaks in areas with poor sanitation. As safe water supplies are the keystone for preventing HEV outbreaks, data on the efficacy of disinfection treatments are urgently needed. Here, we evaluated the ability of UV radiation and flocculation-chlorination sachets (FCSs) to reduce HEV in water matrices. The HEV-p6-kernow strain was replicated in the HepG2/C3A cell line, and we quantified genome number using qRT-PCR and infectivity using an immunofluorescence assay (IFA). UV irradiation tests using low-pressure radiation showed inactivation kinetics for HEV of 99.99% with a UV fluence of 232 J/m^2 (IC 95%, 195,02–269,18). Moreover, the FCSs preparations significantly reduced viral concentrations in both water matrices, although the inactivation results were under the baseline of reduction (4.5 LRV) proposed by WHO guidelines.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatitis E Virus (HEV) is an emerging virus causing water- and food-borne disease of global significance. The World Health Organization (WHO) estimates there are 3 million acute cases of HEV and 56,600 HEV-related deaths per year (WHO, 2014). Although the majority of HEV infections are subclinical, when HEV does cause clinical symptoms, they can have severe consequences, including fulminant hepatic failure and death, most often in pregnant women (Kmush et al., 2015). In addition, extra-hepatic manifestations of HEV have been observed, including neurological injury (Kamar et al., 2011).

According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), HEV has four classical genotypes (1, 2, 3 and 4) belonging to the *Orthohepevirus* genus, and it includes a diverse array of viral variants that can infect different hosts (primarily mammalian and avian). Genotypes 1 and 2 are strictly human, whereas strains corresponding to genotypes 3 and 4 are zoonotic, with pigs being the primary host (Kamar et al., 2014).

The epidemiology of hepatitis E differs between low- and high-income countries. In areas with poor/limited sanitation and hygiene practices, including large parts of Asia, Africa and South America, HEV has caused medium- to large-sized waterborne outbreaks. Over the last decade, outbreaks have occurred in areas of humanitarian emergencies, such as camps for refugees or internally displaced populations (Boccia et al., 2006; Guerrero-Latorre et al., 2011; Howard et al., 2010). The most recent example was an HEV outbreak that spread across South Sudan between 2012 and 2014, resulting in over 10,000 cases and cross-border infections into neighbouring countries, including 367 cases in South-Sudanese refugee camps in Ethiopia (UNHCR, 2014).

Moreover, the increased prevalence of HEV among populations in high-income countries has been well documented, with sporadic patterns of cases due to zoonotic transmission following consumption of raw meat, close contact with infected animals or hepatic transplantation (Kamar et al., 2012).

The fecal-oral route is the predominant mode of transmission for HEV, and as there are currently no efficient curative therapies for Hepatitis E infection, measures aimed at proper treatment of drinking water, safe disposal of human excreta and improvements to personal hygiene are the keystones for prevention and control of this disease (WHO, 2014).

* Corresponding author.
E-mail address: rgirones@ub.edu (G. Rosina).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.04.002
1438-4639/© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

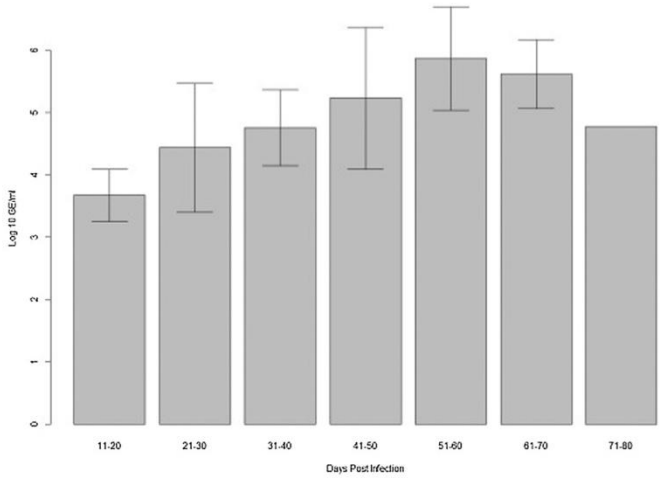


Fig. 1. Infections of Hep2G/C3A cell line with HEV p6-kernow strain. Bars represent average values of HEV concentration of supernatants at different times post-infection.

With respect to water treatment, chlorination was the first option used in many HEV outbreak scenarios until a study suggested that chlorinated water does not reduce the risk of infection (Guthmann et al., 2006). During that period, there were no studies addressing HEV disinfection, due to methodological limitations and a lack of cell culture assays to evaluate virus viability after treatment. The above study caused some organizations that were assisting HEV outbreaks to use other water treatment methods instead, such ultraviolet (UV) radiation. However, there is no available experimental information concerning the efficiency of UV disinfection for HEV.

Recently, cell culture systems have been developed that allow for the replication of low titres of HEV using a recombinant strain of a HEV, Kernow-p6-HEV, which is derived from the human hepatoma cell line HepG2/C3A (Shukla et al., 2012). These advances in laboratory techniques now make it possible to study HEV disinfection. One study has already shown that HEV is susceptible to chlorination, with a 99% reduction in virus levels following current treatment guidelines (Girones et al., 2014), supporting the use of chlorine as an effective strategy for controlling HEV waterborne transmission.

UV disinfection is now accepted as a major disinfection process for drinking water. Irradiation of water by low-pressure monochromatic UV radiation (253.7 nm), also known as UVC radiation, is a common water treatment procedure, which damages the genomes of microbial pathogens by producing photodimers between adjacent pyrimidine nucleotides, blocking RNA and DNA replication. Additional factors are likely to contribute on virus inactivation by UV such as damage to virus capsid proteins by hydroxyl radicals produced during photocatalysis (Mayer et al., 2015). Unlike ozone or chlorine, UVC radiation does not create any known toxic disinfection by-products, although it also leaves no residual protective effects in the treated water. Most regulatory bodies now specify a fluence or UV dose of 400 J/m^2 to assure at least 4 logarithms of inactivation (4-log) for any pathogenic microorganism (DVGW, 2006; EPA, 2003; ÖNORM, 2001). Although the majority of viruses do not show further inactivation at fluences above 500 J/m2, there are some DNA viruses (e.g., adenovirus) that are resistant to standard UV doses due to their capacity to repair their genomes following damage (Calgua et al., 2014; Hijnen et al., 2006).

Moreover, in humanitarian emergency settings, when the risk of waterborne outbreaks is increased and efficient common drinking water treatments are not available, point-of-use (POU) water treatments can be used as a rapid response to reduce waterborne disease transmission. Flocculation-chlorination sachets (FCSs) are premade formulations that combine flocculating agents to reduce turbidity and a chlorine-based disinfectant. FCSs are commercialized as single-use packages that can purify 10 or 20 L of untreated water to remove 6, 5, 4 logarithms of bacteria, viruses and protozoa respectively, and they are both well-accepted and properly used in many remote communities (Colindres et al., 2007; Powers et al., 1994; Souter et al., 2003). However, no specific studies have been performed to validate the inactivation of HEV by these treatments.

This manuscript describes the first experimental data on the efficiency of HEV disinfection in water using UV and FCS treatments. We also discuss the best options for HEV outbreak management based on the obtained experimental data.

2. Materials and methods

2.1. Viral suspensions

Hepatitis E Virus suspensions were produced by culturing the HEV-p6-kernow strain, genotype 3 (originally provided by Sue Emerson, National Institutes of Health, Bethesda, USA) in HepG2/C3A cells (ATCC reference: CRL-10741). This virus contains a 171-nucleotide insertion that encodes 58 amino acids of the human S17 ribosomal protein in the hypervariable region, which confers a significant growth advantage (Shukla et al., 2012).

HepG2/C3A cells were grown in flasks pre-coated with collagen (rat tail collagen type 1, Millipore, Billerica, MA) and cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (Gibco, Frederick, MD), L-glutamine, penicillin-streptomycin, gentamicin, and 10% fetal bovine serum (Ultra-Low immunoglobulin G, Invitrogen).

The viruses present in the media after a minimum of 10 days post-infection were passed through a 0.45-μm filter to avoid aggregation, concentrated by ultracentrifugation for 1 h at 100,000g, and then resuspended in phosphate buffer (pH 7, 1:2 v/v 0.2 M Na2HPO4 and 0.2 M NaH2PO4). The final virus suspensions were quantified and stored at −20 °C until use.

MS2 bacteriophage was used as a control process and reference for the disinfection experiments. MS2 stocks were produced in Salmonella WG49 following the standard ISO 10705-1 (ISO, 1995).

2.2. Quantification of viral suspensions

To evaluate the efficacy of the water treatments, both HEV and MS2 were analysed in duplicate for all experiments. HEV genomes

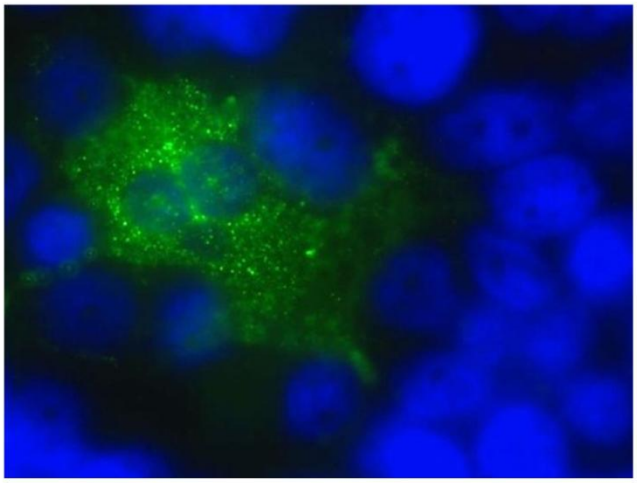


Fig. 2. Immune fluorescence of Hep2G/C3A cells 5 days after infection with Hepatitis E Virus (p6Kernow strain), Cells were stained with *Anti-Hepatitis E Virus ORF2,1 Mouse Antibody* (MAB8003, Millipore) and *Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H + L) Antibody (A11001 Life Technologies)*.

were quantified using qRT-PCR to amplify the overlapping region ORF2/ORF3; genome equivalents (GE) were extrapolated based on the standard curve using DNA plasmid as previously described (Jothikumar et al., 2006). For the infectivity assays, the indirect immunofluorescence assay (IFA) for HEV, as described by Shukla et al., 2012; was used with minor modifications. Briefly, HepG2/C3A monolayers were incubated overnight in 8-well Lab-Tek II chamber slides (Nagle Nunc International, Naperville, IL) at 34.5 °C under 5% CO_2 until they reached 90–100% confluence. One hundred microliters of direct or diluted samples were inoculated into each well and incubated for 5 h at 34.5 °C under 5% CO_2. Next, the inoculums were removed, 10% FBS-supplemented DMEM was added, and the mixtures were incubated at 34.5 °C under 5% CO_2. After 5 days of incubation, the monolayers were fixed with acetone for 30 s and then rehydrated by soaking in PBS for 5 min. The monolayers were blocked for 1 h in blocking solution containing PBS with 0.5% skim milk, 0.5% BSA, 0.1% Triton X-100 and 0.02% sodium azide. After removing the blocking solution, the monolayers were incubated for 1 h with a mouse anti-hepatitis E monoclonal antibody targeting the ORF2 capsid protein (MAB8003, Millipore, Chemicon) at a 1:150 dilution. After incubation, the cells were washed with PBS and stained for 1 h at RT with a 1:1000 dilution of the Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H + L) antibody (Life Technologies, Fisher) in blocking solution. The secondary antibody was removed, and the cells were rinsed with PBS for 15 min. Finally, the chambers were mounted by adding UltraCruz® mounting medium containing 1.5 μg/ml 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for DNA counterstaining (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), and the cells were observed under UV light using an epifluorescence microscope. Stained cells were counted by manually scanning the entire well and tabulating the number of fluorescent cells. Pairs of stained cells that appeared to have just divided were counted as 1 cell. Slides were coded to perform blind count and broken only after all samples were counted.

To quantify the MS2 bacteriophage genome, we targeted a region of the genome encoding a maturation protein that has been associated with infectivity levels using qRT-PCR after UVC treatment (Pecson et al., 2009). Infectivity was also evaluated by measuring plaque forming units (PFU) as specified in the ISO 10705-1 (ISO, 1995).

2.3. Experimental design

2.3.1. UV radiation experiments

A quasi-parallel beam bench scale UV apparatus was equipped with three low-pressure (LP) mercury vapour lamps (36 W each, ozone-free, EK 36, Katadyn, Switzerland) emitting quasi-monochromatic radiation at 253.7 nm, which were oriented perpendicular to the surface of the test suspension. UV irradiance (W/m2), which was measured using a radiometer and a UV detector (IL 1700 with sensor SED 240, interference filter NS 254, and wide-angle W diffuser, International Light, Newburyport, MA, USA), was integrated over the irradiation time, yielding a UV-253.7 nm fluence. Fifteen millilitres of a test suspension containing HEV and MS2 bacteriophage in phosphate buffer (as a control for the exact UV exposure and measurement) was placed in a 90-mm diameter Petri dish with constant stirring during UV exposure. The viral suspensions were irradiated with increasing fluences. For each UV fluence setting, two 2.5-mL aliquots were collected for analysis. To assess the survival of viral particles after UV irradiation, infectious HEV and MS2 levels were quantified using the protocols described above.

2.4. Flocculation-chlorination sachets

Two types of water were used to test the POU solutions in the laboratory: 1) model surface water (EPA#1), which is a very low turbidity matrix, and 2) model-stressed surface water (EPA#2), which was selected from the United States Environmental Protection Agency (EPA) protocol for the evaluation of microbiological water purifiers (EPA, 1987). To produce both matrices, 100 mL 10% sodium thiosulphate was added to 10 L municipal tap water to eliminate free chlorine (FRC <0.01 mg/l). Five litres of this mixture was used to create EPA#1, ensuring that the pH was within 6.5-8.5 and the turbidity was under 5 nephelometer turbidity units (NTU). To obtain EPA#2 model-stressed surface water, we increased the turbidity level to 30 NTU by adding 50 mL autoclaved wastewater to 5 L dechlorinated tap water and adjusting the pH to 9 (+/−0.2).

Two commercial preparations of FCS were evaluated: 1) PUR Purifier of Water™ (Procter & Gamble Company), which contained iron sulphate as a flocculant and calcium hypochlorite as a disinfectant, and 2) WaterMaker™ (Control Chemicals Pty Ltd), which used aluminium sulphate as a flocculant and a chlorine-based product as a disinfectant, as stated by the manufacturer. Viral suspensions were added to buckets containing 0.1 L EPA#1 and #2 water and mixed to yield an approximate concentration of 10^4 and 10^6 GE/ml for HEV and MS2, respectively. Prior to treatment, a sample was collected to serve as an untreated control. The remaining samples were treated with the POU water treatment products, according to the manufacturer's instructions. Briefly, the procedures consisted of pouring a powder into each prepared sample, stirring for 5 min, allowing the sediment to flocculate for 5 min, filtering the sediment through a clean cotton cloth, and finally leaving the clarified water to stand for 20 min to allow the chlorine agents to disinfect the water. At the end of the treatment period, the free chlorine was measured by the DPD (*N,N*-diethyl-pphenylendiamine) method and neutralized with sodium thiosulphate. Samples were then quantified by qRT-PCR and tested for infectivity using the methods described in section "Quantification of viral suspensions".

2.5. Data analysis

The effect of UV radiation on viral inactivation was modelled using linear regression analysis to predict the UV fluences necessary to achieve 90 (D90, corresponding to1-log) to 99.99% (D99.99, corresponding to 4-log) reductions. In addition, measured infectivity data were compared to estimated infectivity using the qPCR-based

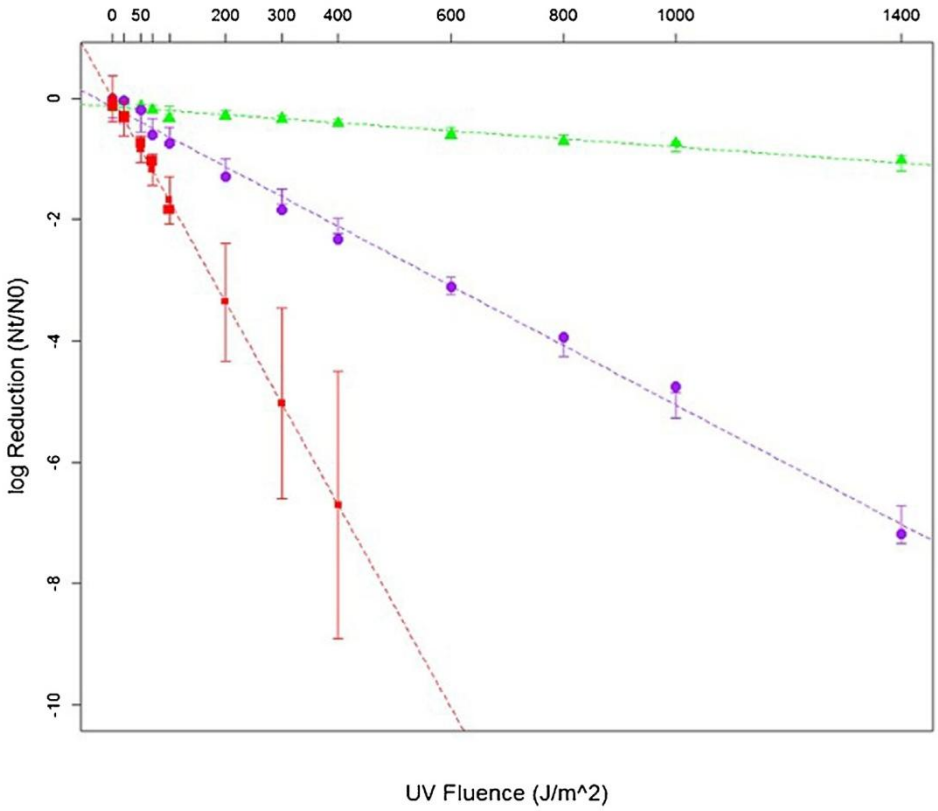


Fig. 3. Inactivation kinetics of HEV and MS2 suspensions exposed to low pressure UV radiation. MS2 kinetics are represented by circles (detection by PFU/mL), whilst HEV qRT-PCR values (detection by GE/ml) are represented by triangles and HEV infectivity decay (detection by FFU/mL) is shown in squares. Larger size symbols represent experimental data obtained in this study.

approach developed by Pecson et al. (2011). The mathematical approach used in these experiments has been applied to several other viruses (e.g., Human Adenovirus, JC Polyomavirus and MS2 bacteriophage) to calculate estimated inactivation, which has shown a good correlation with actual results (Calgua et al., 2014). The formula applied to estimate the infectivity of HEV from qRT-PCR data was as follows:

log(Nt/N0)infectivity = c * log(Nt/N0)qRT-PCR,

where c is a measure of the lesion rate in the targeted genome region relative to the inactivation rate of the virus. Basically, by analysing experimentally derived measurements of infectivity and qRT-PCR decay, we can calculate the value c. Then, as long as the same genome region is used, we can estimate infectivity from qRT-PCR data with this parameter in future experiments.

To analyse the efficiency of the FCS preparations, the water samples were measured pre- and post-treatment in duplicate for each condition and for each virus. Log Reduction Values (LRVs) were calculated using the following formula:

LRV = log(pre-treatment)-log(post-treatment).

Statistical analysis were performed to compare LRV between methods by ANOVA. All analyses were performed using the R software program (version 3.0.2).

3. Results

3.1. Hepatitis e virus cultures and suspensions

To obtain high titres of the HEV-p6-kernow strain for the disinfection experiments, infections were performed in the HepG2/C3A cell line up to 80 days (Fig. 1). Supernatants of cell culture media were quantified at different times post-infection. There was statistically difference between mean concentrations (log 10 of GE/ml) and periods of time (ANOVA, p = 0.011). Moreover, *posthoc* Tukey test showed that at 51–60 days there was a significant increase from 11 to 20 period (p adjusted = 0.01). Viral suspensions of HEV-p6-kernow for disinfection studies were obtained by concentrating the supernatants from eight separate infections. The viral concentrates were quantified for analysis of genomic equivalent number and infectivity using immunofluorescence (Fig. 2). Moreover, quantification of infectivity showed a good correlation with specific infectivity, as previously described (Shukla et al., 2012) (Table 1).

3.2. UV disinfection

In a preliminary experiment, viral suspension A (HEV 8.13E + 05 GE/mL and 5.93E + 02 ffu/mL; MS2 2.25E + 08 cfu/mL) was irradiated with fluences of 0100, 200, 400, 800, 1000 and 1400 J/m^2 in duplicate. The results revealed that at a fluence of only 100 J/m^2, infective HEV viral particles were no longer detected. Consequently, a second series of UV irradiation experiments was performed with suspension B (HEV 6.40E + 05 GE/mL and 5.58E + 03 ffu/mL; MS2 8.75E + 05 cfu/mL) using fluences of 0, 20, 50, 70 and 100 J/m^2 in duplicate and analysed with infectivity assays and qRT-PCR. The kinetics for HEV and MS2 bacteriophage are shown in Fig. 3 with integrated data from all the experiments. The observed (individual data points) values were used to generate regression curves (discontinuous line) to calculate predicted fluences required for viral inactivation up to 4-log. To calculate UV disinfection curves from the measured data, a first-order inactivation model was used, as we did not observe any tailing effect at the fluences analysed. The D90 value is defined as the fluence required for a 1-log inactivation of the initial viral concentration. From the model

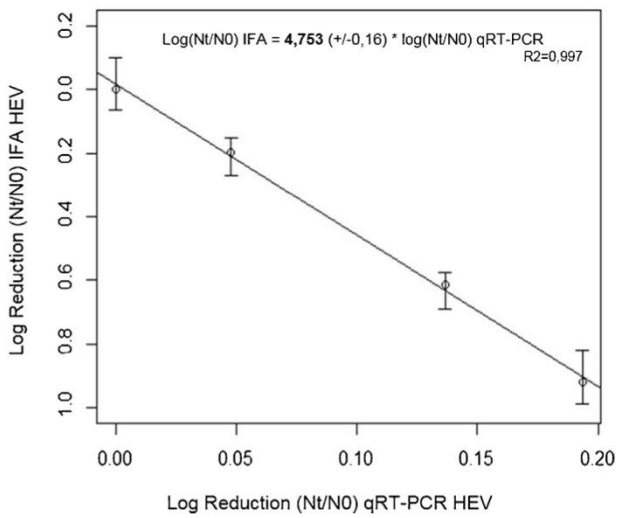


Fig. 4. Estimated inactivation for HEV based on mathematical approach. Experiments were used to derive the parameter *c* to estimate HEV infectivity from qRT-PCR data. Measured data points reflects the average of duplicate qRT-PCR samples using the equation were *c* = 4.753.

we developed, we inferred that the fluence needed for a 4-log (D99.99) inactivation was 231.94 J/m^2 (195.02–269.18) (Table 2). MS2 bacteriophage decay was used as a control for these specific irradiation conditions, as has been performed previously. In this experiment, a 1-log decay of the MS2 control virus was achieved with 120.89 J/m^2 (95.69–146.09), consistent with the results of another study (140 J/m^2) (Meng and Gerba, 1996). Therefore, HEV is more sensitive to UV than MS2, with a lower D90 value. Evaluation of the kinetics of HEV inactivation by UV should provide valuable information for estimating infectivity based on qRT-PCR data. Based on the work of Pecson et al., 2011; we calculated the parameter *c* to be 4.753, based on the reduction in the qRT-PCR signal (Fig. 4). Using this *c* value, we extrapolated the experimentally derived qRT-PCR results to estimate the rate of inactivation, and we observed a good correlation with the actual data (data not shown).

3.3. Flocculation-chlorination sachet disinfection

To evaluate disinfection following treatment with the FCSs, solution C was used (HEV 3.74E + 04 GE/mL and 2.30E + 01 ffu/mL; MS2 4.00E + 06 cfu/mL). Virucidal efficacies for two FCS preparations using two different water matrices (EPA #1, non-turbid water; and EPA #2, turbid water) were compared, and the results are presented in Fig. 5A and B, respectively. With respect to disinfection, the effects of flocculation can be evaluated by the reduction in genome copy number after treatment (represented with bars), whereas the effects of chlorination are better determined by infectivity decay (represented with dots). Due to the low starting titres of HEV in suspension C for this experiment, the samples were below detection limit for IFA post-treatment; therefore, only data based on genomic equivalent number for HEV was evaluated. The sensitivity of HEV to chlorine was already known to be similar to that of MS2, with Ct values for D99 decay of 0.41 for HEV and 0.3 for MS2 (Girones et al., 2014; Shin and Sobsey, 2008). Consequently, MS2 was used as a surrogate to evaluate infectivity decay after treatment.

The average reduction values are shown in Fig. 5 for the two commercial preparations, WaterMaker™ (WM) and PUR Purifier of Water™ (PUR), for both HEV and MS2. For the low turbidity water matrix (EPA #1, Fig. 5A), HEV virus numbers were quantified using qRT-PCR to evaluate the decay of viral particles, and we observed LRVs for WM = 1.59 (+/−0.57) and for PUR = 0.97 (+/−0.14); for MS2, we found LRVs of WM = 3.06 (+/−0.36) and PUR = 3.39 (+/−0.24). The surrogate virus MS2 was also tested for infectivity using the same EPA#1 samples, yielding LRVs for WM = 3.65 (+/−0.57) and for PUR = 3.1 (+/−0.03). By contrast, in the experiments involving the turbid water matrix (EPA #2, Fig. 5B), we observed the following results. Quantification of HEV particle decay using qRT-PCR revealed LRVs for WM = 1.53 (+/−0.46) and for PUR = 0.84 (+/−0.14). For the MS2 virus, we found LRVs for WM = 1.43 (+/−0.79) and for PUR = 1.26 (+/−0.67). MS2 infectivity assays showed LRVs for WM = 2.36 (+/−1.75) and for PUR = 2.3 (+/−0.46).

Table 1
HEV concentrates obtained from infections.

Virus Suspension	GE/ml	FFU/ml	Specific infectivity[a]
A	8.13E + 05	5.93E + 02	1.37E + 03
B	6.40E + 05	5.58E + 03	1.15E + 02
C	3.74E + 04	2.30E + 01	1.63E + 03

[a] Calculated by dividing mean number of genomes by the mean number of FFU.

Two-way ANOVA analysis were done to evaluate difference in the LRV between methods (PUR and WM) and between viruses (HEV and MS2) and their interaction. To satisfy the requirements of the ANOVA test we evaluate normality of the residues with Shapiro-Wilk test, (EPA #1 p = 0.56; EPA #2 p = 0.82); and the homogeneity of the variances with Bartlett test, (EPA #1 p = 0.69; EPA #2 p = 0.75). The results show that only in EPA #1 water matrices the treatment had a different effect between viruses ($p < 0.005$) with higher LRV for MS2. In EPA #2 matrices there were no statistically difference, between virus (p = 0.71) neither method (p = 0.39). Moreover the statistical analysis indicate that HEV removal was not significantly different between water matrices (p 0.84). Regarding MS2 removal results indicated that MS2 decay was higher in the low-turbidity water, EPA#1 (p 0.048), as free residual chlorine (FRC) was higher after treatment than in the turbid water sample (mean FRC after treatment for EPA#1 = 0.36 mg/l; mean FRC after treatment for EPA#2 = 0.03 mg/l). In summary, both FCS products showed similar effects on inactivation, and both performed better in low-turbidity water matrices.

4. Discussion

To our knowledge, no HEV disinfection studies using UV radiation and FCS have been described to date.

The lack of efficient cell culture models for HEV limits studies on disinfection and stability (Johne, 2016). The replication system used in this study showed a limited efficiency to obtain high titers of HEV-p6-kernow strain by culturing in HepG2/C3A cells, with a significant increase in titer only after 50 days of culture. Moreover, the infectivity assays showed a 3 logarithms inversed correlation with qRT-PCR quantification (Table 1), as described previously (Shukla et al., 2012).

Disinfection treatments are basic for reducing exposure to waterborne pathogens. UV radiation is a widely used in the treatment of both drinking and waste water for its known microbicide effect towards bacteria and protozoa (Hijnen et al., 2006). The studies of viral disinfection by UV light have demonstrated that most single stranded RNA viruses transmitted by water like poliovirus or rotavirus decrease 99.9% with 320 and 300 J/m^2 respectively (Gerba et al., 2002; Li et al., 2009). Regarding the UV disinfection experiments for HEV from this study, kinetic curves were characterized for qRT-PCR and infectivity. The kinetics showed first-order linear relationship at UV dose range of 0–100 J/m^2 (R^2 = 0.98). Experimental data obtained here suggest that a reduction of 99.99% can be achieved for the Hepatitis E Virus using low UV fluences ranging between 195 and 269 J/m^2. These results are consistent with the notion that single-stranded RNA virus are particularly sensitive to

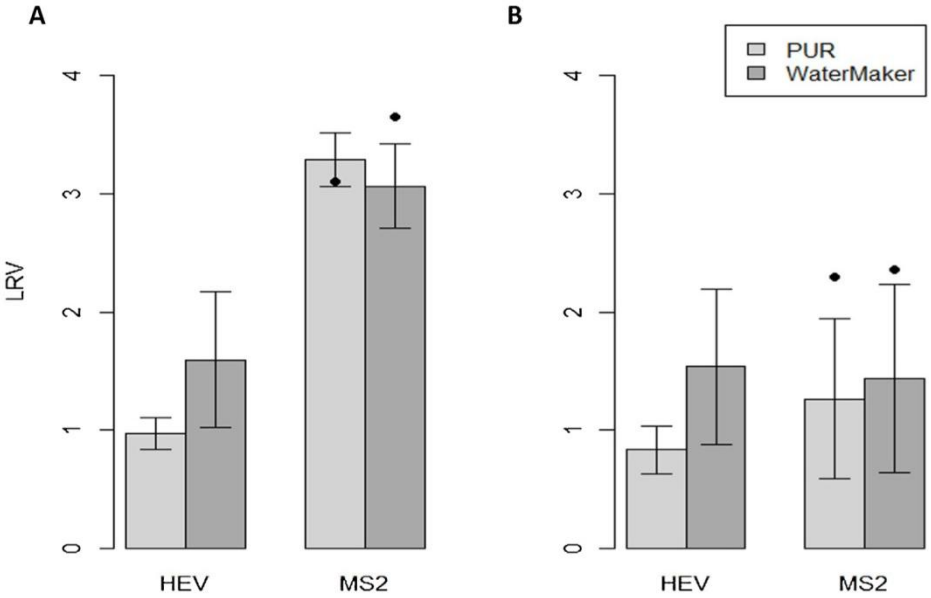


Fig. 5. Reduction of HEV and MS2 in water by FCS. A. Low-turbidity water (EPA#1), and B. Turbid water (EPA#2) after treatment with PUR Purifier of Water™ (light grey) and WaterMaker™ (dark grey). Columns represent the qRT-PCR removal and points indicate the infectivity decay levels.

Table 2
Observed and predicted UV doses for the inactivation of 90–99.99% of HEV based on the infectivity assays.

Virus (genome)	Initial concentration	R2	UV fluence (J/m2)		95% CI
			D90	64.98*	(57.43–72.64)
HEV	5.58E+03 ffu/mL	0.94	D99	120.64	(104.79–136.66)
			D99.9	176.29	(150.09–202.74)
			D99.99	231.94	(195.02–269.18)
			D90	120.89*	(95.69–146.09)
MS2	8.75E+05 cfu/mL	0.87	D99	226.95*	(169.66–284.24)
			D99.9	333.01*	(242.68–423.35)
			D99.99	439.08*	(315.52–562.63)

* Observed data in infectivity experiments.

UV radiation. Therefore, current UV radiation guidelines (400 J/m^2) should represent proper disinfection treatments for reducing risks associated with HEV contamination.

Results on MS2 bacteriophage susceptibility to UV radiation have shown higher resistance compared to HEV with 315.52–562.63 J/m2 for 99.99% inactivation (Table 2). Those results are in agreement with previous studies showing that MS2 bacteriophages are known to be remarkably resistant to UV inactivation as compared to other ssRNA viruses (De Roda Husman et al., 2004; Mamane-Gravetz et al., 2005)

Furthermore, following protocols developed in previous studies (Calgua et al., 2014; Pecson et al., 2011) we show that using the appropriate mathematical model, qRT-PCR data may be used to estimate HEV infectivity in UV treated samples.

On the other hand, the flocculation-chlorination sachets are a novel technology for POU water treatments that has been promoted by international agencies working in humanitarian emergencies. The studies found in the literature regarding their efficiency show great recoveries for bacteria and protozoa (Rodda et al., 1993). However, very diverse results have been found for virus disinfection. Recent studies have demonstrated a LRV of 7.9 for Rotavirus (Souter et al., 2003) whilst another have obtained only 1 LRV for somatic coliphages (McLennan et al., 2009).

The results obtained in this study on FCS efficiency assays indicate that the reductions for HEV are between 0.8 and 1.6 LRV although the observed results are only based on genome decay. The bacteriophage MS2 evaluated for infectivity showed LRVs between 2.3–3.5, whilst 1.2–3.3 LRV were found for genomic quantification (Fig. 5). Those LRVs are below the baseline LRV of 4.5 proposed for viral removal baseline by the WHO guidelines on effectiveness for combination treatment approaches (WHO, 2011).

Consistent with the observed disinfection efficiencies as well as previously described efficiencies for chlorination treatment (Girones et al., 2014), recommendations for water disinfection strategies in HEV risk areas would include as a first option either chlorination or UV radiation, both of which accomplish greater than 99.99% (4 LRV) viral removal. We evaluated two FCSs as rapid water treatment solutions using MS2 infectivity assays, and we found that these products are useful in HEV risk areas, although virus reduction levels did not reach 4 LRV. In light of these findings, an extra chlorination step after FCS treatment should be encouraged to ensure proper inactivation of HEV.

5. Conclusions

Inactivation data obtained for HEV after UV radiation indicate that this emerging pathogen should be inactivated up to 99.99% following a fluence of 231.94 J/m^2 (195.02–269.18), which is below the radiation level already proposed in international guidelines (400 J/m^2). FCS solutions for point-of-use disinfection achieved significant reductions in virus concentration, although the reductions were less than the 4.5 LRV recommended by WHO regulations. Experimental data gathered here for UV disinfection and FCS solutions, combined with our current knowledge of HEV stabil-

ity following chlorine treatment, represent an important body of evidence to create water treatment policies in areas at risk of HEV water contamination. Current chlorination and UV radiation treatment standards should be considered safe protocols for HEV disinfection. However, the use of FCSs as POU solutions will likely require complementary treatments, such as an extra disinfection step, to ensure higher viral reductions.

Acknowledgements

This study is part of Water Disinfection Protocols for Hepatitis E Virus project (WADHE), funded by Humanitarian Innovation Fund Core Grant and Oxfam Intermon.

Bibliography

ÖNORM, 2001. ÖNORM M 5873-1. Plants for the disinfection of water using ultraviolet radiation Requirements and testing Part 1: Low pressure mercury lamp plants.

Boccia, D., Guthmann, J.-P.P., Klovstad, H., Hamid, N., Tatay, M., Ciglenecki, I., Nizou, J.-Y.Y., Nicand, E., Guerin, P.J., 2006. High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. Clin. Infect. Dis. 42, 1679–1684, http://dx.doi.org/10.1086/504322.

Calgua, B., Carratalà, A., Guerrero-Latorre, L., de Abreu Corrêa, A., Kohn, T., Sommer, R., Girones, R., 2014. UVC inactivation of dsDNA and ssRNA viruses in water: UV fluences and a qPCR-based approach to evaluate decay on viral infectivity. Food Environ. Virol., http://dx.doi.org/10.1007/s12560-014-9157-1.

Colindres, R.E., Jain, S., Bowen, A., Mintz, E., Domond, P., 2007. After the flood: an evaluation of in-home drinking water treatment with combined flocculent-disinfectant following Tropical Storm Jeanne—Gonaives, Haiti, 2004. J. Water Health 5, 367–374, http://dx.doi.org/10.2166/wh.2007.032.

DVGW W 294-3: 2006-6. Title (deutsch): UV-Geräte zur Desinfektion in der Wasserversorgung — Teil 3: Messfenster und Sensoren zur radiometrischen Überwachung von UV-Desinfektionsgeräten - Anforderungen, Prüfung und Kalibrierung.

De Roda Husman, A.M., Bijkerk, P., Lodder, W., Van Den Berg, H., Pribil, W., Cabaj, A., Gehringer, P., Sommer, R., Duizer, E., 2004. Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer-wavelength [UV]) and ionizing (gamma) radiation. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5089–5093, http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.9.5089-5093.2004.

EPA, 1987. Task Force Report, Guide Standard and Protocol for Testing Microbiological Water Purifiers.

EPA, 2003. EPA 815-D-03-007: Ultraviolet Disinfection Guidance Manual.

Gerba, C.P., Gramos, D.M., Nwachuku, N., 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5167–5169, http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.10.5167-5169.2002.

Girones, R., Carratalà, A., Calgua, B., Calvo, M., Rodriguez-manzano, J., Emerson, S., 2014. Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. J. Water Health, 1–8, http://dx.doi.org/10.2166/wh.2014.027.

Guerrero-Latorre, L., Carratala, A., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Hundesa, A., Girones, R., 2011. Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. J. Water Health 9, 515–524, http://dx.doi.org/10.2166/wh.2011.126.

Guthmann, J.-P.P., Klovstad, H., Boccia, D., Hamid, N., Pinoges, L., Nizou, J.-Y.Y., Tatay, M., Diaz, F., Moren, A., Grais, R.F., Ciglenecki, I., Nicand, E., Guerin, P.J., 2006. A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. Clin. Infect. Dis. 42, 1685–1691, http://dx.doi.org/10.1086/504321.

Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. Water Res. 40, 3–22, http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.030.

Howard, C.M., Handzel, T., Hill, V.R., Grytdal, S.P., Blanton, C., Kamili, S., Drobeniuc, J., Hu, D., Teshale, E., 2010. Novel risk factors associated with hepatitis E virus infection in a large outbreak in northern Uganda: results from a case–control study and environmental analysis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 83, 1170–1173, http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0384.

ISO 10705-1:1995. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Last revision 2012.

Johne, R., 2016. Detection Methods for HEV in Food. FSA-EFSA Worshop on FBV, London, pp. 22.

Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-pCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. J. Virol. Methods 131, 65–71, http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004.

Kamar, N., Bendall, R.P., Peron, J.M., Cintas, P., Prudhomme, L., Mansuy, J.M., Rostaing, L., Keane, F., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H.R., 2011. Hepatitis E virus and neurologic disorders. Emerging Infect. Dis. 17, 173–179, http://dx.doi.org/10.3201/eid1702.100856.

Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.-S., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H.R., 2012. Hepatitis E. Lancet 379, 2477–2488, http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61849-7.

Kamar, N., Dalton, H.R., Abravanel, F., Izopet, J., 2014. Hepatitis E virus infection. Clin. Microbiol. Rev. 27, 116–138, http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00057-13.

Kmush, B.L., Nelson, K.E., Labrique, A.B., 2015. Risk factors for hepatitis E virus infection and disease. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 13, 41–53, http://dx.doi.org/10.1586/14787210.2015.981158.

Li, D., Gu, A.Z., He, M., Shi, H.-C., Yang, W., 2009. UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. Water Res. 43, 3261–3269, http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.044.

Mamane-Gravetz, H., Linden, K.G., Cabaj, A., Sommer, R., 2005. Spectral sensitivity of *Bacillus subtilis* spores and MS2 coliphage for validation testing of ultraviolet reactors for water disinfection. Environ. Sci. Technol. 39, 7845–7852.

Mayer, B.K., Yang, Y., Gerrity, D.W., Abbaszadegan, M., 2015. The impact of capsid proteins on virus removal and inactivation during water treatment processes. Microbiol. Insights 8, 15–28, http://dx.doi.org/10.4137/MBI.S31441.

McLennan, S.D., Peterson, L. a., Rose, J.B., 2009. Comparison of point-of-use technologies for emergency disinfection of sewage-contaminated drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7283–7286, http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00968-09.

Meng, Q.S., Gerba, C.P., 1996. Comparative inactivation of enteric adenoviruses, poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation. Water Res. 30, 2665–2668, http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00179-0.

Pecson, B.M., Martin, L.V., Kohn, T., 2009. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5544–5554, http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00425-09.

Pecson, B.M., Ackermann, M., Kohn, T., 2011. Framework for using quantitative PCR as a nonculture based method to estimate virus infectivity. Environ. Sci. Technol. 45, 2257–2263, http://dx.doi.org/10.1021/es103488e.

Powers, E.M., Hernandez, C., Boutros, S.N., 1994. Water Purification Tablet Biocidal Efficacy of a Flocculating Emergency Water Purification Tablet 60.

Rodda, N., Bateman, B., Kfir, R., 1993. Removal of salmonella-typhi, shigella-dysenteriae, vibrio-cholerae and rotavirus from water using a water-treatment tablet. Water Sci. Technol. 27, 347–350.

Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. Water Res. 42, 4562–4568, http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.001.

Shukla, P., Nguyen, H.T., Faulk, K., Mather, K., Torian, U., Engle, R.E., Emerson, S.U., 2012. Adaptation of a genotype 3hepatitis E virus to efficient growth in cell culture depends on an inserted human gene segment acquired by recombination. J. Virol. 86, 5697–5707, http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00146-12.

Souter, P.F.P., Cruickshank, G.D., Tankerville, M.Z., Keswick, B.H., Ellis, B.D., Langworthy, D.E., a, Metz K., Appleby, M.R., Hamilton, N., Jones, A.L., Perry, J.D., 2003. Evaluation of a new water treatment for point-of-use household applications to remove microorganisms and arsenic from drinking water. J. Water Health 1, 73–84.

UNHCR, 2014. UNHCR Steps up Measures to Rein in Hepatitis E Among South Sudanese Refugees in Ethiopia [WWW Document] (accessed 8.12.14) URL http://www.unhcr.org/53e4a6379.html.

WHO, 2011. Evaluating Household Water Treatment Options: Health-based Targets and Microbiological Performance Specifications. WHO Libr. Cat. Data.

WHO, 2014. Waterborne Outbreaks of Hepatitis E: Recognition, Investigation and Control, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World Health Organization.

Discussió

5. Discussió

Les malalties atribuïdes a la mala qualitat de l'aigua, la falta d'higiene i sanejament són una de les majors causes de morbiditat i mortalitat en els nens/es menors de cinc anys en els països de baixa i mitjana renta, on causen més morts de nens/es que el VIH, la malària i el xarampió conjuntament (Black et al., 2010). Els virus entèrics són els principals agents etiològics de diarrea i hepatitis agudes, sent la principal causa d'aquestes malalties en països de baixa renta (Huilan et al., 1991; Kotloff et al., 2013). Per mitigar aquest impacte en salut les intervencions WASH tenen un paper clau, ja que segons estudis epidemiològics, redueixen en un 15-50% la incidència de malalties transmeses per l'aigua en països on el nivell de sanejament és baix (Clasen et al., 2015a; Fewtrell et al., 2005; Wolf et al., 2014). Tot i així, organitzacions internacionals han reconegut la falta de tecnologies adaptades i la falta d'evidència científica en contextos d'ajuda humanitària per desenvolupar polítiques de prevenció i contingència en aquests particulars escenaris (Bastable and Russell, 2013).

En aquesta tesi doctoral s'ha treballat en dues àrees de la virologia ambiental enfocades a l'ajuda humanitària. D'una banda, estudis ambientals amb l'anàlisi de la contaminació de virus entèrics en situacions de crisi humanitària: dins del context urbà post-terratrèmol a Port-au-Prince, Haití, i en camps de refugiats en context rural al Sudan del Sud durant una epidèmia causada pel VHE. D'altra banda, s'ha treballat en estudis de desinfecció d'aigua a nivell domiciliar, desenvolupant un nou prototip de Filtres d'Aigua Ceràmics per reduir els virus contaminants en aigua de beguda i en processos de desinfecció de l'aigua amb la descripció de cinètiques de desinfecció del Virus de l'Hepatitis E estudiant tractaments amb radiació ultraviolada i sobres de floculació-cloració.

Disseminació de virus en les aigües de la zona metropolitana de Port-au-Prince, Haití

Haití té els nivells de sanejament i accés a l'aigua potable més baixos de l'hemisferi nord amb un 28% de la població amb accés a infraestructures de sanejament i un 58% amb accés a fonts d'aigua millorades (WHO and UNICEF, 2014). A la falta de programes nacionals per oferir accés als serveis bàsics d'aprovisionament d'aigua i sanejament, se li va sumar l'efecte agreujant del devastador terratrèmol l'any 2010 que va malmetre les ja limitades infraestructures existents (Gelting et al., 2013).

En el primer capítol s'ha analitzat per primera vegada la presència de virus entèrics en les aigües urbanes de la capital d'Haití. El treball de mostreig i concentració durant l'estiu del 2011 es va realitzar amb l'equip de la Universitat de Quisqueya, gràcies als fons d'un projecte de cooperació interuniversitari de la UB. Els resultats obtinguts en les mostres d'aigua de canal,

riu i pou recollides al Juliol 2011 a l'àrea metropolitana de Port-au-Prince, mostren alts nivells de contaminació fecal humana. Els resultats obtinguts en les aigües de canal pels indicadors virals d'origen humà (HAdV i JCPyV) tenen valors similars als que trobem en aigües residuals urbanes amb concentracions de 10^5 i 10^3 CG/L respectivament (Bofill-Mas et al., 2006). Les aigües de riu analitzades mostraven una càrrega de contaminació fecal amb nivells de HAdV al voltant de 10^3 CG/L, que reflecteixen la falta de sistemes de tractament d'aigua residual a la ciutat. La mostra d'aigua d'un pou públic al barri de Tabarre, que és utilitzat pel consum, situat al peu dels turons que envolten la ciutat, va presentar concentracions molt elevades de contaminació fecal humana amb nivells de 10^5 CG/L per HAdV i de 10^2 CG/L per JCPyV. Aquesta contaminació podria ser deguda a la mala protecció del pou i la infiltració subterrània de foses sèptiques descrita anteriorment a la ciutat (Emmanuel et al., 2009), segurament incrementada després del terratrèmol del 2010. A més, l'anàlisi de virus patògens en aquestes matrius van revelar la presència de Norovirus Genogrup I i II a les aigües de canal i de riu, i d'adenovirus tipus 40 i 41, importants agents de gastroenteritis infantils. Estudis posteriors han mostrat, en concordança amb les dades de contaminació ambiental, l'alta prevalença de diarrees virals en infants a Haití (Charles et al., 2014).

Nou model de Filtres d'aigua ceràmics millorats per la desinfecció de virus entèrics per Haití

Aquest primer capítol de la tesi inclou, per altra banda, el desenvolupament d'un nou prototip de Filtre d'Aigua Ceràmic per millorar la seva capacitat d'eliminar els virus. L'actual model més utilitzat d'aquesta tecnologia de baix cost es produeix localment a desenes de països de baixa renta i redueix 6.5, 4.3 i 1.24 logaritmes per bacteris, protozous i virus respectivament (van Halem, 2006). Pel risc d'exposició a diferents grups de patògens, l'OMS recomana que aquestes tecnologies de desinfecció mostrin reduccions de 2 logaritmes per bacteris, protozous i 3 logaritmes per virus, amb el fi d'assegurar un bon nivell de qualitat microbiològica de l'aigua tractada (WHO, 2011b).

L'estudi parteix del treball de Brown & Sobsey 2009 en el que ceràmiques modificades amb òxids minerals electropositius mostraven una alta capacitat d'absorbir virus en suspensió. En aquest treball el procediment experimental consistia a barrejar en aigua les argiles modificades en pols amb concentrats de bacteriòfags MS2 i phiX-174. Després de 30 minuts d'agitació se centrifugava i s'analitzava el contingut de virus al sobrenedant. Les argiles modificades amb Fe_2O_3 i Al_2O_3 absorbien 4.6 i 1.9 logaritmes per MS2 respectivament.

Amb aquests antecedents previs, vam voler utilitzar els compostos òxids que havien mostrat altes adsorcions en suspensió i avaluar-los barrejats amb argila per produir filtres d'aigua ceràmics.

Més d'un centenar de prototips a escala 1:2.5 van ser desenvolupats al taller d'en Josep Mates a Fonteta (Catalunya) amb diferents proporcions d'argila:matèria orgànica, diferents quantitats d'òxids afegits a la base d'una argila local i argiles haitianes amb diferents estils de cocció (atmosfera oxidant i reductora). L'anàlisi fisicoquímic de les peces realitzat per l'equip del Departament de Cristal·lografia de la UB van revelar com les ceràmiques cuites amb atmosfera reductora (anomenada ceràmica negra) tenien incrementada 3 vegades la superfície especifica respecte a la mateixa barreja cuita amb atmosfera oxidant, i a més, mitjançant estudis de potencial Z es va identificar una petita fracció electropositiva, prèviament observada en aquest tipus de ceràmica a la literatura (Wegmann et al., 2008). Els prototips de filtre d'aigua ceràmic van ser avaluats per filtració d'aigua artificial dopada amb *E. coli*, bacteriòfag MS2, HAdV2 i puntualment NoV. Els filtres control produïts per l'estudi com a models de referència, fets amb argila local sense plata col·loïdal i cuits en atmosfera oxidant, presentaven reduccions de 0.57 per virus i 0.68 per bacteris, valors molt semblants a altres prèviament publicats (van der Laan et al., 2014).

Els prototips en els quals s'hi havia afegit hematita (Fe_2O_3), magnetita (Fe_3O_4) o alúmina (Al_2O_3) no van mostrar diferencies significatives en reducció de virus respecte als filtres control, sent totes reduccions inferiors a un logaritme. Per altra banda, els prototips que havien estat cuits en atmosfera reductora, produïts amb argiles d'orígens diferents (Catalunya i Haití) presentaven reduccions de 3.25, 3.56 i 2.19 logaritmes per HAdV, NoV i MS2 respectivament. Aquesta important reducció de virus pot ser deguda a l'increment de superfície especifica o a l'augment d'electropositivitat obtingut amb aquest tipus de cocció.

D'altra banda, es va avaluar, com a alternativa a la plata col·loïdal, l'efecte desinfectant d'una capa de grava ceràmica afegida a la base del filtre per incrementar la superfície de contacte. Els prototips amb la capa de grava aconseguien 2.9 logaritmes de reducció d'E. coli, valors inferiors als descrits amb plata col·loïdal però suficients per ser protectors segons els requisits de l' OMS.

Per completar l'estudi, es van produir prototips de filtres a escala real amb argila cuita en atmosfera reductora i amb una capa de 5 cm de grava. Els prototips a escala 1:1 seleccionats van ser monitoritzats durant més de 1000 litres d'aigua filtrada seguint les recomanacions de l'OMS per avaluar aquest tipus de tecnologies (WHO, 2011b). Durant el seguiment de llarga durada, els valors de reducció logarítmica van oscil·lar entre 2.5 i 4 per HAdV i MS2 i entre 1,5 i 4 per *E. coli*.

Aquest nou prototip de Filtre d'Aigua Ceràmic a base de ceràmica negra i capa de grava aconsegueix complir amb els requeriments de tecnologies protectores establerts per l'OMS sense incrementar el cost del producte i sent fàcilment aplicable a fàbriques ja existents d'aquesta tecnologia.

L'objectiu del projecte inicial amb el suport de Oxfam Intermon, era implementar en una darrera fase la producció dels filtres millorats a Haití (Artibonite) i avaluar el seu impacte en la salut. Tot i que no va arribar a implementar-se la producció a Haití, s'estudien altres contexts on podria dur-se a terme en un futur.

Transmissió de virus entèrics en camps de refugiats del Sudan del Sud

La circulació del Virus de l'Hepatitis E al Sudan ha estat documentada des dels anys 80 per diversos estudis (Boccia et al., 2006; Hyams et al., 1992; McCarthy et al., 1994; Rayis et al., 2013). Els diversos conflictes polítics del país han mobilitzat forçosament milions de sudanesos a països veïns per refugiar-se del conflicte. Aquesta població refugiada en camps d'alta densitat i baixes condicions sanitàries han donat lloc a brots causats pel VHE a camps de refugiats del Txad, Etiòpia, RCA i Uganda (Browne et al., 2015; Escriba et al., 2008; Nicand et al., 2005; E H Teshale et al., 2010). Després de la independència de Sudan del Sud l'any 2011, els conflictes per la demarcació de frontera i els pous de petroli presents a la zona, han estat assetjant a la població propera a la frontera amb Sudan i han causat un flux migratori de 250.000 persones que es van establir als inicis del 2012 en diversos camps de refugiats a la regió nord del Sudan del Sud (UNHCR, 2015b).

L'estudi del segon capítol de la tesi, té com a escenari l'epidèmia causada pel VHE als camps de refugiats del Sudan del Sud que va iniciar-se al Juny del 2012 i es va perllongar fins a finals de 2013. La doctoranda va viatjar a l'abril del 2013 als camps de Batil i Jamam per realitzar un mostreig de diferents matrius d'aigua i aliments per intentar determinar les diferents vies de transmissió dels virus entèrics, analitzant HAdV i VHE.

Segons les dades recollides per MSF-Holanda a les clíniques dels camps, l'increment de pacients que reportaven hepatitis aguda s'inicia a l'Agost 2012, amb un augment d'incidència, especialment al camp de Batil fins a arribar a atendre un màxim de 500 pacients/setmana al mes de Gener 2013. Des d'aleshores el nombre de casos va anar disminuint significativament i en el moment de la nostra visita per realitzar el mostreig ambiental el nombre de casos era 50-70 pacients/setmana.

En el moment del brot causat pel VHE, l'aprovisionament d'aigua i sanejament dels camps era gestionat per ONGs: MSF al camp de Batil i Oxfam al camp de Jamam. Els sistemes de distribució d'aigua al camp de Batil consistien en 15 pous (9 de bombeig motor i 6 de bombeig manual) en els que es tractava l'aigua per cloració al punt de recollida per personal tècnic. En el camp de Jamam hi havia 2 pous principals que eren canalitzats a estacions de tractament i l'aigua clorada es distribuïa a diferents fonts repartides per tot el camp. A més, en ambdós camps, existien basses d'aigua de pluja gairebé buides que s'utilitzaven per al bestiar i la neteja.

Durant la campanya de mostreig que va tenir lloc en l'època seca, es van recollir mostres dels camps de Batil i Jamam d'aigua subterrània, superficial, a més d'aigua emmagatzemada en recipients domèstics per famílies que haguessin reportat més d'un cas d'hepatitis en el darrer mes. En afegit, mostres d'aliments manipulats en els domicilis estudiats van ser recollides per l'anàlisi de virus. Les mostres d'aigua es van concentrar a terreny pel mètode de filtració amb llana de vidre i posteriorment, concentrats i aliments van ser analitzats al nostre laboratori.

El Virus de l'Hepatitis E no va ser detectat en cap mostra d'aigua ni aliments d'ambos camps. Els motius que poden explicar l'absència del VHE en mostres ambientals són per una part epidemiològics, i per l'altre ambientals. Considerant que el període d'incubació entre la ingestió del VHE i l'aparició de signes clínics és de 4 a 9 setmanes, i que la incidència reportada durant el període del mostreig i les setmanes posteriors era decreixent, podem assumir que el VHE ja no circulava en l'ambient de manera important. D'altra banda, a la regió d'estudi hi ha una estacionalitat climàtica molt marcada entre l'època de pluges (Juny - Setembre) i l'època seca (Desembre - Abril). Així doncs, el clima que hi havia durant del període de mostreig era de sequera extrema, sense precipitacions des de feia 8 mesos amb temperatures diürnes superiors als 50 °C. En aquestes condicions de temperatura, estudis previs han mostrat la reducció en infectivitat del VHE (Emerson et al., 2005).

Simultàniament a l'anàlisi del VHE vàrem estudiar també la presència d'adenovirus. Els adenovirus humans analitzats com indicadors de contaminació fecal humana no van ser detectats a cap mostra d'aigua subterrània probablement pel bon estat dels pous i la baixa filtració i escorrentia que hi havia en aquest període de sequera. En les mostres d'aigua superficials tampoc es van detectar indicadors fecals de contaminació humana, resultats que podrien explicar-se per les altes temperatures i alt nivell d'irradiació solar.
Tot i no trobar indicadors de contaminació a les fonts d'aprovisionament d'aigua dels camps, 3 de 4 mostres d'aigua emmagatzemada als domicilis analitzats al camp de Batil, i 2 de 4 al camp

de Jamam van resultar positius per adenovirus humans. A més una mostra d'aliments d'un domicili de Batil va ser també positiva per HAdV. Cap de les mostres d'aigua emmagatzemada tenia clor residual lliure al moment del mostreig. Aquest fet indica que en el transport i emmagatzematge pot haver-hi contaminació fecal humana i per tant, el risc de transmissió de virus per la via fecal-oral en aquests domicilis és important.

Els resultats del nostre estudi concorden amb les troballes d'un estudi epidemiològic realitzat en el mateix escenari on el risc d'adquirir la infecció pel VHE estava incrementat a nivell domiciliar i no es va identificar una distribució focal dels casos (Epicentre, 2012). Així mateix, un estudi epidemiològic durant un important brot causat pel VHE al nord d'Uganda va revelar una forta associació entre conviure amb persones malaltes d'hepatitis i el risc d'adquirir la malaltia (Eyasu H Teshale et al., 2010).

Els tractaments per cloració recomanats per les agències internacionals a concentracions de 0.5 mg/L, han mostrat ser eficients per la inactivació de virus entèrics incloent el VHE (Baxter et al., 2007; Girones et al., 2014), tot i així, en el particular context dels camps del Sudan del Sud afectats per l'epidèmia d'hepatitis E, la cloració en el punt de recollida resultava en concentracions de 0.5-1.5 mg/L, però disminuïa ràpidament a una constant de 5E-03 L/mg/min, observant en la majoria de casos nivells indetectables de clor lliure 10 hores després de la recollida (Ali et al., 2015). Això explica que a nivell domiciliar l'aigua emmagatzemada no presenti nivells protectors de clor lliure.

La presència de virus indicadors de contaminació fecal humana a l'aigua emmagatzemada i als aliments suggereix la necessitat de reforçar les intervencions en els camps per monitoritzar i la qualitat microbiològica de l'aigua i incrementar la promoció de bones pràctiques higièniques per part de la població.

Tot i així, cal considerar que els resultats d'aquest estudi ambiental està fortament condicionat a les condicions climàtiques pròpies del període de sequera i a la baixa incidència de casos reportada aleshores. Els riscos de contaminació fecal de fonts d'aigua i superficial i l'aparició de brots causats pel VHE després de pluges torrencials i inundacions en zones de baix sanejament està descrita en diversos estudis (Goumba et al., 2011; Ippagunta et al., 2007), i per tant s'hauria de reforçar el monitoratge ambiental de marcadors virals de contaminació humana en aquests períodes d'alt risc.

Desinfecció en aigua del Virus de l'Hepatitis E

En el capitol 3, es va estudiar tractaments de desinfecció del VHE dins el projecte *Water Disinfection Protocols for Hepatitis E Virus* (WADHE Project). Es va estudiar l'estabilitat del VHE

a diferents tractaments de desinfecció per tenir evidències experimentals que permetessin plantejar protocols estàndard d'actuació en contexts d'epidèmia. Les organitzacions que treballen en situacions d'emergència humanitària en el sector WASH tenen com a referència protocols propis d'actuació (Oxfam, MSF, UNICEF) o guies tècniques o protocols d'organitzacions internacionals (WHO, The Sphere Project). Abans de la realització d'aquesta tesi, en aquests protocols no s'especificava quines mesures s'haurien d'implementar en situacions d'epidèmia causada pel VHE excepte en el cas de MSF que suggereix el tractament amb radiació UV (MSF, 2010). Aquesta recomanació estava justificada per la sospita de què el VHE era resistent al tractament amb clor fruit de l'estudi cas-cohort realitzat durant l'epidèmia del 2004 a Sudan on hi havia una associació no significativa de consum d'aigua clorada a adquirir la infecció pel VHE (Guthmann et al., 2006). Posteriorment, al nostre laboratori es va descriure per primera vegada la cinètica d'estabilitat del VHE al tractament amb clor mostrant la susceptibilitat a aquest desinfectant químic amb Ct de 0.41 per la reducció de 2 logaritmes (Girones et al., 2014).

En aquesta tesi s'han completat els estudis d'estabilitat del VHE amb la caracterització de les cinètiques d'inactivació per radiació ultraviolada i per sobres de floculació-cloració.

La manca de sistemes de cultiu eficients pel VHE dificulta els estudis de desinfecció d'aquest important patogen (Johne, 2016). En aquesta tesi vam treballar amb la soca Kernow-C1 originària d'un pacient crònic de la infecció causada pel genogrup 3 del VHE. Aquesta soca ha mostrat una capacitat de replicació incrementada amb la línia cel·lular HepG2/C3A (derivada de hepatoma humà) a causa de la inserció d'un gen ribosòmic en la ORF1 (Shukla et al., 2012). Tot i així la seva capacitat de produir suspensions virals d'alta concentració era limitada, tant en els experiments d'infecció comen els de transfecció per electroporació d'ARN obtingut amb el clon del genoma complet de HEV-kernow-p6. Els resultats dels cultius infectats per produir estocs del VHE obtenien sobrenedants de $\approx 10^4$ CG/mL, observant un increment significatiu de títol només després de 50 dies post-infecció amb un màxim de 10^6 CG/mL.

Desinfecció del VHE amb radiació ultraviolada

La radiació UV és un tractament extensament utilitzat per l'aigua de beguda pel seu conegut efecte desinfectant sobre bacteris i protozous (Hijnen et al., 2006). En aquest estudi es va avaluar l'efecte de la radiació amb radiació ultraviolada sobre el VHE, utilitzant el bacteriòfag MS2 com a control de procés. Per aquest treball vam comptar amb la col·laboració de la Dra. Regina Sommer de la *Medical University Vienna* per realitzar les irradiacions de les suspensions víriques al seu laboratori. La inactivació dels virus va ser analitzada per assajos de qRT-PCR i

per assajos d'infectivitat utilitzant immunofluorescència (IFA). Les cinètiques obtingudes a partir de les dades d'infectivitat van mostrar una tendència lineal per ambdós virus.

El bacteriòfag MS2 ha servit de referència i validació de les dosis de radiació UV aplicades a les suspensions virals, ja que la seva susceptibilitat al tractament per UV ha estat àmpliament descrita reduint 4 logaritmes amb radiacions ≈600 J/m^2 (Calgua et al., 2014; De Roda Husman et al., 2004; Mamane-Gravetz et al., 2005).

Per altra banda, les dades experimentals suggereixen que pel VHE una reducció de 4 logaritmes s'aconsegueix amb radiacions entre 195-269 J/m^2 (IC 95%). Aquests resultats concorden amb la ja coneguda sensibilitat a la radiació UV de virus d'ARN com és el cas de Poliovirus i el Rotavirus que redueixen 3 logaritmes amb radiacions de 320 i 300 J/m^2 respectivament (Gerba et al., 2002; Li et al., 2009). Així doncs, les dosis de radiació UV recomanades pel tractament d'aigua de beguda (400 J/m2) semblarien optimes per reduir el risc associat a la contaminació pel VHE entre altres virus entèrics.

A més, com prèviament s'ha descrit en l'estudi de Pecson et al. 2011, mostrem com utilitzant models matemàtics apropiats, les dades de qRT-PCR poden ser utilitzades per estimar la infectivitat del VHE en mostres tractades per radiació UV. Aquestes aproximacions són molt útils per continuar l'estudi d'estabilitat a llum UV de virus difícilment cultivables com és el cas del VHE i per desenvolupar estudis d'anàlisi de risc a partir de dades de concentració de còpies genòmiques del VHE.

Les dades d'eficiència del tractament d'aigua de beguda amb radiació UV sobre el VHE descrita en aquest estudi, juntament amb l'eficiència de la cloració prèviament publicada (Girones et al., 2014), construeixen una bona base experimental per desenvolupar protocols d'actuació. En zones de risc de transmissió del VHE, les recomanacions pel tractament d'aigua de beguda i per tant per reduir el risc d'exposició, haurien d'incloure com a primera opció la cloració o la radiació UV, ja que han mostrat assolir reduccions superiors als 4 logaritmes.

Desinfecció del VHE amb sobres de floculació-cloració

Les preparacions comercials de floculació-cloració són una tecnologia recentment aplicada en contexts d'ajuda humanitària per tractar l'aigua a nivell domiciliar, especialment pertinent davant d'inundacions on l'aigua disponible és d'alta terbolesa.

Els estudis que trobem a la literatura sobre aquestes preparacions demostren una alta eficiència per eliminar bacteris i protozous (Rodda et al., 1993). No obstant això, els resultats que trobem sobre l'eliminació de virus són molt més diversos. Mentre un estudi demostrava logaritmes de reducció de 6.8 i 7.9 per poliovirus i rotavirus respectivament (Souter et al.,

2003), un altre obtenia només 1 logaritme de reducció per colifags somàtics (McLennan et al., 2009).

L'objectiu d'aquest apartat de la tesi era, per tant, conèixer la susceptibilitat del VHE i el bacteriòfag MS2 a aquest tractament. Es van testar les dues preparacions comercials disponibles al mercat més utilitzades: WaterMaker™ (WM) i PUR Purifier of Water™ (PUR). I els assajos es van realitzar amb aigua de baixa terbolesa (<5 NTU) i amb aigua tèrbola (≈30 NTU) separadament.

Els resultats obtinguts indiquen que no hi ha diferències significatives entre les dues preparacions avaluades (PUR i WM). Les reduccions pel VHE no variaven significativament en les dues matrius d'aigua assajades i oscil·laven entre 0.8 i 1.6 logaritmes, tot i que els resultats observats només es basen en la quantificació genòmica a causa de la baixa concentració de l'estoc utilitzat i la poca sensibilitat dels assajos d'infectivitat (3.74E+04 CG/mL, 2.30E+01 ffu/mL pre-tractament).

El bacteriòfag MS2 va ser estudiat en qualitat de model substitut del VHE pels estudis d'infectivitat. Coneixem la seva mida (27 nm) i punt isoelèctric (3.5), a més de la seva susceptibilitat al clor (Ct 0.3)(Shin and Sobsey, 2008), propietats semblants a les descrites pel VHE i rellevants per tractaments de floculació i cloració. Els resultats obtinguts per aquest bacteriòfag mostren una reducció major després del tractament en els reactors de baixa terbolesa (3.37 LRV infectivitat, 3.22 LRV qRT-PCR) amb més d'un logaritme de diferència respecte a la matriu més tèrbola (2.33 LRV infectivitat, 1.34 LRV qRT-PCR). Aquest fet s'explica probablement per la major concentració de clor residual detectada en aquests reactors de baixa terbolesa al final del tractament.

Tenint en compte els resultats presentats sobre l'eficiència dels sobres de floculació-cloració, podem dir que les reduccions descrites estan per sota el llindar de 4,5 logaritmes de reducció viral proposat per a l'OMS sobre l'eficàcia dels mètodes de tractament combinats (WHO, 2011b). Per tant, en situacions de risc de transmissió del VHE s'hauria de recomanar un tractament addicional després l'utilització dels sobres de floculació-cloració (exposició llum solar o cloració) per garantir la correcta inactivació del VHE.

Com a part del projecte WADHE, i d'acord amb les dades obtingudes sobre l'eficiència dels tractaments de desinfecció per reduir el VHE en aigua, es va elaborar conjuntament amb Oxfam Intermón una guia tècnica sobre les activitats WASH davant una epidèmia causada pel VHE (Annex II: *Technical Brief Hepatitis E Outbreak Response*).

.

Conclusions

6. Conclusions

1) Les aigües superficials i fonts de beguda de l'àrea metropolitana de Port-au-Prince, Haití, després del terratrèmol l'any 2010, presenten altes concentracions de virus transmesos per l'aigua. Es detecten adenovirus i norovirus humans, importants patògens causants de gastroenteritis.

2) Un nou prototip de Filtre d'Aigua Ceràmic cuit en atmosfera reductora, millora l'eficiència d'eliminació de virus fins a 3 logaritmes, en compliment dels requisits de l'OMS per a aquestes tecnologies HWTS sense incrementar el cost del producte.

3) El nou prototip de filtres és eficient amb argiles de diverses regions i es pot implementar en diferents àrees amb una producció sostenible que ajudi la economia local. A més, l'eliminació de plata col·loïdal redueix toxicitat i cost al producte.

4) Els resultats de l'estudi ambiental als camps de refugiats del Sudan del Sud van revelar que, en el període estudiat al final del brot VHE i durant l'època seca, les fonts d'aigua eren negatives, i que les mostres d'aigua i aliments de les llars presentaven contaminació per HAdV, identificant d'una possible ruta de transmissió viral intradomiciliar.

5) El Virus de l'hepatitis E (soca Kernow-C1-p6) replica en la línia cel·lular HepG2/C3A (hepatoma humà) obtenint increment significatiu en el títol només després de 50 dies post-infecció amb un màxim de 10^6 CG/mL.

6) Les dades experimentals obtingudes en els experiments d'inactivació del VHE per radiació UV indiquen que una reducció de 99,99% es pot aconseguir utilitzant radiacions relativament baixes que oscil·len entre 195-269 J/m^2. Aquestes radiacions són inferiors a les normalment utilitzades en els sistemes de tractament per radiació UV (400 J/m^2)

7) Una aproximació a l'eliminació de la viabilitat del virus de l'hepatitis e amb dades de qRT-PCR després del tractament amb radiació UV es pot fer utilitzant el model descrit per Pecson *et al.* 2011 amb el valor del paràmetre *c* = 4.753.

8) Els estudis sobre l'eficiència dels sobres de floculació-cloració indiquen que les reduccions pel VHE són entre 0.8 i 1.6 logaritmes tot i que els resultats observats només es basen en la quantificació genòmica. El bacteriòfag MS2 avaluat per a la infectivitat va mostrar LRV entre 2.3 a 3.5. Aquests nivells d'eliminació viral estan per sota dels suggerits per l'OMS (4.5 LRV) per aquests tipus de HWTS.

9) Els resultats dels estudis presentats donen l'evidència experimental necessària per preparar recomanacions en el tractament d'aigua en àrees susceptibles de tenir brots del virus d'hepatitis E. Aquestes recomanacions estan disponibles en una guia elaborada per a agencies internacionals i són prioritzar l'ús de la cloració i la radiació ultraviolada pels sistemes de proveïment i pel que fa als HWTS, els sobres de floculació-cloració estudiats requeririen un tractament addicional per garantir la correcta inactivació de virus.

Referències

7. Referències

A

Adrian, T., Schäfer, G., Cooney, M.K., Fox, J.P., Wigand, R., **1988**. Persistent enteral infections with adenovirus types 1 and 2 in infants: no evidence of reinfection. Epidemiol. Infect. 101, 503–9.

Aghababian, R. V, Teuscher, J., **1992**. Infectious diseases following major disasters. Ann. Emerg. Med. 21, 362–7.

Ahmad, I., Holla, R.P., Jameel, S., **2011**. Molecular virology of hepatitis E virus. Virus Res. 161, 47–58. doi:10.1016/j.virusres.2011.02.011

Ahmed JA, Moturi E, Spiegel P, Schilperoord M, Burton W, Kassim NH, et al. **2013**. Hepatitis E outbreak, Dadaab Refugee Camp, Kenya, 2012 [letter]. Emerg Infect Dis. doi:10.3201/eid1906.130275.

Ahmed, S., Hall, A., Robinson, A., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U., Koopmans, M., Lopman, B., **2014**. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. Lancet. Infect. Dis. 14, 725–30. doi:10.1016/S1473-3099(14)70767-4

Albetkova, A., Drobeniuc, J., Yashina, T., Musabaev, E., Robertson, B., Nainan, O., Favorov, M., **2007**. Characterization of Hepatitis E Virus From Outbreak and Sporadic Cases in Turkmenistan 1702, 1696–1702. doi:10.1002/jmv

Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J., Courtois, Girones, R., **2009**. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. J Virol Methods. 158, 104–9.

Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calgua, B., Huguet, J.M., Matia, L., Girones, R., **2009**. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. Water Res. 43, 2011–9. doi:10.1016/j.watres.2009.01.025

Albrich, J.M., Hurst, J.K., **1982**. Oxidative inactivation of Escherichia coli by hypochlorous acid. FEBS Lett. 144, 157–161. doi:10.1016/0014-5793(82)80591-7

Ali, S.S.I., Ali, S.S.I., Fesselet, J., **2015**. Effectiveness of emergency water treatment practices in refugee camps in South Sudan. Bulletin of the World Health Organization; 93: 550-558. doi: http://dx.doi.org/10.2471/BLT.14.147645

Allard, A., Kajon, A., Wadell, G., **1994**. Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. J. Med. Virol. 44, 250–7.

Al-Nasrawi, K.K., Al Diwan, J.K., Al-Hadithi, T.S., Saleh, a M., **2010**. Viral hepatitis E outbreak in Al-Sadr city, Baghdad, Iraq. East. Mediterr. Health J. 16, 1128–32.

Anthony, S.J., St Leger, J.A., Liang, E., Hicks, A.L., Sanchez-Leon, M.D., Jain, K., Lefkowitch, J.H., Navarrete-Macias, I., Knowles, N., Goldstein, T., et al., **2015**. Discovery of a Novel Hepatovirus (Phopivirus of Seals) Related to Human Hepatitis A Virus. MBio 6. doi:10.1128/mBio.01180-15

Arankalle, V. a, Chadha, M.S., Tsarev, S.A., Emerson, S.U., Risbud, a R., Banerjee, K., Purcell, R.H., **1994**. Seroepidemiology of water-borne hepatitis in India and evidence for a third enterically-transmitted hepatitis agent. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 3428–32. doi:10.1073/pnas.91.8.3428

Ashbolt, N., Grabow, W., Snozzi, M., **2001**. Indicators of microbial water quality, in: Fewtrell, L., Bartram, J. (Eds.), Water Quality: Guidelines, Standards and Health. IWA Publishing, London, UK, UK.

Atmar, R.L., Estes, M.K., **2001**. Diagnosis of noncultivatable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. Clin. Microbiol. Rev. 14, 15–37. doi:10.1128/CMR.14.1.15-37.2001

AWPRC, **1991**. Bacteriophages as model viruses in water quality controlag. Water Res. 25, 529–545. doi:10.1016/0043-1354(91)90126-B

Aye, T.T., Uchida, T., Ma, X.Z., Iida, F., Shikata, T., Zhuang, H., Win, K.M., **1992**. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. Nucleic Acids Res. 20, 3512.

Ayukekbong, J.A., Mesumbe, H.N., Oyero, O.G., Lindh, M., Bergström, T., **2015**. Role of noroviruses as aetiological agents of diarrhoea in developing countries. J. Gen. Virol. 96, 1983–99. doi:10.1099/vir.0.000194

B

Badgley, B.D., Thomas, F.I.M., Harwood, V.J., **2011**. Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. Environ. Microbiol. 13, 932–42. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02397.x

Bain, R., Cronk, R., Hossain, R., Bonjour, S., Onda, K., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., Hunter, P., et al., **2014a**. Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. Trop. Med. Int. Health 19, 917–27. doi:10.1111/tmi.12334

Bain, R., Cronk, R., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., Bartram, J., **2014b**. Fecal Contamination of Drinking-Water in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS Med. 11, e1001644. doi:10.1371/journal.pmed.1001644

Baqir, M., Sobani, Z.A., Bhamani, A., Bham, N.S., Abid, S., Farook, J., Beg, M.A., **2012**. Infectious diseases in the aftermath of monsoon flooding in Pakistan. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2, 76–9. doi:10.1016/S2221-1691(11)60194-9

Barrette, W.C., **1989**. General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. Biochemistry 28, 9172 – 8.

Bastable, A., Russell, L., **2013**. Gap Analysis in Emergency Water, Sanitation and Hygiene Promotion.

Battigelli, D.A., Sobsey, M.D., Lobe, D.C., **1993**. The Inactivation of Hepatitis a Virus and other Model Viruses by UV Irradiation. Water Sci. Technol. 27, 339–342.

Baxter, C.S., Hofmann, R., Templeton, M.R., Brown, M., Andrews, R.C., **2007**. Inactivation of Adenovirus Types 2, 5, and 41 in Drinking Water by UV Light, Free Chlorine, and Monochloramine. J. Environ. Eng. 133, 95–103. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2007)133:1(95)

Berto, A., Grierson, S., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R.G., Pavio, N., Van der Poel, W.H.M., Banks, M., **2013**. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. Emerg. Infect. Dis. 19, 264–6. doi:10.3201/eid1902.121255

Bidawid, S., Farber, J.M., Sattar, S.A., Hayward, S., **2000**. Heat inactivation of hepatitis A virus in dairy foods. J. Food Prot. 63, 522–8.

Bielefeldt, A.R., Kowalski, K., Summers, R.S., **2009**. Bacterial treatment effectiveness of point-of-use ceramic water filters. Water Res. 43, 3559–65. doi:10.1016/j.watres.2009.04.047

Bile, K., Isse, A., Mohamud, O., Allebeck, P., Nilsson, L., Norder, H., Mushahwar, I.K., Magnius, L.O., **1994**. Contrasting roles of rivers and wells as sources of drinking water on attack and fatality rates in a hepatitis E epidemic in Somalia. Am J Trop Med Hyg 51, 466–74.

Bitton, G., **2005**. Wastewater Microbiology, 3rd ed. Wiley Online Library.

Black, R.E., Cousens, S., Johnson, H.L., Lawn, J.E., Rudan, I., Bassani, D.G., Jha, P., Campbell, H., Walker, C.F., Cibulskis, R., et al., **2010**. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. Lancet 375, 1969–87. doi:10.1016/S0140-6736(10)60549-1

Bloem, S.C., Halem, D., van Sampson, M.L., Huoy, L., Heijman, S.G.J., **2009**. Silver impregnated ceramic pot filter: In:, flow rate versus the removal efficiency of pathogens., in: Proceedings of the International Ceramic Pot Filter. WEF Disinfection Conference, Atlanta.

Boccia, D., Guthmann, J.-P.P., Klovstad, H., Hamid, N., Tatay, M., Ciglenecki, I., Nizou, J.-Y.Y., Nicand, E., Guerin, P.J., **2006**. High mortality associated with an outbreak of hepatitis E among displaced persons in Darfur, Sudan. Clin. Infect. Dis. 42, 1679–84. doi:10.1086/504322

Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., Girones, R., **2006**. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7894–6. doi:10.1128/AEM.00965-06

Bofill-Mas, S., Pina, S., Girones, R., **2000**. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. Appl. Environ. Microbiol. 66, 238–245.

Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., Girones, R., **2013**. Quantification of Human and Animal Viruses to Environmental Samples. Biomed Res. Int. 2013.

Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fraile, J., Garrido, T., Munné, A., Girones, R., **2016**. Specific Viruses Present in Polluted Groundwater Are Indicative of the Source of Nitrates and Faecal Contamination in Agricultural Areas, in: Barceló, D., Kostianoy, A. (Eds.), Experiences from Ground, Coastal and Transitional Water Quality Monitoring. Springer, Switzerland, pp. 1–24.

Boyle, M., Sichel, C., Fernandez-Ibanez, P., Arias-Quiroz, G.B., Iriarte-Puna, M., Mercado, A., Ubomba-Jaswa, E., McGuigan, K.G., **2008**. Bactericidal Effect of Solar Water Disinfection under Real Sunlight Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2997–3001. doi:10.1128/AEM.02415-07

Brown, J., Sobsey, M.D., **2010**. Microbiological effectiveness of locally produced ceramic filters for drinking water treatment in Cambodia. J. Water Health 8, 1–10. doi:10.2166/wh.2009.007

Brown, J., Sobsey, M.D., **2009**. Ceramic media amended with metal oxide for the capture of viruses in drinking water. Environ. Technol. 30, 379–391. doi:10.1080/09593330902753461

Browne, L.B., Menkir, Z., Kahi, V., Maina, G., Asnakew, S., Tubman, M., Elyas, H.Z., Nigatu, A., Dak, D., Maung, U.A., et al., **2015**. Notes from the field: hepatitis E outbreak among refugees from South Sudan - Gambella, Ethiopia, April 2014-January 2015. MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 64, 537.

Butler, R.C., Lund, V., Carlson, D.A., **1987**. Susceptibility of Campylobacter jejuni and Yersinia enterocolitica to UV radiation. Appl. Environ. Microbiol. 53, 375–8.

Byappanahalli, M.N., Shively, D.A., Nevers, M.B., Sadowsky, M.J., Whitman, R.L., **2003**. Growth and survival of Escherichia coli and enterococci populations in the macro-alga Cladophora (Chlorophyta). FEMS Microbiol. Ecol. 46, 203–11. doi:10.1016/S0168-6496(03)00214-9

Byskov, J., Wouters, J., Sathekge, T., Swanepoel, R., **1989**. An outbreak of suspected water-borne epidemic non-A non-B hepatitis in northern Botswana with a high prevalence of hepatitis B carriers and hepatitis delta markers among patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 83, 110–6.

C

Calgua, B., Carratalà, A., Guerrero-Latorre, L., de Abreu Corrêa, A., Kohn, T., Sommer, R., Girones, R., **2014**. UVC Inactivation of dsDNA and ssRNA Viruses in Water: UV Fluences and a qPCR-Based Approach to Evaluate Decay on Viral Infectivity. Food Environ. Virol. doi:10.1007/s12560-014-9157-1

Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, a P., López-Pila, J.M., Girones, R., **2008**. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. J. Virol. Methods 153, 79–83. doi:10.1016/j.jviromet.2008.08.003

Calgua, B., Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Suñen, E., Calvo, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., **2013**. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. J. Virol. Methods 187, 215–21. doi:10.1016/j.jviromet.2012.10.012

Carratalà, A., Rusinol, M., Hundesa, A., Biarnes, M., Rodriguez-Manzano, J., Vantarakis, A., Kern, A., Suñen, E., Girones, R., Bofill-Mas, S., **2012**. A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 78, 7496–9. doi:10.1128/AEM.01283-12

Carter, M.J., **2005**. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. J. Appl. Microbiol. 98, 1354–80. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02635.x

CDC, **2013**. Investigation of Hepatitis E Outbreak Among Refugees — Upper Nile, South Sudan, 2012-2013. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 62, 2006–2013.

Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Canals, O., Salvadó, H., Araujo, R.M., **2014**. Effect of thermal treatment on free-living amoeba inactivation. J. Appl. Microbiol. 116, 728–36. doi:10.1111/jam.12379

Cervero-Aragó, S., Sommer, R., Araujo, R.M., **2014**. Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free Legionella and Legionella associated with its amoebae hosts. Water Res. 67, 299–309. doi:10.1016/j.watres.2014.09.023

Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M., Jameel, S., **2008**. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. J. Biosci. 33, 451–64.

Charles, M., Delva, G.G., Boutin, J., Severe, K., Peck, M., Mabou, M.M., Wright, P.F., Pape, J.W., **2014**. Importance of cholera and other etiologies of acute diarrhea in post-earthquake Port-au-Prince, Haiti. Am. J. Trop. Med. Hyg. 90, 511–7. doi:10.4269/ajtmh.13-0514

Cheremisinoff, N.P., **2002**. Handbook of water and wastewater treatment technologies. Butterworth-Heinemann, 576 pp.

Chiller, T., Mendoza, C., Lopez, M., Alvarez, M., Hoekstra, R., Keswick, B., Luby, S., **2006**. Reducing diarrhoea in Guatemalan children: randomized controlled trial of flocculant disinfectant for drinking-water. Bull World Heal. Organ 84, 28–35.

Clancy, J.J.L., Bukhari, Z., Hargy, M.M.T., Bolton, J.J.R., Dussert, B.B.W., Marshall, M.M.M., **2000**. Using UV to inactivate Cryptosporidium. J. AWWA 92, 92:9:97.

Clasen, T., Alexander, K.T., Sinclair, D., Boisson, S., Peletz, R., Chang, H.H., Majorin, F., Cairncross, S., **2015**. Interventions to improve water quality for preventing diarrhoea. Cochrane database Syst. Rev. 10, CD004794. doi:10.1002/14651858.CD004794.pub3

Clasen, T., Edmondson, P., **2006**. Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. Int. J. Hyg. Environ. Health 209, 173–81. doi:10.1016/j.ijheh.2005.11.004

Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., MartIn, M., Bofill-Mas, S., Girones, R., **2003**. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. Emerg. Infect. Dis. 9, 448–54. doi:10.3201/eid0904.020351

Colindres, R.E., Jain, S., Bowen, A., Mintz, E., Domond, P., **2007**. After the flood: an evaluation of in-home drinking water treatment with combined flocculent-disinfectant following Tropical Storm Jeanne -- Gonaives, Haiti, 2004. J. Water Health 5, 367–74. doi:10.2166/wh.2007.032

Columpsi, P., Sacchi, P., Zuccaro, V., Cima, S., Sarda, C., Mariani, M., Gori, A., Bruno, R., **2016**. Beyond the gut bacterial microbiota: The gut virome. J. Med. Virol. doi:10.1002/jmv.24508

Corwin, A., Jarot, K., Lubis, I., Nasution, K., Suparmawo, S., Sumardiati, A., Widodo, S., Nazir, S., Orndorff, G., Choi, Y., **1995**. Two years' investigation of epidemic hepatitis E virus transmission in West Kalimantan (Borneo), Indonesia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 89, 262–5.

Corwin, A.L., Tien, N.T., Bounlu, K., Winarno, J., Putri, M.P., Laras, K., Larasati, R.P., Sukri, N., Endy, T., Sulaiman, H.A., et al., **1999**. The unique riverine ecology of hepatitis E virus transmission in South-East Asia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 93, 255–60.

Coursaget, P., Buisson, Y., Enogat, N., Bercion, R., Baudet, J.M., Delmaire, P., Prigent, D., Desramé, J., Desrame, J., **1998**. Outbreak of enterically-transmitted hepatitis due to hepatitis A and hepatitis E viruses. J. Hepatol. 28, 745–50. doi:10.1016/S0168-8278(98)80222-5

Cromeans, T.L., Kahler, A.M., Hill, V.R., **2010**. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1028–33. doi:10.1128/AEM.01342-09

Crump, J. a, Otieno, P.O., Slutsker, L., Keswick, B.H., Rosen, D.H., Hoekstra, R.M., Vulule, J.M., Luby, S.P., **2005**. Household based treatment of drinking water with flocculant-disinfectant for

preventing diarrhoea in areas with turbid source water in rural western Kenya: cluster randomised controlled trial. BMJ 331, 478. doi:10.1136/bmj.38512.618681.E0

D

da Silva, A.K., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., **2007**. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7891–7. doi:10.1128/AEM.01428-07

Dalton, H.R., Kamar, N., van Eijk, J.J.J., Mclean, B.N., Cintas, P., Bendall, R.P., Jacobs, B.C., **2015**. Hepatitis E virus and neurological injury. Nat. Rev. Neurol. 12, 77–85. doi:10.1038/nrneurol.2015.234

de Abreu Correa, A., Carratala, A., Barardi, C.R.M., Calvo, M., Girones, R., Bofill-Mas, S., **2012**. Comparative Inactivation of Murine Norovirus, Human Adenovirus, and Human JC Polyomavirus by Chlorine in Seawater. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6450–6457. doi:10.1128/AEM.01059-12

De Roda Husman, A.M., Bijkerk, P., Lodder, W., Van Den Berg, H., Pribil, W., Cabaj, A., Gehringer, P., Sommer, R., Duizer, E., **2004**. Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer-wavelength [UV]) and ionizing (gamma) radiation. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5089–93. doi:10.1128/AEM.70.9.5089-5093.2004

Deborde, M., von Gunten, U., **2008**. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: a critical review. Water Res. 42, 13–51. doi:10.1016/j.watres.2007.07.025

Demetriades, K., Coupland, J.N., McClements, D.J., **1997**. Physical Properties of Whey Protein Stabilized Emulsions as Related to pH and NaCl. J. Food Sci. 62, 342–347. doi:10.1111/j.1365-2621.1997.tb03997.x

Dilawari, J., Singh, K., Chawla, Y., Ramesh, G., Chauhan, A., Bhusnurmath, S., Sharma, T., Sokhey, C., **1994**. Hepatitis E virus: epidemiological, clinical and serological studies of north Indian epidemic. Indian J Gastroenterol. 13, 44–8.

Directiva Europea 98/83/CE, **1998**. Calidad de las aguas destinadas al consumo.

Dong, Y., Kim, J., Lewis, G.D., **2010**. Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. J. Appl. Microbiol. 108, 800–809. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04477.x

Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M., **2004**. Inactivation of caliciviruses. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4538–43. doi:10.1128/AEM.70.8.4538-4543.2004

Dupuy, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Rodier, M.-H., Soreau, S., Héchard, Y., **2014**. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. Int. J. Hyg. Environ. Health 217, 335–9. doi:10.1016/j.ijheh.2013.07.007

DVGW, **2006**. DVGW W 294-3:2006-06: UV-Geräte zur Desinfektion in der Wasserversorgung -.

E

Eisenberg, J.N.S., Trostle, J., Sorensen, R.J.D., Shields, K.F., **2012**. Toward a systems approach to enteric pathogen transmission: from individual independence to community interdependence. Annu. Rev. Public Health 33, 239–57. doi:10.1146/annurev-publhealth-031811-124530

Elliott, M.A., Stauber, C.E., Koksal, F., DiGiano, F.A., Sobsey, M.D., **2008**. Reductions of E. coli, echovirus type 12 and bacteriophages in an intermittently operated household-scale slow sand filter. Water Res. 42, 2662–70. doi:10.1016/j.watres.2008.01.016

Emerson, S.U., Arankalle, V. a, Purcell, R.H., **2005**. Thermal stability of hepatitis E virus. J. Infect. Dis. 192, 930–933. doi:10.1086/432488

Emmanuel, E., Pierre, M.G., Perrodin, Y., **2009**. Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: health risk assessment for drinking water consumers. Environ. Int. 35, 718–26. doi:10.1016/j.envint.2009.01.011

EPA, **2003**. EPA 815-D-03-007: Ultraviolet Disinfection Guidance Manual.

Epicentre, **2012**. Risk factors for Hepatitis E in Yusuf Batil refugee camp , October - November 2012 Maban County , Upper Nile State , South Sudan A case - cohort study.

Escriba, J.M., Nakoune, E., Recio, C., Massamba, P.M., Matsika-Claquin, M.D., Goumba, C., Rose, A.M., Nicand, E., Garcia, E., Leklegban, C., Koffi, B., **2008**. Hepatitis E, Central African Republic. Emerg Infect Dis 14. doi:10.3201/eid1404.070833

F

Fewtrell, L., Kaufmann, R.B., Kay, D., Enanoria, W., Haller, L., Colford, J.M., **2005**. Water, sanitation, and hygiene interventions to reduce diarrhoea in less developed countries: a systematic review and meta-analysis. Lancet. Infect. Dis. 5, 42–52. doi:10.1016/S1473-3099(04)01253-8

Field, K.G., Samadpour, M., **2007**. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. Water Res. 41, 3517–38. doi:10.1016/j.watres.2007.06.056

Fierro, N.A., Realpe, M., Meraz-Medina, T., Roman, S., Panduro, A., **2016**. Hepatitis E virus: An ancient hidden enemy in Latin America. World J. Gastroenterol. 22, 2271–83. doi:10.3748/wjg.v22.i7.2271

Fong, T.-T., Griffin, D.W., Lipp, E.K., **2005**. Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2070–8. doi:10.1128/AEM.71.4.2070-2078.2005

Francy, D.S., Stelzer, E.A., Brady, A.M.G., Huitger, C., Bushon, R.N., Ip, H.S., Ware, M.W., Villegas, E.N., Gallardo, V., Lindquist, H.D.A., **2013**. Comparison of filters for concentrating microbial indicators and pathogens in lake water samples. Appl. Environ. Microbiol. 79, 1342–52. doi:10.1128/AEM.03117-12

G

Gelting, R., Bliss, K., Patrick, M., Lockhart, G., Handzel, T., **2013**. Water, sanitation and hygiene in Haiti: past, present, and future. Am. J. Trop. Med. Hyg. 89, 665–70. doi:10.4269/ajtmh.13-0217

Gerba, C., **1984**. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. Adv Appl Microbiol. 30, 133–68.

Gerba, C.P., Gramos, D.M., Nwachuku, N., **2002**. Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5167–5169. doi:10.1128/AEM.68.10.5167-5169.2002

Gibson, K.E., **2014**. Viral pathogens in water: occurrence, public health impact, and available control strategies. Curr. Opin. Virol. 4, 50–7. doi:10.1016/j.coviro.2013.12.005

Girones, R., Carratalà, A., Calgua, B., Calvo, M., Rodriguez-manzano, J., Emerson, S., **2014**. Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. J. Water Health 1–8. doi:10.2166/wh.2014.027

Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A. de A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S., **2010**. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. Water Res. 44, 4325–39. doi:10.1016/j.watres.2010.06.030

Glass, R.I., **2013**. Beyond discovering the viral agents of acute gastroenteritis. Emerg. Infect. Dis. 19, 1190–1. doi:10.3201/eid1908.130773

Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K., **2009**. Norovirus gastroenteritis. N. Engl. J. Med. 361, 1776–85. doi:10.1056/NEJMra0804575

Goel, S., Bouwer, E.J., **2004**. Factors influencing inactivation of Klebsiella pneumoniae by chlorine and chloramine. Water Res. 38, 301–8. doi:10.1016/j.watres.2003.09.016

Gómez-Doñate, M., Casanovas-Massana, A., Muniesa, M., Blanch, A.R., **2016**. Development of new host-specific Bacteroides qPCRs for the identification of fecal contamination sources in water. Microbiologyopen 5, 83–94. doi:10.1002/mbo3.313

Goumba, A.I.A., Konamna, X., Komas, N.P.N., **2011**. Clinical and epidemiological aspects of a hepatitis E outbreak in Bangui, Central African Republic. BMC Infect Dis 11, 93. doi:10.1186/1471-2334-11-93

Grabow, W.O., Gauss-Müller, V., Prozesky, O.W., Deinhardt, F., **1983**. Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. Appl. Environ. Microbiol. 46, 619–24.

Green K. Y, **2013**. Caliciviridae: the noroviruses., in: Knipe, M., Howley, P. (Eds.), Fields Virology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Pa, USA, pp. 582–608.

Griffith, J.F., Cao, Y., McGee, C.D., Weisberg, S.B., **2009**. Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality. Water Res. 43, 4900–7. doi:10.1016/j.watres.2009.09.017

Griffith, J.F., Weisberg, S.B., McGee, C.D., **2003**. Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. J. Water Health 1, 141–51.

Guerrant, R.L., DeBoer, M.D., Moore, S.R., Scharf, R.J., Lima, A.A.M., **2012**. The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 10, 220–229. doi:10.1038/nrgastro.2012.239

Guerrero-Latorre, L., Carratala, A., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., Hundesa, A., Girones, R., **2011**. Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. J. Water Health 9, 515–24. doi:10.2166/wh.2011.126

Gurley, E.S., Hossain, M.J., Paul, R.C., Sazzad, H.M.S., Islam, M.S., Parveen, S., Faruque, L.I., Husain, M., Ara, K., Jahan, Y., Rahman, M., et al., **2014**. Outbreak of hepatitis E in urban Bangladesh resulting in maternal and perinatal mortality. Clin. Infect. Dis. 59, 658–65. doi:10.1093/cid/ciu383

Guthmann, J.-P.P., Klovstad, H., Boccia, D., Hamid, N., Pinoges, L., Nizou, J.-Y.Y., Tatay, M., Diaz, F., Moren, A., Grais, R.F., et al., **2006**. A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. Clin. Infect. Dis. 42, 1685–1691. doi:10.1086/504321

H

Hakze-van der Honing, R.W., van Coillie, E., Antonis, A.F.G., van der Poel, W.H.M., **2011**. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. PLoS One 6, e22673. doi:10.1371/journal.pone.0022673

Hall, K., Blair Zajdel, M.E., Blair, G.E., **2010**. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. Biochem. J. 431, 321–36. doi:10.1042/BJ20100766

Hamilton, H.D., Jackson, T.F.H.G., **1990**. Efficacy of a small-quantity water treatment method for inactivating Giardia cysts in raw water. Water SA 16, 201–204.

Hamza, I.A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M., **2011**. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 424–36. doi:10.1016/j.ijheh.2011.07.014

Harm, W., **1980**. Biological effects of ultraviolet radiation. United Kingdom: University Press.

Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B., **2005**. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3163–70. doi:10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005

Hatakeyama, N., Suzuki, N., Yamamoto, M., Kuroiwa, Y., Hori, T., Mizue, N., Tsutsumi, H., **2006**. Detection of BK virus and adenovirus in the urine from children after allogeneic stem cell transplantation. Pediatr. Infect. Dis. J. 25, 84–5.

Hazam, R.K., Singla, R., Kishore, J., Singh, S., Gupta, R.K., Kar, P., **2010**. Surveillance of hepatitis E virus in sewage and drinking water in a resettlement colony of Delhi: what has been the experience? Arch. Virol. 155, 1227–33. doi:10.1007/s00705-010-0707-z

Heaselgrave, W., Kilvington, S., **2011**. The efficacy of simulated solar disinfection (SODIS) against Ascaris, Giardia, Acanthamoeba, Naegleria, Entamoeba and Cryptosporidium. Acta Trop. 119, 138–43. doi:10.1016/j.actatropica.2011.05.004

Heijne, J.C.M., Teunis, P., Morroy, G., Wijkmans, C., Oostveen, S., Duizer, E., Kretzschmar, M., Wallinga, J., **2009**. Enhanced hygiene measures and norovirus transmission during an outbreak. Emerg. Infect. Dis. 15, 24–30. doi:10.3201/eid1501.080299

Hernroth, B.E., Conden-Hansson, A.C., Rehnstam-Holm, A.S., Girones, R., Allard, A.K., **2002**. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, Mytilus edulis: the first Scandinavian report. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4523. doi:10.1128/AEM.68.9.4523

Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., **2006**. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. Water Res. 40, 3–22. doi:10.1016/j.watres.2005.10.030

Hollinger, F., Martin, A., **2013**. Hepatitis A Virus, in: Knipe, D., Howley, P. (Eds.), Fields Virology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 550–81.

Howard, C.M., Handzel, T., Hill, V.R., Grytdal, S.P., Blanton, C., Kamili, S., Drobeniuc, J., Hu, D., Teshale, E., **2010**. Novel risk factors associated with hepatitis E virus infection in a large outbreak in northern Uganda: results from a case--control study and environmental analysis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 83, 1170–3. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0384

Hsieh, S.Y., Meng, X.J., Wu, Y.H., Liu, S.T., Tam, A.W., Lin, D.Y., Liaw, Y.F., **1999**. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. J. Clin. Microbiol. 37, 3828–34.

Hsu, B.-M., Chen, C.-H., Kung, C.-M., Wan, M.-T., Shen, S.-M., **2007**. Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures. Chemosphere 66, 964–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.06.054

Huilan, S., Zhen, L.G., Mathan, M.M., Mathew, M.M., Olarte, J., Espejo, R., U, K.M., Ghafoor, M., Khan, M., Sami, Z., Sutton, R.G., **1991**. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries : a multicentre study in five countries. Bull. World Health Organ. 69, 549–555.

Hundesa, A., Bofill-Mas, S., Maluquer de Motes, C., Rodriguez-Manzano, J., Bach, A., Casas, M., Girones, R., **2010**. Development of a quantitative PCR assay for the quantitation of bovine polyomavirus as a microbial source-tracking tool. J. Virol. Methods 163, 385–389. doi:10.1016/j.jviromet.2009.10.029

Hundesa, A., Maluquer de Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Girones, R., **2006**. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7886–93. doi:10.1128/AEM.01090-06

Hyams, K.C., Purdy, M.A., Kaur, M., McCarthy, M.C., Hussain, M.A., el-Tigani, A., Krawczynski, K., Bradley, D.W., Carl, M., **1992**. Acute sporadic hepatitis E in Sudanese children: analysis based on a new western blot assay. J Infect Dis 165. doi:10.1093/infdis/165.6.1001

I

Ibarra, H., Riedemann, S., Reinhardt, G., Frieck, P., Siegel, F., Toledo, C., Calvo, M., Froösner, G., **1997**. [Prevalence of hepatitis E virus antibodies in blood donors and other population groups in southern Chile]. Rev. médica Chile 125, 275–8.

Ippagunta, S.K., Naik, S., Sharma, B., Aggarwal, R., **2007**. Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. J. Med. Virol. 79, 1827–31. doi:10.1002/jmv.21017

Isaäcson, M., Frean, J., He, J., Seriwatana, J., Innis, B.L., Isaacson, M., Frean, J., He, J., Seriwatana, J., Innis, B.L., **2000**. An outbreak of hepatitis E in Northern Namibia, 1983. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62, 619–25.

J

Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., **2010**. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. Vaccine 28, 6653–7. doi:10.1016/j.vaccine.2010.08.037

Jarroll, E.L., Bingham, A.K., Meyer, E.A., **1981**. Effect of chlorine on Giardia lamblia cyst viability. Appl. Environ. Microbiol. 41, 483–7.

Jeblaoui, A., Haim-Boukobza, S., Marchadier, E., Mokhtari, C., Roque-Afonso, A.-M., **2013**. Genotype 4 hepatitis e virus in france: an autochthonous infection with a more severe presentation. Clin. Infect. Dis. 57, e122–6. doi:10.1093/cid/cit291

Jiang, S.C., **2006**. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. Environ. Sci. Technol. 40, 7132–40.

Jiménez-Clavero, M.A., Fernández, C., Ortiz, J.A., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J.V., Roblas, N., Ley, V., **2003**. Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6311–5.

Johne, R., **2016**. Detection methods for HEV in food, in: FSA-EFSA Worshop on FBV- London. p. 22.

Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R.G., Machnowska, P., Sachsenröder, J., Nickel, P., Hofmann, J., **2014**. An ORF1-rearranged hepatitis E virus derived from a chronically infected patient efficiently replicates in cell culture. J. Viral Hepat. 21, 447–56. doi:10.1111/jvh.12157

Joon, A., Rao, P., Shenoy, S.M., Baliga, S., **2015**. Prevalence of Hepatitis A virus (HAV) and Hepatitis E virus (HEV) in the patients presenting with acute viral hepatitis. Indian J. Med. Microbiol. 33 Suppl, 102–5. doi:10.4103/0255-0857.150908

K

Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., **2003**. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 41, 1548–57.

Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N.-S., Ijaz, S., Izopet, J., Dalton, H.R., **2012**. Hepatitis E. Lancet 379, 2477–2488. doi:10.1016/S0140-6736(11)61849-7

Kamar, N., Bendall, R.P., Peron, J.M., Cintas, P., Prudhomme, L., Mansuy, J.M., Rostaing, L., Keane, F., Ijaz, S., Izopet, J., et al., **2011**. Hepatitis E virus and neurologic disorders. Emerg. Infect. Dis. 17, 173–9. doi:10.3201/eid1702.100856

Kamar, N., Rostaing, L., Izopet, J., **2013**. Hepatitis E virus infection in immunosuppressed patients: natural history and therapy. Semin. Liver Dis. 33, 62–70. doi:10.1055/s-0033-1338115

Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., Virgin, H.W., **2003**. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. Science 299, 1575–8. doi:10.1126/science.1077905

Katzenelson, E., Fattal, B., Hostovesky, T., **1976**. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. Appl. Environ. Microbiol. 32, 638–9.

Kfir, R., Bateman, W., Pitout, B.A., Coubrough, P., **1989**. Disinfection of polluted water by chlorine-flocculant tablet. Water Sci. Technol. 21, 207–213.

Khuroo M., **1991**. Hepatitis E: The Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis. Indian J Gastroenterol. 10, 96–100.

Khuroo, M.S., Khuroo, M.S., **2016**. Hepatitis E: an emerging global disease - from discovery towards control and cure. J. Viral Hepat. 23, 68–79. doi:10.1111/jvh.12445

Kim, J.-H., Nelson, K.E., Panzner, U., Kasture, Y., Labrique, A.B., Wierzba, T.F., **2014**. A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus in Africa. BMC Infect. Dis. 14, 308. doi:10.1186/1471-2334-14-308

Kirs, M., Smith, D.C., **2007**. Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase PCR for F+-specific RNA coliphages: a method for use in microbial source tracking. Appl. Environ. Microbiol. 73, 808–14. doi:10.1128/AEM.00399-06

Kitamura, T., Aso, Y., Kuniyoshi, N., Hara, K., Yogo, Y., **1990**. High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. J. Infect. Dis. 161, 1128–33.

Koivunen, J., Heinonen-Tanski, H., **2005**. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. Water Res. 39, 1519–26. doi:10.1016/j.watres.2005.01.021

Koonin, E. V., Gorbalenya, A.E., Purdy, M.A., Rozanov, M.N., Reyes, G.R., Bradley, D.W., **1992**. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 8259–8263. doi:10.1073/pnas.89.17.8259

Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R., **1990**. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on Cryptosporidium parvum oocyst viability. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1423–8.

Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., et al., **2013**. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet 382, 209–22. doi:10.1016/S0140-6736(13)60844-2

Krasner, S.W., Weinberg, H.S., Richardson, S.D., Pastor, S.J., Chinn, R., Sclimenti, M.J., Onstad, G.D., Thruston, A.D., **2006**. Occurrence of a New Generation of Disinfection Byproducts †. Environ. Sci. Technol. 40, 7175–7185. doi:10.1021/es060353j

Kuroda, K., Nakada, N., Hanamoto, S., Inaba, M., Katayama, H., Do, A.T., Nga, T.T.V., Oguma, K., Hayashi, T., Takizawa, S., **2015**. Pepper mild mottle virus as an indicator and a tracer of fecal pollution in water environments: comparative evaluation with wastewater-tracer

pharmaceuticals in Hanoi, Vietnam. Sci. Total Environ. 506-507, 287–98. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.11.021

L

Labrique, A.A.B., Sikder, S.S., Krain, L.L.J., West, K.K.P., Christian, P., Rashid, M., Nelson, K.E., **2012**. Hepatitis E, a vaccine-preventable cause of maternal deaths. Emerg. Infect. Dis. 18, 1401–4. doi:10.3201/eid1809.120241

Lanata, C.F., Fischer-Walker, C.L., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J., Black, R.E., 2013. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. PLoS One 8, e72788. doi:10.1371/journal.pone.0072788

Landry, E.F., Vaughn, J.M., Thomas, M.Z., Cheryl, A., **1979**. Adsorption of Enteroviruses to Soil Cores and Their Subsequent Elution by Artificial Rainwater. Appl Env. Microbiol. 38, 680–7.

Lantagne, D.S., **2001**. Investigation of the Potters for Peace Colloidal Silver Impregnated Ceramic Filter. Report 1: Intrinsic Effectiveness. Aleth. Environ. 79.

Leahy, J.G., Rubin, A.J., Sproul, O.J., **1987**. Inactivation of Giardia muris cysts by free chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1448–53.

Leclerc, H., Mossel, D.A., Edberg, S.C., Struijk, C.B., **2001**. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. Annu. Rev. Microbiol. 55, 201–34. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.201

Lee, E.S., Yoon, T.H., Lee, M.Y., Han, S.H., Ka, J.O., **2010**. Inactivation of environmental mycobacteria by free chlorine and UV. Water Res. 44, 1329–34. doi:10.1016/j.watres.2009.10.046

Lewis, H.C., Wichmann, O., Duizer, E., **2010**. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. Epidemiol. Infect. 138, 145–66. doi:10.1017/S0950268809990847

Ley, V., Higgins, J., Fayer, R., **2002**. Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3455–61.

Li, D., Gu, A.Z., He, M., Shi, H.-C., Yang, W., **2009**. UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. Water Res. 43, 3261–9. doi:10.1016/j.watres.2009.03.044

Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L., Chao, F.H., **2002**. Mechanisms of Inactivation of Hepatitis A Virus by Chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4951–4955. doi:10.1128/AEM.68.10.4951-4955.2002

Linden, K.G.K., Shin, G.-A.G., Faubert, G., Cairns, W., Sobsey, M.D.M., **2002**. UV disinfection of Giardia lamblia cysts in water. Environ. Sci. Technol. 36, 2519–22.

Liu, P., Li, L., Wang, L., Bu, Q., Fu, H., Han, J., Zhu, Y., Lu, F., Zhuang, H., **2012**. Phylogenetic analysis of 626 hepatitis E virus (HEV) isolates from humans and animals in China (1986-2011) showing genotype diversity and zoonotic transmission. Infect. Genet. Evol. 12, 428–34. doi:10.1016/j.meegid.2012.01.017

Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S., **2005**. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. J. Virol. Methods 123, 1–7. doi:10.1016/j.jviromet.2004.08.023

Loveland, J., Ryan, J.N., Amy, G.L., Harvey, R.W., **1996**. The reversibility of virus attachment to mineral surfaces. Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 107, 205–221.

M

Maier, R.M., Gentry, T., Pepper, I., Gerba, C., **2009**. Environmental Microbiology, Environmental Microbiology. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-370519-8.00025-0

Maila, H.T., Bowyer, S.M., Swanepoel, R., **2004**. Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. J Gen Virol 85, 89–95. doi:10.1099/vir.0.19587-0

Maluquer de Motes, C., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Martín, M., Girones, R., **2004**. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1448–54. doi:10.1128/AEM.70.3.1448

Mamane-Gravetz, H., Linden, K.G., Cabaj, A., Sommer, R., **2005**. Spectral sensitivity of Bacillus subtilis spores and MS2 coliphage for validation testing of ultraviolet reactors for water disinfection. Environ. Sci. Technol. 39, 7845–52.

Marion, O., Abravanel, F., Lhomme, S., Izopet, J., Kamar, N., **2016**. Hepatitis E in Transplantation. Curr. Infect. Dis. Rep. 18, 8. doi:10.1007/s11908-016-0515-z

Martin, A., Lemon, S.M., **2006**. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. Hepatology 43, S164–72. doi:10.1002/hep.21052

Mast, E.E., Polish, L.B., Favorov, M.O., Khudyakova, N.S., Collins, C., Tukei, P.M., Koptich, D., Khudyakov, Y.E., Fields, H.A., Margolis, H.S., **1994**. Hepatitis E Among Refugees in Kenya: Minimal Apparent Person-to-person Transmission, Evidence for Age-dependent Disease Expression, and New Serologic Assays, in: Nishioka, K., Suzuki, H., Mishiro, S., Oda, T. (Eds.), Viral Hepatitis and Liver Disease. Springer Japan, Tokyo, pp. 375–378. doi:10.1007/978-4-431-68255-4_94

Mattle, M.J., Kohn, T., **2012**. Inactivation and tailing during UV254 disinfection of viruses: Contributions of viral aggregation, light shielding within viral aggregates, and recombination. Environ. Sci. Technol. 46, 10022–10030. doi:10.1021/es302058v

Mayer, B.K., Yang, Y., Gerrity, D.W., Abbaszadegan, M., **2015**. The Impact of Capsid Proteins on Virus Removal and Inactivation During Water Treatment Processes. Microbiol. insights 8, 15–28. doi:10.4137/MBI.S31441

McCarthy, M.C., He, J., Hyams, K.C., el-Tigani, A., Khalid, I.O., Carl, M., **1994**. Acute hepatitis E infection during the 1988 floods in Khartoum, Sudan. Trans R Soc Trop Med Hyg 88. doi:10.1016/0035-9203(94)90284-4

McLennan, S.D., Peterson, L. a., Rose, J.B., **2009**. Comparison of point-of-use technologies for emergency disinfection of sewage-contaminated drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7283–6. doi:10.1128/AEM.00968-09

Mena, K.D., Gerba, C.P., **2009**. Waterborne adenovirus. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 198, 133–67. doi:10.1007/978-0-387-09647-6_4

Meng, X.J., Purcell, R.H., Halbur, P.G., Lehman, J.R., Webb, D.M., Tsareva, T.S., Haynes, J.S., Thacker, B.J., Emerson, S.U., **1997**. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 9860–5.

Michen, B., Fritsch, J., Aneziris, C., Graule, T., **2013**. Improved Virus Removal in Ceramic Depth Filters Modified with MgO. Environ. Sci. Technol. 47, 1526–33.

Michen, B., Graule, T., **2010**. Isoelectric points of viruses. J. Appl. Microbiol. 109, 388–97. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x

Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S., Arbiza, J., **2014**. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. Hepat. Med. 6, 45–59. doi:10.2147/HMER.S63417

Mohamed, H., Clasen, T., Njee, R.M., Malebo, H.M., Mbuligwe, S., Brown, J., **2015**. Microbiological Effectiveness of Household Water Treatment Technologies under Field Use Conditions in Rural Tanzania. Water Res. 82, 41–49. doi:10.2436/20.1501.01.233.

Mormann, S., Heißenberg, C., Pfannebecker, J., Becker, B., **2015**. Tenacity of human norovirus and the surrogates feline calicivirus and murine norovirus during long-term storage on common nonporous food contact surfaces. J. Food Prot. 78, 224–9. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-165

MSF, **2010**. Public Health Engineering In Precarious Situations. doi:10.1016/S0033-3506(79)80024-4

Murphy, T. V, Denniston, M.M., Hill, H.A., McDonald, M., Klevens, M.R., Elam-Evans, L.D., Nelson, N.P., Iskander, J., Ward, J.D., **2016**. Progress Toward Eliminating Hepatitis A Disease in the United States. MMWR Suppl. 65, 29–41. doi:10.15585/mmwr.su6501a6

N

Nagashima, S., Takahashi, M., Jirintai, S., Tanggis, Kobayashi, T., Nishizawa, T., Okamoto, H., **2014**. The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. Arch. Virol. 159, 979–91. doi:10.1007/s00705-013-1912-3

Naik, S.R., Aggarwal, R., Salunke, P.N., Mehrotra, N.N., **1992**. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. Bull. World Health Organ. 70, 597–604.

Neumann, R., Genersch, E., Eggers, H.J., **1987**. Detection of adenovirus nucleic acid sequences in human tonsils in the absence of infectious virus. Virus Res. 7, 93–7.

Nguyen, H.T., Torian, U., Faulk, K., Mather, K., Engle, R.E., Thompson, E., Bonkovsky, H.L., Emerson, S.U., **2012**. A naturally occurring human/hepatitis e recombinant virus predominates in serum but not in faeces of a chronic hepatitis E patient and has a growth advantage in cell culture. J. Gen. Virol. 93, 526–530. doi:10.1099/vir.0.037259-0

Nicand, E., Armstrong, G.L., Enouf, V., Guthmann, J.P., Guerin, J.P., Caron, M., Nizou, J.Y., Andraghetti, R., **2005**. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus in Darfur, Sudan, and neighboring Chad. J Med Virol 77. doi:10.1002/jmv.20487

Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., **2003**. Capsid Functions of Inactivated Human Picornaviruses and Feline Calicivirus. Appl. Environ. Microbiol. 69, 350–357. doi:10.1128/AEM.69.1.350-357.2003

O

Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., **2002**. Photoreactivation of Escherichia coli after low- or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay. Appl. Environ. Microbiol. 68, 6029–35.

Okamoto, H., **2013**. Culture systems for hepatitis E virus. J. Gastroenterol. 48, 147–58. doi:10.1007/s00535-012-0682-0

ÖNORM, **2001**. ÖNORM M 5873-1. Plants for the disinfection of water using ultraviolet radiation Requirements and testing Part 1: Low pressure mercury lamp plants.

Oppenländer, T.P., **2007**. UV disinfection, in: Photochemical Purification of Water and Air: Advanced Oxidation Processes (AOPs): Principles, Reaction Mechanisms, Reactor Concepts. Weinheim: John Wiley and Sons, Inc., pp. 279–293.

Oyanedel-Craver, V., Smith, J., **2008**. Sustainable colloidal-silver-impregnated ceramic filter for point-of-use water treatment. Environ. Sci. Technol. 42, 927–33.

P

Palmateer, G., Manz, D., Jurkovic, A., McInnis, R., Unger, S., Kwan, K.K., Dutka, B.J., **1999**. Toxicant and parasite challenge of Manz intermittent slow sand filter. Environ. Toxicol. 14, 217–225. doi:10.1002/(SICI)1522-7278(199905)14:2<217::AID-TOX2>3.0.CO;2-L

Park, S.B., **2012**. Hepatitis E vaccine debuts. Nature 491. doi:10.1038/491021a

Pavia, A.T., **2011**. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. Clin. Infect. Dis. 52 Suppl 4, S284–9. doi:10.1093/cid/cir043

Pavio, N., Meng, X.-J., Renou, C., **2010**. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. Vet. Res. 41, 46. doi:10.1051/vetres/2010018

Pecson, B.M., Ackermann, M., Kohn, T., **2011**. Framework for using quantitative PCR as a nonculture based method to estimate virus infectivity. Environ. Sci. Technol. 45, 2257–63. doi:10.1021/es103488e

Pecson, B.M., Martin, L.V., Kohn, T., **2009**. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5544–54. doi:10.1128/AEM.00425-09

Pina, S., Jofre, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Girones, R., **1998a**. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4485–4488.

Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R., **1998b**. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3376–82.

Polo, D., García-Fernández, I., Fernández-Ibáñez, P., Romalde, J.L., **2015**. Solar water disinfection (SODIS): Impact on hepatitis A virus and on a human Norovirus surrogate under natural solar conditions. Int. Microbiol. 18, 41–9. doi:10.2436/20.1501.01.233

Potters for Peace, **2016**. CWF factory locations [WWW Document]. URL http://pottersforpeace.com/?page_id=360

Powers, E.M., Hernandez, C., Boutros, S.N., **1994**. Water Purification Tablet Biocidal Efficacy of a Flocculating Emergency Water Purification Tablet 60.

Prieto, M.D., 2001. Recreation in coastal waters: health risks associated with bathing in sea water. J. Epidemiol. Community Heal. 55, 442–447. doi:10.1136/jech.55.6.442

Pringle, K., Lopman, B., Vega, E., Vinje, J., Parashar, U.D., Hall, A.J., **2015**. Noroviruses: epidemiology, immunity and prospects for prevention. Future Microbiol. 10, 53–67. doi:10.2217/fmb.14.102

Prüss-Ustün, A., Bartram, J., Clasen, T., Colford, J.M., Cumming, O., Curtis, V., Bonjour, S., Dangour, A.D., De France, J., Fewtrell, L., et al., **2014**. Burden of disease from inadequate water, sanitation and hygiene in low- and middle-income settings: a retrospective analysis of data from 145 countries. Trop. Med. Int. Health 19, 894–905. doi:10.1111/tmi.12329

Purdy, M.A., Khudyakov, Y.E., **2011**. The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. Virus Res 161. doi:10.1016/j.virusres.2011.04.030

R

Rab, M. a, Bile, M.K., Mubarik, M.M., Asghar, H., Sami, Z., Siddiqi, S., Dil, a S., Barzgar, M. a, Chaudhry, M. a, Burney, M.I., **1997**. Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan: a common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57, 151–7.

Rastogi, R.P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M.B., Sinha, R.P., **2010**. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. J. Nucleic Acids 2010, 592980. doi:10.4061/2010/592980

Rayis, D. a, Jumaa, A.M., Gasim, G.I., Karsany, M.S., Adam, I., **2013**. An outbreak of hepatitis E and high maternal mortality at Port Sudan, Eastern Sudan. Pathog Glob Heal. 107, 66–8. doi:10.1179/2047773213Y.0000000076

RD 140/2003, **2003**. Criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

Rendon, J., Hoyos, M.C., di Filippo, D., Cortes-Mancera, F., Mantilla, C., Velasquez, M.M., Sepulveda, M.E., Restrepo, J.C., Jaramillo, S., Arbelaez, M.P., et al., **2016**. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Colombia: Survey in Patients with Clinical Diagnosis of Viral Hepatitis. PLoS One 11, e0148417. doi:10.1371/journal.pone.0148417

Riveiro-Barciela, M., Mínguez, B., Gironés, R., Rodriguez-Frías, F., Quer, J., Buti, M., **2015**. Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. J. Clin. Gastroenterol. 49, 165–8. doi:10.1097/MCG.0000000000000113

Rodda, N., Bateman, B., Kfir, R., **1993**. Removal of salmonella-typhi, shigella-dysenteriae, vibrio-cholerae and rotavirus from water using a water-treatment tablet. Water Sci. Technol. 27, 347–350.

Rönnqvist, M., Mikkelä, A., Tuominen, P., Salo, S., Maunula, L., **2013**. Ultraviolet Light Inactivation of Murine Norovirus and Human Norovirus GII: PCR May Overestimate the

Persistence of Noroviruses Even When Combined with Pre-PCR Treatments. Food Environ. Virol. doi:10.1007/s12560-013-9128-y

Rosario, K., Symonds, E.M., Sinigalliano, C., Stewart, J., Breitbart, M., **2009**. Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7261–7. doi:10.1128/AEM.00410-09

Rusiñol, M., Carratalà, A., Hundesa, A., Bach, A., Kern, A., Vantarakis, A., Girones, R., Bofill-Mas, S., **2013**. Description of a novel viral tool to identify and quantify ovine faecal pollution in the environment. Sci. Total Environ. 458-460, 355–60. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.028

Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Hundesa, A., Vieira, C., Kern, A., Eriksson, I., Ziros, P., Kay, D., Miagostovich, M., Vargha, et al., **2014**. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. Water Res. 59C, 119–129. doi:10.1016/j.watres.2014.04.013

Ruvoën-Clouet, N., Belliot, G., Le Pendu, J., **2013**. Noroviruses and histo-blood groups: the impact of common host genetic polymorphisms on virus transmission and evolution. Rev. Med. Virol. 23, 355–66. doi:10.1002/rmv.1757

Rzeżutka, A., Cook, N., **2004**. Survival of human enteric viruses in the environment and food. FEMS Microbiol. Rev. 28, 441–453. doi:10.1016/j.femsre.2004.02.001

S

S de Paula, V., Wiele, M., Mbunkah, A.H., Daniel, A.M., Kingsley, M.T., Schmidt-Chanasit, J., **2013**. Hepatitis E virus genotype 3 strains in domestic pigs, Cameroon. Emerg. Infect. Dis. 19, 666–8. doi:10.3201/eid1904.121634

Salsali, H., McBean, E., Brunsting, J., **2011**. Virus removal efficiency of Cambodian ceramic pot water purifiers. J. Water Health 9, 306–11.

Sarguna, P., Rao, A., Sudha Ramana, K.N., **2007**. Outbreak of acute viral hepatitis due to hepatitis E virus in Hyderabad. Indian J. Med. Microbiol. 25, 378–82.

Sato, Y., Sato, H., Naka, K., Furuya, S., Tsukiji, H., Kitagawa, K., Sonoda, Y., Usui, T., Sakamoto, H., Yoshino, S., et al., **2011**. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. Arch. Virol. 156, 1345–58. doi:10.1007/s00705-011-0988-x

Sauerbrei, A., Wutzler, P., **2009**. Testing thermal resistance of viruses. Arch. Virol. 154, 115–9. doi:10.1007/s00705-008-0264-x

Schaper, M., Jofre, J., Uys, M., Grabow, W.O.K., **2002**. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. J. Appl. Microbiol. 92, 657–67.

Schlauder, G.G., Dawson, G.J., Erker, J.C., Kwo, P.Y., Knigge, M.F., Smalley, D.L., Rosenblatt, J.E., Desai, S.M., Mushahwar, I.K., **1998**. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. J. Gen. Virol. 79 (Pt 3), 447–56. doi:10.1099/0022-1317-79-3-447

Scobie, L., Dalton, H.R., **2013**. Hepatitis E: source and route of infection, clinical manifestations and new developments. J. Viral Hepat. 20, 1–11. doi:10.1111/jvh.12024

Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., Lukasik, J., **2002**. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5796–5803. doi:10.1128/AEM.68.12.5796-5803.2002

Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Moe, C.L., **2011**. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. Appl. Environ. Microbiol. 77, 6884–8. doi:10.1128/AEM.05806-11

Shaheed, A., Orgill, J., Montgomery, M.A., Jeuland, M.A., Brown, J., **2014**. WHO | Why "improved" water sources are not always safe. WHO Bull. 92, 229–308.

Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., Graham, F.L., **2002**. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. FASEB J. 16, 869–71. doi:10.1096/fj.01-0995fje

Shin, G.-A., Lee, J.-K., Linden, K.G., **2009**. Enhanced effectiveness of medium-pressure ultraviolet lamps on human adenovirus 2 and its possible mechanism. Water Sci. Technol. 60, 851. doi:10.2166/wst.2009.414

Shin, G.-A., Sobsey, M.D., **2008**. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. Water Res. 42, 4562–8. doi:10.1016/j.watres.2008.08.001

Shrestha, A., Lama, T.K., Karki, S., Sigdel, D.R., Rai, U., Rauniyar, S.K., Al-Mahtab, M., Takahashi, K., Arai, M., Akbar, S.M.F., et al., **2015**. Hepatitis E epidemic, Biratnagar, Nepal, 2014. Emerg. Infect. Dis. 21, 711–3. doi:10.3201/eid2104.141512

Shrestha, S.M., **2006**. Hepatitis E in Nepal. Kathmandu Univ. Med. J. (KUMJ) 4, 530–44.

Shukla, P., Nguyen, H.T., Faulk, K., Mather, K., Torian, U., Engle, R.E., Emerson, S.U., **2012**. Adaptation of a Genotype 3 Hepatitis E Virus to Efficient Growth in Cell Culture Depends on an Inserted Human Gene Segment Acquired by Recombination. J. Virol. 86, 5697–5707. doi:10.1128/JVI.00146-12

Small, D.A., Chang, W., Toghrol, F., Bentley, W.E., **2007**. Toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 176–85. doi:10.1007/s00253-006-0644-7

Smith, D.B., Simmonds, P., Izopet, J., Oliveira-Filho, E.F., Ulrich, R.G., Johne, R., Koenig, M., Jameel, S., Harrison, T.J., Meng, X.-J., et al., **2016**. Proposed reference sequences for Hepatitis E virus subtypes. J. Gen. Virol. doi:10.1099/jgv.0.000393

Sobsey, M., **2002**. Managing Water in the Home : Accelerated Health Gains from Improved Water Supply. World Heal. Organ. Ref. number WHO/SDE/WSH/02.07 8, 1–83. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00820.x

Solo-Gabriele, H.M., Wolfert, M.A., Desmarais, T.R., Palmer, C.J., **2000**. Sources of Escherichia coli in a coastal subtropical environment. Appl. Environ. Microbiol. 66, 230–7.

Sommer, R., Haider, T., Cabaj, A., Pribbil, W., Lhotsky, M., **1998**. Time dose reciprocity in UV disinfection of water. Water Sci. Technol. 38, 145–150. doi:10.1016/S0273-1223(98)00816-6

Souter, P.F.P., Cruickshank, G.D., Tankerville, M.Z., Keswick, B.H., Ellis, B.D., Langworthy, D.E., Metz, K., Appleby, M.R., Hamilton, N., Jones, A.L., et al., **2003**. Evaluation of a new water

treatment for point-of-use household applications to remove microorganisms and arsenic from drinking water. J Water Heal. 1, 73–84.

Spinks, A.T., Dunstan, R.H., Harrison, T., Coombes, P., Kuczera, G., **2006**. Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. Water Res. 40, 1326–32. doi:10.1016/j.watres.2006.01.032

Subekti, D., Lesmana, M., Tjaniadi, P., Safari, N., Frazier, E., Simanjuntak, C., Komalarini, S., Taslim, J., Campbell, J.R., Oyofo, B.A., **2002**. Incidence of Norwalk-like viruses, rotavirus and adenovirus infection in patients with acute gastroenteritis in Jakarta, Indonesia. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 33, 27–33.

Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., de Bruin, E., van der Veer, B., Dorresteijn, B., Koopmans, M., **2007**. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. J. Clin. Microbiol. 45, 1389–94. doi:10.1128/JCM.02305-06

T

Teshale, E.H., Grytdal, S.P., Howard, C., Barry, V., Kamili, S., Drobeniuc, J., Hill, V.R., Okware, S., Hu, D.J., Holmberg, S.D., **2010**. Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. Clin Infect Dis 50, 1006–10. doi:10.1086/651077

Teshale, E.H., Howard, C.M., Grytdal, S.P., Handzel, T.R., Barry, V., Kamili, S., Drobeniuc, J., Okware, S., Downing, R., Tappero, J.W., et al., **2010**. Hepatitis E epidemic, Uganda. Emerg Infect Dis 16. doi:10.3201/eid1601.090764

Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L., **2008**. Norwalk virus: how infectious is it? J. Med. Virol. 80, 1468–76. doi:10.1002/jmv.21237

The Ceramics Manufacturing Working Group, **2011**. Best Practice Recommendations for Local Manufacturing of Ceramic Pot Filters for Household Water Treatment [WWW Document]. Ed. 1. Atlanta, GA, USA CDC. URL https://s3.amazonaws.com/PfP/Best+Practice+Recommendations+for+Manufacturing+Ceramic+Pot+Filters+June2011.pdf

The Sphere Project, **2011**. Humanitarian Charter and Minimum Standards in Humanitarian Response, Response. doi:10.3362/9781908176202

Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Riley, K., Gerba, C.P., **2003**. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. Appl. Environ. Microbiol. 69, 577–82.

Tsega, E., Krawczynski, K., Hansson, B.G., Nordenfelt, E., Negusse, Y., Alemu, W., Bahru, Y., **1991**. Outbreak of acute hepatitis E virus infection among military personnel in northern Ethiopia. J Med Virol. 34, 232–6. doi:10.1002/jmv.1890340407

Turnell, A.S., Grand, R.J., **2012**. DNA viruses and the cellular DNA-damage response. J. Gen. Virol. 93, 2076–97. doi:10.1099/vir.0.044412-0

U

Uchida, T., Aye, T., Ma, X., Iida, F., Shikata, T., Ichikawa, M., Rikihisa, T., Win, K., **1993**. An epidemic outbreak of hepatitis E in Yangon of Myanmar: antibody assay and animal transmission of the virus. Acta Pathol Jpn. 43, 94–8.

UNHCR, **2015a**. Mid-Year Trends 2015.

UNHCR, **2015b**. UNHCR country operations profile - South Sudan [WWW Document]. URL http://www.unhcr.org/pages/4e43cb466.html (accessed 3.22.16).

UNHCR, **2014**. Field Brief : Hepatitis E Response In Refugee Settings. Geneva.

UNICEF, **2008**. Promotion of Household Water Treatment and Safe Storage in Unicef Wash Programmes.

United Nations, **2010**. General Assembly 50071, 9–11.

UNOCHA, **2015**. Global Humanitarian Overview, June 2015.

USEPA, **2012**. CFR Part 142: National Primary Drinking Water Regulations Implementation.

USEPA, EPA, **2006**. Ultraviolet Disinfection Guidance Manual for the Final Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule.

USEPA, EPA, **1990**. Techonologies for Upgrading Existing or Designing New Drinking Water Treatment Facilities. Cincinnati, OH.

V

van der Laan, H., van Halem, D., Smeets, P.W.M.H., Soppe, A.I.A., Kroesbergen, J., Wubbels, G., Nederstigt, J., Gensburger, I., Heijman, S.G.J., **2014**. Bacteria and virus removal effectiveness of ceramic pot filters with different silver applications in a long term experiment. Water Res. 51, 47–54. doi:10.1016/j.watres.2013.11.010

van Halem, D., **2006**. Ceramic silver impregnated pot filters for household drinking water treatment in developing countries. Delft University of Technology.

Vaughan, G., Goncalves Rossi, L.M., Forbi, J.C., de Paula, V.S., Purdy, M.A., Xia, G., Khudyakov, Y.E., **2014**. Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. Infect. Genet. Evol. 21, 227–43. doi:10.1016/j.meegid.2013.10.023

Velazquez, O., Stetler, H., Avila, C., Ornelas, G., Alvarez, C., Hadler, S., Bradley, D., Sepúlveda, J., **1990**. Epidemic Transmission of Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis in Mexico, 1986-1987. JAMA 263, 3281–3285.

Viancelli, A., Garcia, L.A.T., Kunz, A., Steinmetz, R., Esteves, P.A., Barardi, C.R.M., **2012**. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. Res. Vet. Sci. 93, 538–43. doi:10.1016/j.rvsc.2011.07.022

ViralZone, **2016**. Hepatovirus [WWW Document]. URL http://viralzone.expasy.org/all_by_species/94.html (accessed 4.4.16).

Vivek, R., Nihal, L., Illiayaraja, J., Reddy, P.K., Sarkar, R., Eapen, C.E., Kang, G., **2010**. Investigation of an epidemic of Hepatitis E in Nellore in south India. Trop. Med. Int. Health 15, 1333–9. doi:10.1111/j.1365-3156.2010.02624.x

W

Wang, G., Zhuang, H., Cao, X., Liu, C., **1991**. Epidemiology of hepatitis E in China. Gastroenterol Jpn. 26, 135–8.

Wegmann, M., Michen, B., Graule, T., **2008**. Nanostructured surface modification of microporous ceramics for efficient virus filtration. J. Eur. Ceram. Soc. 28, 1603–1612. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2007.11.002

WHO, **2015**. Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015. Wkly. Epidemiol. Rec. / Heal. Sect. Secr. Leag. Nations 90, 185–200.

WHO, **2014a**. Waterborne outbreaks of hepatitis E: Recognition, Investigation and Control, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World Health Organization.

WHO, **2014b**. Preventing diarrhoea through better water, sanitation and hygiene; Exposures and impacts in low- and middle-income countries 48.

WHO, **2011a**. WHO guidelines for drinking-water quality. WHO Bull. 38, 104–108. doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6

WHO, **2011b**. Evaluating household water treatment options : Health-based targets and microbiological performance specifications. WHO Libr. Cat. Data.

WHO, **2007**. WHO | Combating waterborne disease at the household level. World Health Organization, Geneva.

WHO, **2003**. Environmental health in emergencies and disasters: a practical guide. World Health Organization.

WHO, UNICEF, **2015**. WHO | Progress on sanitation and drinking water. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva.

WHO, UNICEF, **2014**. Progress on sanitation and drinking-water - 2014 update. … Monit. Program. water supply Sanit. … 1–78. doi:978 92 4 150724 0

Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., Kohn, T., **2012**. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. Environ. Sci. Technol. 46, 12069–78. doi:10.1021/es3029473

Wobus, C.E., Thackray, L.B., Virgin, H.W., **2006**. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. J. Virol. 80, 5104–12. doi:10.1128/JVI.02346-05

Wold, W., Ison, M., **2013**. Adenoviruses, in: Knipe, D., Howley, P. (Eds.), Fields Virology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1732–68.

Wolf, J., Prüss-Ustün, A., Cumming, O., Bartram, J., Bonjour, S., Cairncross, S., Clasen, T., Colford, J.M., Curtis, V., De France, J., et al., **2014**. Systematic review: Assessing the impact of drinking water and sanitation on diarrhoeal disease in low- and middle-income settings: Systematic review and meta-regression. Trop. Med. Int. Heal. 19, 928–942. doi:10.1111/tmi.12331

Wong, K., Fong, T.-T., Bibby, K., Molina, M., **2012**. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. Environ. Int. 45, 151–64. doi:10.1016/j.envint.2012.02.009

Wright, J., Gundry, S., Conroy, R., **2004**. Household drinking water in developing countries: a systematic review of microbiological contamination between source and point-of-use. Trop. Med. Int. Health 9, 106–17.

Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Höller, C., et al., **2011**. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. Water Res. 45, 1025–38. doi:10.1016/j.watres.2010.10.015

X

Xue, B., Jin, M., Yang, D., Guo, X., Chen, Z., Shen, Z., Wang, X., Qiu, Z., Wang, J., Zhang, B., Li, J., **2013**. Effects of chlorine and chlorine dioxide on human rotavirus infectivity and genome stability. Water Res. 47, 3329–38. doi:10.1016/j.watres.2013.03.025

Y

Yamada, K., Takahashi, M., Hoshino, Y., Takahashi, H., Ichiyama, K., Nagashima, S., Tanaka, T., Okamoto, H., **2009**. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. J. Gen. Virol. 90, 1880–91. doi:10.1099/vir.0.010561-0

Yamashita, T., Mori, Y., Miyazaki, N., Cheng, R.H., Yoshimura, M., Unno, H., Shima, R., Moriishi, K., Tsukihara, T., Li, T.C., Takeda, N., Miyamura, T., Matsuura, Y., **2009**. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 12986–91. doi:10.1073/pnas.0903699106

Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y., Feng, Z., **2016**. Distinct entry mechanisms for non-enveloped and quasi-enveloped hepatitis E virus. J. Virol. doi:10.1128/JVI.02804-15

Yoon, C.G., Jung, K.-W., Jang, J.-H., Kim, H.-C., **2007**. Microorganism repair after UV-disinfection of secondary-level effluent for agricultural irrigation. Paddy Water Environ. 5, 57–62. doi:10.1007/s10333-006-0061-7

Z

Zheng, D.-P., Widdowson, M.-A., Glass, R.I., Vinjé, J., **2010**. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. J. Clin. Microbiol. 48, 168–77. doi:10.1128/JCM.01622-09

Zhuang, J., Jin, Y., **2003**. Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns : effects of ionic strength and composition. J. Contam. Hydrol. 60, 193–209.

Annexos

8. Annexos

Annex I. Estudis anteriors: Virus entèrics en camps de refugiats al Txad

Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources

Laura Guerrero-Latorre, Anna Carratala, Jesus Rodriguez-Manzano, Byron Calgua, Ayalkibet Hundesa and Rosina Girones

Journal Water and Health. 2011 Sep;9(3):515-24. doi: 10.2166/wh.2011.126.

515 © IWA Publishing 2011 Journal of Water and Health | 09.3 | 2011

Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources

Laura Guerrero-Latorre, Anna Carratala, Jesus Rodriguez-Manzano, Byron Calgua, Ayalkibet Hundesa and Rosina Girones

ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is a common cause of water-borne acute hepatitis in areas with poor sanitation. In 2004 an outbreak of HEV infection affected around 2,000 people in Eastern Chad (Dar Sila). This paper describes the decrease in the incidence of acute jaundice syndrome (AJS) from 2004 until 2009 when a mean incidence of 0.48 cases/1,000 people/year was recorded in the region. Outbreaks of AJS were identified in some of the camps in 2007 and 2008. Moreover, water samples from drinking water sources were screened for human adenoviruses considered as viral indicators and for hepatitis A virus and HEV. Screening of faecal samples from donkeys for HEV gave negative results. Some of the samples were also analysed for faecal coliforms showing values before disinfection treatment between 3 and >50 colony forming units per 100 mL. All water samples tested were negative for HEV and HAV; however, the presence of low levels of human adenoviruses in 4 out of 16 samples analysed indicates possible human faecal contamination of groundwater. Consequently, breakdowns in the treatment of drinking water and/or increased excretion of hepatitis viruses, which could be related to the arrival of a new population, could spread future outbreaks through drinking water.

Key words | acute jaundice syndrome, drinking-water, Eastern Chad, HEV, HAdV, humanitarian action

Laura Guerrero-Latorre
Intermon Oxfam Humanitarian Action Program,
C/Roger de Llúria, 15,
08010 Barcelona,
Spain

Laura Guerrero-Latorre
Anna Carratala
Jesus Rodriguez-Manzano
Byron Calgua
Ayalkibet Hundesa
Rosina Girones (corresponding author)
Department of Microbiology,
Faculty of Biology,
University of Barcelona,
Avd. Diagonal 645,
08028 Barcelona,
Spain
E-mail: *rgirones@ub.edu*

ABBREVIATIONS

AJS	acute jaundice syndrome
EWARS	Early Warning Alert and Response System
GC	genomic copies
HAdV	human adenoviruses
HAV	hepatitis A Virus
HEV	hepatitis E Virus
IDPs	internally displaced persons
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nPCR	nested PCR
ORF1	open reading frame 1
ORF2	open reading frame 2
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SD	standard deviation
UV	ultraviolet
WaSH	water, sanitation and hygiene

doi: 10.2166/wh.2011.126

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) and hepatitis A virus (HAV) are small, non-enveloped viruses that contain positive sense

single-stranded RNA genomes of 7.5 and 7.2 Kb respectively (Purcell & Emerson 2008). HEV and HAV infections cause water-borne acute hepatitis with frequent onset of jaundice, called acute jaundice syndrome (AJS). The disease is self-limiting, with a low mortality rate in the general population, higher for HEV (1%) than for HAV (0.1%); however, a case-fatality ratio that might reach 30% in pregnant women has been reported in HEV infections during the second and third trimesters (Dalton *et al.* 2008; Purcell & Emerson 2008). Over the past few years, some animal species have been identified as reservoirs of HEV genotypes 3 and 4. This finding suggests the role of HEV as a zoonosis (Pavio *et al.* 2008). Additionally, HEV infection has recently been found to lead to chronic hepatitis in solid organ-transplant recipients (Dalton *et al.* 2008), showing evidence of a chronic form of HEV infection (Kamar *et al.* 2008).

HEV is recognized as an important pathogen in tropical and subtropical regions and is one of the two leading causes of acute hepatitis in adults in North Africa, Asia and the Middle East (FitzSimons *et al.* 2009). Moreover, it is responsible for recent large-scale epidemics of hepatitis around the world (Aggarwal & Naik 2009; Teshale *et al.* 2010) showing a seasonal pattern outbreaks of this waterborne virus associated with the rainy season (Ippagunta *et al.* 2007).

Although HEV and HAV share the same routes of transmission, outbreaks of HAV are not normally detected in endemic areas; this is related to a high prevalence of seropositivity among those populations from early childhood, which confers them lifelong immunity (Martin & Lemon 2006).

A study carried out in 1993 in the N'Djamena region in Chad detected anti-HEV antibodies in 83% (34/41) of hepatitis cases and in 22% (19/86) of the control subjects, whereas none had serological markers for acute or recent infection by HAV (Coursaget *et al.* 1998). These results suggested that Chad could also be an HEV endemic area in addition to other recognized endemic areas, such as Sudan with anti-HEV seroprevalence of 18% (Hyams *et al.* 1992) and Egypt with 24–25% (Goldsmith *et al.* 1992).

In 2003 a violent conflict in Darfur (Sudan) affected the population that moved westwards to take refuge in Chad. According to a report by the UN Security Council, more than 250,000 Darfurians are living in 12 refugee camps in eastern Chad and 172,600 people have been internally displaced to the south-eastern regions of Chad bordering Sudan's Darfur (UNHCR 2009). The refugees and the displaced people are extremely vulnerable and have very limited access to already scarce resources including water, sanitation, food and healthcare. In these conditions the risk of outbreaks from water-related diseases increases dramatically.

In 2004, an important outbreak of hepatitis E in Western Darfur affected two refugee camps in the district of Dar Sila, Eastern Chad. The analysis of IgG anti-HEV among the asymptomatic population showed a seroprevalence of 25.9% (37/143), indicating previous contact of this population with HEV prior to the outbreak (Guthmann *et al.* 2006). HEV RNA was isolated from serum samples and the sequences closely resembled genotypes 1 and 2 (Nicand *et al.* 2005). The role of donkeys, as the most prevalent domestic animals in the area was studied in 2004 but no clear results were found (Guthmann *et al.* 2006).

To our knowledge this is the only confirmed outbreak of HEV disease in Chad. Since then, outbreaks of this disease have ocurred in Dar Sila, but nothing is known about their intensity or periodicity.

Intermon Oxfam has been the main provider of water, sanitation and hygiene (WaSH) in four of the camps based in the Dar Sila district since 2007: Goz Amir camp and Djabal camp (both started in March 2007), Aradib site (September 2007) and Habilé site (June 2008).

Classic water safety microbiological indicators such as faecal coliforms and enterococci are commonly used for evaluating water quality. However, the adequacy of these bacteria for indicating the occurrence and concentration of human viruses and protozoa cysts has been questioned in recent years. Human adenoviruses (HAdV) have been described as stable in the environment and highly resistant to ultraviolet (UV) disinfection. HAdV quantified by quantitative PCR (qPCR) have been proposed as a molecular index of faecal contamination in water (Albinana-Gimenez *et al.* 2009a, b). *Eschorichia coli* and thermotolerant bacteria are less resistant to chlorine than pathogenic viruses and protozoal cysts and oocysts, and there is some evidence that coliforms, possibly including *E. coli*, can proliferate in some environments (WHO 2002).

Previous studies show that even in areas with no significant numbers of clinical cases of acute hepatitis A and E,

these viruses may be excreted and detected in wastewater (Pina *et al.* 2001; Clemente-Casares *et al.* 2003), and faecal contamination of food and water may represent a significant risk for outbreaks in human populations (Clemente-Casares *et al.* 2009; Rodriguez-Manzano *et al.* 2010).

This study provides a description of the available information regarding the incidence of AJS in the regional district of Dar Sila and evaluates the presence and dissemination of human adenoviruses as indicators of human faecal contamination and of HAV and HEV in two settlements within the district studied. This information is useful for the identification of potential routes for the spread of future acute hepatitis outbreaks in the region.

METHODS

Data collection and sampling

Epidemiological information was collected from the Early Warning Alert and Response system (EWARS) from Eastern Chad. The surveillance data from EWARS reports cases with epidemic potential: suspicion of cholera, meningitis, Hepatitis E (AJS) and measles, among others.

Laboratory diagnosis of HEV is not available in Chad; therefore, we reviewed reports of AJS defined as an individual presenting symptoms of acute onset of jaundice (yellow coloration of the sclera) with test results being negative for malaria (thick blood smear or Paracheck®). Incidence of AJS has been adjusted according to settlement location, year and population size per camp which varies significantly every year due to the arrival of new refugees.

Environmental screening was performed in two selected settlements: Goz Amir camp and Dogdoré site (Figure 1). The analysis took place in September 2009 during the rainy season when the risk of water contamination is higher and when HEV outbreaks have been previously observed (Figure 2), although no significant number of cases of AJS had been reported at the time of the study.

Sampling points were mainly sources of drinking water provided by non-governmental organisations (Intermon Oxfam in Goz Amir and Action against Hunger in Dogdoré), such as wells, boreholes and pipelines before treatment (if any), and surface water from the seasonal river (Barh Azoum) that runs through both settlements.

Samples from Dogdoré site for internally displaced persons

Nine water samples of 10 L each were collected from the following sources located at Dogdoré site for internally displaced persons (IDPs) (Figure 1): one water sample was taken directly from surface water of the river (Bahr Azoum); another sample was taken using a water pump drawing water from 7 m underground within the river bed area; two water samples were collected after UV treatment (in the station and from the pipeline on the site); two water samples were taken from open wells; one water sample was collected from a traditional well and two

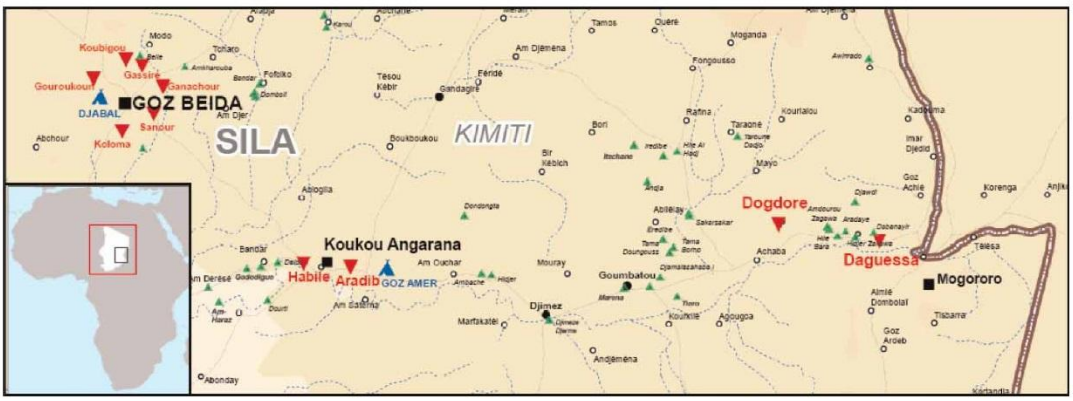


Figure 1 | The localization of Internal Displaced People sites (inverted triangles) and Refugee Camps (tent camp) are shown on the map of Dar Sila (Eastern Chad). *Source*: OCHA Abéché Office.

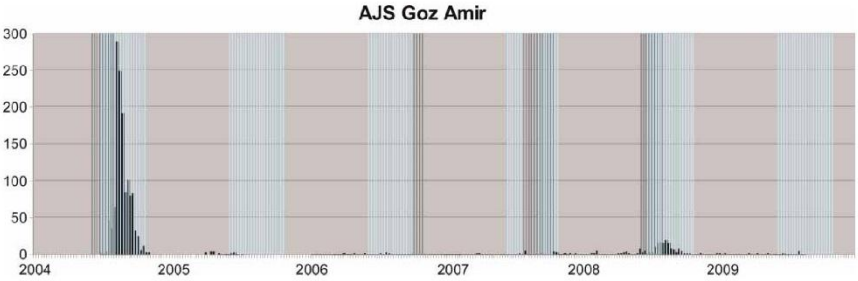


Figure 2 | Representation of Goz Amir cases (weekly black bars) of acute jaundice syndrome during the rainy seasons (white bars) (2004–2009).

additional water samples were collected from boreholes (60 m deep).

Samples from Goz Amir refugee camp

Seven water samples of 10 L each was collected from different sources of drinking water in the Goz Amir Refugee Camp. One water sample was collected directly from the river (Bahr Azoum); three water samples were collected from wells and three water samples were collected from boreholes. In addition, 28 faecal samples from donkeys were collected from distinct areas within the refugee camp.

Positive controls

As positive controls for HEV analysis, positive sewage samples from other geographical areas were used (Rodriguez-Manzano *et al.* 2010). The positive controls used for the analysis of HAV consisted of dilutions of the supernatant of FRhK-4 cell cultures infected with pHM-175 strain. HAdV2, isolated from a clinical sample and used as positive control for the determinations of human adenoviruses was grown on A549 cells. Viral suspensions were stored at −80 °C until required.

Sample processing

Virus concentration from water samples

The method used to recover virus particles from water samples was chosen on the basis of previous studies (Vilaginès *et al.* 1993; Albinana-Gimenez *et al.* 2009a). Briefly, the samples were filtered on the site at 0.5 L/min through a column containing 10 g of compacted glass wool (Panreac, Barcelona, Spain) previously washed with HCl 1 M, NaOH 1 M using gravity flow. Glass wool concentrates obtained from filtration were shipped at +4 °C to the Laboratory of Microbiology, University of Barcelona, Spain, for testing. Maximum transport time was 4 days. The columns were eluted in the laboratory by gravity flow using 200 mL of 0.05 M glycine buffer containing 3% beef extract at pH 9.5 ± 0.2. The eluate was flocculated at pH 3.5 ±0.2 and centrifuged at 7,000 × *g* for 30 min. The pellet was resuspended in 5 mL phosphate-buffered saline (PBS) and stored at −80 °C until analysis could be conducted.

Virus concentration from faecal samples

Faecal material was distributed in seven pools of specimens from four donkeys each and shipped to the reference laboratory at 4 °C. Maximum transport time was 4 days. Once in the laboratory, 1 g of each pooled sample was dissolved in 0.25 N glycine buffer pH 9.5 using vortexing for 15 min. The suspended solids were kept on ice for 20 min and separated by centrifugation at 12,000 × *g* for 15 min following the addition of 3.5 mL of 2 × PBS. Viruses were pelleted by ultracentrifugation (229,600 × *g* for 1 h at 4 °C), resuspended in 0.1 mL of 1 × PBS, and stored at −80 °C until analysis.

Nucleic acid extraction

The nucleic acids from viral concentrates obtained from water and faecal samples were extracted following the manufacturer's instructions of QIAamp Viral RNA Mini Kit® (Qiagen, Valencia, Spain). Each sample was eluted in a final volume of 80 μL.

Enzymatic amplification

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Testing was carried out on 10 μL of neat and 10-fold dilutions of each RNA for the specific detection of HEV and HAV genomes. Water and faecal samples were tested for evidence of HEV by RT-PCR using two different sets of primers: primers targeting HEV ORF2 (Erker *et al.* 1999) (semi-nested RT-PCR) and a new set of primers targeting ORF1 (Johne *et al.* 2010) (nested RT-PCR) capable of detecting a wider spectrum of HEV types, including mammalian and avian HEV. For HAV detection, the non-coding region of the 5′ end was used, based on a protocol previously described (Pina *et al.* 2001) (nested RT-PCR). Positive and negative controls extracted in parallel and inhibition controls were added to the PCR assays. The results of the PCRs using OneStep® RT-PCR kit (Qiagen) for a typical one-step reaction, and the 50 μL reaction mixture containing PCR Gold Buffer, 1.2 mM $MgCl_2$ and 2 U of AmpliTaq® Gold (Applied Biosystems, New Jersey, USA), for a second PCR amplification cycle were analysed by electrophoresis on agarose gels to 2% (w/v) followed by staining with ethidium bromide at 0.5 μg/mL. The amplicons were viewed using an Image Master® VDS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Quantitative polymerase chain reaction

Human faecal contamination was quantified using HAdV as a viral indicator of human faecal contamination (Albinana-Gimenez *et al.* 2009b). For the specific detection and quantification of HAdV, 10 μL of the extracted DNA samples and of their 10-fold dilutions were assayed; these dilutions were carried out in order to avoid amplification inhibition due to the high sensitivity of the assay to the inhibitors.

Quantitative PCR amplification reactions for HAdV were carried out using TaqMan® Universal PCR Master Mix reagents (Applied Biosystems), as previously described (Jothikumar *et al.* 2005; Bofill-Mas *et al.* 2006). Ten microlitre aliquots of the nucleic acid extractions were analysed, corresponding to 21.8 mL of water sample. Dilutions from 10^{-1} to 10^{7} genomic copies (GC)/10 μL of the standard were analysed in triplicate.

Standard precautions were taken in all PCR assays by using separate areas for the diverse steps of the protocols. Negative controls, inhibition controls and positive controls were added in each assay. Positive results were confirmed by sequencing analysis of the amplified DNA. The qPCRs were conducted in a thermocycler Stratagene® MX3000P (Stratagene, La Jolla, USA). All of the samples and their respective dilutions were analysed in duplicate.

Nested PCR (nPCR)

In order to verify the HAdV qPCR results and to characterize the strains present in the samples, the positive samples were analysed by nested PCR (nPCR) for further sequencing. A set of primers and PCR conditions previously described by Allard *et al.* (2001) were used.

Sequencing and analysis of viral genomes

Amplicons obtained with nPCR were purified using a QIAquick® purification kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Strands of the purified DNA amplicons were sequenced using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1® (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. Products were checked using an ABI PRISM 377 analyzer (Applied Biosystems) by the Scientific and Technical Services of the University of Barcelona. The sequences were compared with the nucleotide sequences present in the GenBank using the BLAST program of NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Faecal coliforms in the analysed samples

Bacteriological analyses were carried out on water samples after collection from the site when possible, by a membrane filtration method using a DelAgua test kit (DelAgua, Robens Centre, UK). After filtration, samples were incubated at 44.5 °C ± 0.5 °C on selective growth media. After

approximately 18 h, the colonies can be visualized on the filter paper.

Ethical considerations

The study performed in this manuscript was authorized by the Chadian Ministry of Public Health.

RESULTS

Incidence of AJS in Dar Sila camps

The review of EWARS surveillance data indicated that AJS outbreaks are more frequently detected during the rainy season, from May until October (Figure 2), although the incidence (cases/1,000 people/year) has been decreasing substantially since the outbreaks that took place in 2004.

However, in 2007 new arrivals from the regional conflict settled into two sites for IDPs near Goz Amir Refugee camp (20,149 people), Habilé site (25,340 people) and Aradib site (11,406 people). A significant attack rate of AJS affected the displaced population from Habilé (2.19%) and Aradib (2.77%) the same year, but not the neighbouring population of Goz Amir (0.08%) that had already been living in the area for 3 years.

In 2008, a new outbreak of AJS appeared in Dogdoré IDPs site (27,450 people), located very close to the border with Sudan (Figure 1) with an attack rate of 2.96%.

The periodicity pattern for the last 5 years showed no consecutive outbreaks in the same site. All the data is summarized in Table 1.

Table 1 | Incidence of acute jaundice syndrome (cases/1,000 people/year) in Dar Sila camps

Camp/site	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Goz Amir	**64.9**	0.62	0.37	0.84	7.37	0.40
Dogdoré	–	–	0.44	3.16	**29.60**	0.77
Djabal	9.51	3.68	0.13	1.94	4.53	1.00
Aradib	–	–	–	**27.70**	1.90	0.23
Habilé	–	–	–	**21.86**	0.44	0.00

Source: WHO office Abéché, Chad. Bold numbers mark the significative episodes of the Acute Jaunice Syndrome (AJS).
–, No epidemiological data available.

Presence of human faecal contamination in water samples

The level of human faecal contamination of the sampling sites was evaluated by determining the concentration of HAdV. Furthermore, levels of faecal coliforms were evaluated when possible.

Human adenovirus was detected in one of seven analysed water samples (14.3%) from Goz Amir and in three of nine analysed water samples from Dogdoré (33%). The values recorded were 6.82×10^1 GC/L and 1.94×10^2 GC/L (SD = 1.87×10^2 GC/L) of water tested in Goz Amir and Dogdoré, respectively (Table 2).

One out of four positive HAdV sequences detected by amplification of the hexon region (171 pb) was genotyped. The DNA sequence obtained from Dogdoré was compared with sequences described in previous studies from the GenBank data base, showing a 90% similarity to human adenovirus D.

All the tested samples for faecal coliforms showed positives results. The water samples from Dogdoré (4/9) and Goz Amir (6/7) ranged from >50 to 3 colony forming units per 100 mL, although some analysis were performed at the same location but on a different date for the collection of water used for virus analysis (Table 2).

HEV and HAV in analysed samples

HEV and HAV were not detected in any water sample neither from the Dogdoré site for IDPs nor from the Goz Amir Refugee Camp. The negative results cannot be related to methodological problems, since controls and sewage samples from a diverse range of geographical areas (Spain, Egypt, Ethiopia, etc.) were analysed simultaneously and gave positive results for HEV and HAV (data not shown). This information indicates the role of sewage as a potential source of contamination for HAV and HEV, even in the absence of outbreaks among the population.

Pooled stool samples obtained from 28 donkeys from the Goz Amir Camp tested negative for HEV by nested-PCR.

Table 2 | Microbiological analyses from water sources

Camp/site	Sampling location	Turbidity (NTU)[a]	qPCR HAdV (GC/L)[b]	Faecal coliforms (CFU/100 mL)[c]
Dogdore	Water taken directly from the river	>2,000	<10	No data
	Water drilled from 7 m deep river	<5	4.1×10^2	No data
	Water taken after UV treatment (station)	<5	<10	No data
	Tap from pipeline UV system (in the site)	<5	8×10^1	No data
	Open well, 8 m deep	100	<10	>50[d]
	Open well, 6 m deep	100	<10	>50[d]
	Traditional well	50	<10	No data
	Borehole, 60 m deep, centre village	<5	9.27×10^1	14[d]
	Borehole, 60 m deep	<5	<10	3[d]
Goz Amir	Water taken directly from the river	>2,000	<10	No data
	Well no. 2	<5	<10	13
	Well no. 6	<5	<10	>50
	Well no. 4	<5	6.82×10^1	20
	Borehole sector 6	<5	<10	>50
	Borehole sector 5	<5	<10	10
	Borehole market	<5	<10	30

[a]NTU: Nephelometric turnidity units.
[b]GG: Genomic copies per litre.
[c]CFU: Colony forming units.
[d]Faecal coliforms analysis were performed at the same location but different date (within the last month).

DISCUSSION

The high incidence of AJS in 2004 when the refugees arrived is probably due to their impaired health status due to poor living conditions, extremely unsafe sanitary conditions, and poor access to food and safe drinking water. The main hypothesis to explain the reduction of the incidence is that all of these aspects have improved with the presence of humanitarian organizations working in the camp and therefore, decreasing the vulnerability of those populations. UV treatment for drinking water was established in Dogdoré and in Goz Amir chlorination systems have been in place since 2007.

However, in 2008 in Dogdoré, an outbreak with a significant attack rate (29 cases/1,000 people/year) was reported. This site, near the border with Sudan, is one of the most vulnerable in terms of security, resulting in the evacuation of humanitarian organizations that are working in Dogdoré and often leading to intermittent assistance to the vulnerable population during rebel attacks. The possibility that the disinfection process applied in Dogdoré might not be efficient enough for the inactivation of HEV has also been considered. Dogdoré is the only settlement using UV treatment, whereas other camps use chlorination systems. There is no experimental data available which analyse the effect of chlorine or UV on the viability of HEV. The WHO recommends treatments with a free chlorine residual of at least 0.5 mg/L for 30 min (pH 8.0), with mean turbidity not exceeding five nephelometric turbidity units (WHO 2002). HAV has been demonstrated to be inactivated by chlorine (Li *et al.* 2002) suggesting that free chlorine could have the same effect on HEV. This controversy highlights the importance of further laboratory studies on the inactivation of HEV.

The pattern of those outbreaks – never seeing two consecutive outbreaks in the same camp – supports the hypothesis that the infection may confer immunity to the population for at least a year following an outbreak (Purdy & Krawczynski 1994).

This is the first time an attempt has been made to isolate HEV in water from an unstable setting, as in the situation in Eastern Chad, through a prompt screening of drinking-water points. Although sophisticated laboratory technology is needed for such testing, it is rarely performed even in stable settings. Even though HEV was not found, this study has provided a picture of the potential risk for viral contamination that exists in sources of drinking water and given additional information about water quality within the camps.

The limited available data on faecal coliforms observed suggest the presence of faecal contamination in some water samples before the disinfection treatment; however, more specific information on the viral contamination of human origin would be provided by the viral parameters analysed. The lack of correlation observed between faecal coliforms and viral contamination in the few samples where these data are available, is not conclusive, but this lack of correlation has also been described in previous studies (Pina *et al.* 1998).

The low numbers and negative results obtained from the viruses studied would suggest that the drinking water available in the camps has good microbiological quality even during the rainy season. This information is in agreement with the observation that only a few sporadic cases of AJS were detected in the population during the months of the study. The presence of low levels of HAdV in 4 out of 16 samples indicates that the routes of faecal contamination in groundwater may still exist. Moreover, possible failures in the drinking water treatment and/or increased excretion of hepatitis viruses related to the arrival of new population could be related to future water-borne hepatitis outbreaks in the population.

Additional research is needed to better understand the role of domestic animals in transmission or as reservoirs of HEV, considering the negative results for HEV obtained in the faecal samples from donkeys analysed.

During the rainy season, the Bahr Azoum, a seasonal river that runs through the two camps, studied increases its flow and could become a potential source of transmission of water-borne infections by direct consumption from the surface water or by filtration to the groundwater. However, the negative results for viral contamination in the river observed would be in accordance with the lack of identified discharges of sewage into the river in the context of the region. Inactivation has not been observed in the qPCR assays for HAdV when one-fold and two-fold dilutions were analysed.

Even in industrialized countries, studies of rivers have shown significant levels of HAdV, as several towns or cities discharge treated and/or untreated wastewater to rivers; for example, Albinana-Gimenez *et al.* (2006) reported mean concentrations of 10^2 GC/L.

According to the results of the present study, the most probable hypothesis is that faecal contamination detected in the positive ground water samples could have originated from within the camp, since the wastewater generated is accumulated in latrines that could contaminate the groundwater, especially during the rainy season. Moreover, the geological properties of the soil presented a high porosity, therefore, increasing the risk of seepage of microorganisms from the latrines to the shallow groundwater.

However, in general, the levels of human contamination in the drinking water sources are low, indicating satisfactory management of the camps on the part of the humanitarian organizations. Nevertheless, with human contamination indicators we could identify possible risk sources which can be potential infection points in epidemic periods.

CONCLUSIONS

The analysis of viruses in this study has provided useful information that may not be obtained using the bacterial indicators described in international standards. The number of samples collected was limited and HEV was not detected in the environmental samples tested (water and donkey faeces). This observation is in accordance with the absence of a significant number of cases of AJS during the specific period studied. However, the presence of human adenoviruses at low levels in some of the water sources studied indicates that potential routes of faecal contamination for water-borne viruses may exist.

ACKNOWLEDGEMENTS

Intermon Oxfam in collaboration with the Laboratory of Enviromental Virology from the University of Barcelona performed and co-funded this study. We thank Médicine Sans Frontiers (MSF) in Dogdoré for their support. We would also like to thank the WHO Office in Abéché and the Chadian Ministry of Health for their collaboration in this study. During the development of this study Anna Carratala and Jesus Rodriguez-Manzano were fellows of the MICINN of the Spanish Government (Ministerio de Ciencia e Innovación, programa FPI). We thank

Foundation CyO,7 for their support in covering travel expenses.

REFERENCES

Aggarwal, R. & Naik, S. 2009 Epidemiology of hepatitis E: current status. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **24**, 1484–1493.

Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F. & Girones, R. 2006 Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7416–7422.

Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J. M., Courtois, S. & Girones,, R. 2009a Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J. Virol. Methods* **158**, 104–109.

Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M. P., Calgua, B., Huguet, J. M., Matia, L. & Girones, R. 2009b Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res.* **43**, 2011–2019.

Allard, A., Albinsson, B. & Wadell, G. 2001 Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 498–505.

Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M. & Girones, R. 2006 Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7894–7896.

Clemente-Casares, P., Pina, S., Buti, M., Jardi, R., Martln, M., Bofill-Mas, S. & Girones, R. 2003 Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 448–454.

Clemente-Casares, P., Rodriguez-Manzano, J. & Girones, R. 2009 Hepatitis E virus genotype 3 and sporadically also genotype 1 circulate in the population of Catalonia, Spain. *J. Water Health.* **7**, 664–673.

Coursaget, P., Buisson, Y., N'Gawara, M. N., Van Cuyck-Gandre, H. & Roue, R. 1998 Role of hepatitis E virus in sporadic cases of acute and fulminant hepatitis in an endemic area (Chad). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**, 330–334.

Dalton, H. R., Bendall, R., Ijaz, S. & Banks, M. 2008 Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet. Infect Dis.* **8**, 698–709.

Erker, J. C., Desai, S. M. & Mushahwar, I. K. 1999 Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J. Virol. Methods.* **81**, 109–113.

FitzSimons, D., Hendrickx, G., Vorsters, A. & Van Damme, P. 2009 Hepatitis A and E: update on prevention and epidemiology. *Vaccine* **28**, 583–588.

Goldsmith, R., Yarbourgh, P. O., Reyes, G. R., Fry, K. E., Gabor, K. A., Kamel, M., Zakaria, S., Amer, S. & Gaffar, Y. 1992 Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of acute sporadic hepatitis E in Egyptian children. *Lancet* **339**, 328–331.

Guthmann, J. P., Klovstad, H., Boccia, D., Hamid, N., Pinoges, L., Nizou, J. Y., Nicand, E. & Guerin, P. J. 2006 A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 1685–1691.

Hyams, K. C., McCarthy, M. C., Kaur, M., Purdy, M. A., Bradley, D. W., Mansour, M. M., Gray, S., Watts, D. M. & Carl, M. 1992 Acute sporadic hepatitis E in children living in Cairo, Egypt. *J. Med. Virol.* **37**, 274–277.

Ippagunta, S. K., Naik, S., Sharma, B. & Aggarwal, R. 2007 Presence of hepatitis E virus in sewage in Northern India: frequency and seasonal pattern. *J. Med. Virol.* **79**, 1827–1831.

Johne, R., Plenge-Bönig, A., Hess, M., Ulrich, R. G., Reetz, J. & Schielke, A. 2010 Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.* **91**, 750–758.

Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Hill, V. R., Lu, X., Sobsey, M. D. & Erdman, D. D. 2005 Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3131–3136.

Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J. M., Ouezzani, L., Péron, J. M., Guitard, J., Cointault, O., Esposito, L., Abravanel, F., Danjoux, M., Durand, D., Vinel, J. P., Izopet, J. & Rostaing, L. 2008 Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **358**, 811–817.

Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L. & Chao, F. H. 2002 Mechanisms of inactivation of hepatitis a virus by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4951–4955.

Martin, A. & Lemon, S. M. 2006 Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology* **43**, 164–172.

Nicand, E., Armstrong, G. L., Enouf, V., Guthmann, J. P., Guerin, J. P., Caron, M., Nizou, J. Y. & Andraghetti, R. 2005 Genetic heterogeneity of hepatitis E virus in Darfur, Sudan, and neighboring Chad. *J. Med. Virol.* **77**, 519–521.

Pavio, N., Renou, C., Di Liberto, G., Boutrouille, A. & Eloit, M. 2008 Hepatitis E: a curious zoonosis. *Front. Biosci.* **13**, 7172–7183.

Pina, S., Buti, M., Jardí, R., Clemente-Casares, P., Jofre, J. & Girones, R. 2001 Genetic analysis of the hepatitis A virus strains recovered from the environment and from acute hepatitis patients. *J. Gen. Virol.* **82**, 2955–2963.

Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre,, J. & Girones, R. 1998 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.

Purcell, R. H. & Emerson, S. U. 2008 Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* **48**, 494–503.

Purdy, M. A. & Krawczynski, K. 1994 Hepatitis E. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* **23**, 537–546.

Rodriguez-Manzano, J., Miagostovich, M., Hundesa, A., Clemente-Casares, P., Carratala, A., Buti, M., Jardi, R. & Girones, R. 2010 Analysis of the evolution in the circulation of HAV and HEV in Eastern Spain by testing urban sewage samples. *J. Water Health* **8**, 346–354.

Teshale, E. H., Howard, C. M., Grytdal, S. P., Handzel, T. R., Barry, V., Kamili, S., Drobeniuc, J., Okware, S., Downing, R., Tappero, J. W., Bakamutumaho, B., Teo, C. G., Ward, J. W., Holmberg, S. D. & Hu, D. J. 2010 Hepatitis E epidemic, Uganda. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 126–129.

UNHCR 2009 *UNHCR Global Report 2008 - Chad-Sudan Situation*. http://www.unhcr.org/4a2d200a2.html

Vilaginès, P., Sarrette, B., Husson,, G. & Vilaginès, R. 1993 Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Water Sci. Technol.* **27**, 199–306.

WHO (World Health Organization) 2002 *Guidelines for drinking-water quality*. 2nd ed. Addendum. Microbiological agents in drinking water. Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/microbioladd/en/index.html (accessed 18 May 2011).

First received 2 July 2010; accepted in revised form 19 March 2011. Available online 2 June 2011

Annex II. Guia tècnica per les intervencions WaSH en epidèmies causades pel VHE

Technical Brief Hepatitis E Outbreak Response

Oxfam International

2014

OXFAM

Humanitarian INNOVATION FUND HIF

TECHNICAL BRIEF HEPATITIS E OUTBREAK RESPONSE

December 2014

This technical briefing note documents the current knowledge on Hepatitis E transmission routes and discusses the issues on the potential methods of response and prevention.

Introduction

Hepatitis E Virus (HEV) is an emerging waterborne virus endemic in regions with poor/limited sanitation and hygiene, including large parts of Asia, Africa and South America.

The WHO estimates there are 3 million acute cases of HEV, and 56,600 HEV-related deaths per year (WHO 2014). HEV can lead from medium- to large-sized waterborne outbreaks, thereby causing a large proportion of cases with acute hepatitis.

The most recent example is the HEV outbreak that has spread across South Sudan between 2012-14, with over 10000 cases and cross-border infection into neighboring countries; including 367 cases in South-Sudanese refugee camps in Ethiopia (UNHCR 2014).

When such outbreaks occur, the humanitarian personnel in the area may have had little previous experience of handling this disease and its outbreaks. The consequent lack of preparedness can lead to much concern in the population, and unclear responses from field workers. As **there are currently no curative therapies for Hepatitis E infection, prevention is the key intervention to limit the impact of this deadly disease**. This technical brief uses current research on Hepatitis E to provide recommendations for prevention and how this can be translated into field actions for HEP E outbreak responses among WaSH teams. It aims to highlight best approaches for early detection and integration of preventative strategies into WaSH (and other) interventions. This brief does not provide an in depth discussion of the current research, however relevant research literature is cited within.

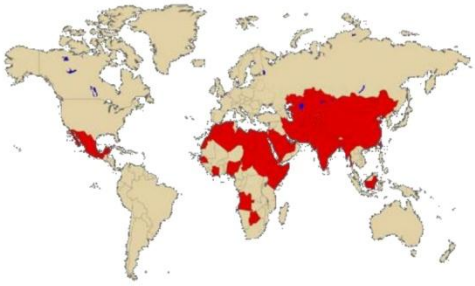


Figure: Geographic distribution of HEV reported outbreaks (Source: CDC)

Fecal-oral route is the predominant mode of transmission of HEV, so clearly, measures aimed at proper treatment of drinking water, safe disposal of human excreta and improvement in personal hygiene are the keystones for its control. **This document tries to address various issues related to prevent Hepatitis E outbreaks that may be of interest to WASH professionals.**

Hepatitis E Virus

Hepatitis E is usually an acute, self-limiting illness, similar in clinical presentation to hepatitis A. **The clinical manifestations of HEV** can extend from **asymptomatic infection, estimated in 73% of HEV infections, to acute viral hepatitis (17%) and acute liver failure (2%).** Hepatitis E is distinguishable from other hepatitis due to a high attack rate in young adults and an

Key facts of Hepatitis E Virus (HEV)

. HEV is a waterborne pathogen
. HEV causes an acute liver disease with a mortality rate of 2% in general population but 20-30% in pregnant women
. HEV has a long incubation period (4-10 w.)
. Natural immunity in humans after HEV-infection has been shown to be highly variable.

increased morbidity and mortality in pregnant women. **Symptomatic, infected pregnant women experience a case-fatality rate (CFR) as high as 20-30%,** whereas the CFR in the general population is between 1 to 2% (Rein et al. 2012). The largest proportion of HEV infections globally are acquired by the fecal–oral route; however other routes have been described: parenteral transmission and vertical transmission from mother to child (Mirazo et al. 2014).

An **incubation period of 4-10 weeks has been reported during Hepatitis e outbreaks** in which the time of water contamination was known (Kumar et al. 2013).

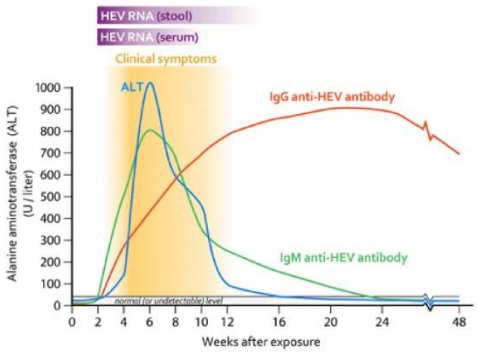


Figure: Hepatitis E Virus Infection pattern (Source: Krain JL. 2014)

Excretion in stool of infective HEV by patients with acute hepatitis E generally **persists for less than a month following symptom onset.**

Once the disease is acquired (asymptomatic or symptomatic) the persistence of anti-HEV IgG and its **ability to prevent reinfection by natural immunity in humans is highly variable and in some studies has been observed to be around 24 months** (Krain et al. 2014).

Epidemiology

The epidemiology of Hepatitis E spans from sporadic or subclinical infections to large waterborne outbreaks with tens of thousands of cases.

Human genotype 1 and 2, found throughout Asia and North and Central Africa, has been the major cause of water-borne epidemics and significant sporadic disease whereas genotypes 3 and 4 are primarily zoonotic (wild and domestic pigs, deer and mongooses are reservoir of HEV) cause sporadic human disease.

Outbreaks are most common and frequent in tropical and subtropical regions and are usually separated by a few years. Such outbreaks have been observed in China, the Indian subcontinent, southeast and central Asia, the Middle East, and the northern and western parts of Africa. These outbreaks are usually large, and several hundred to several thousand persons are affected. Overall **attack rates** during Hepatitis e outbreaks range **from 1% to 15%**, with males outnumbering females in most of them (Kumar et al. 2013).

Evidence of fecal contamination of drinking water supplies has been associated with several outbreaks. **Outbreaks occur** most frequently during the **rainy season**, due to overflowing drains and the use of contaminated water for drinking (Mirazo et al. 2014). Moreover, several epidemiological and environmental studies in refugee camps have shown **increased risk of transmission at household level**. Studies during HEV outbreaks in South Sudan refugee camps described lack of obvious point-sources of infection and water storage contaminated by viruses at household level (Epicentre 2013). Moreover, a case-control study carried out in last HEV outbreak in Uganda has found major risk factors of infection in variable

related to hygiene practices at household level (Teshale et al. 2010). Overall, findings suggest that, in outbreaks scenarios, **transmission may be multi-factorial and include household level**. However, the long incubation period of the disease hinders the identification of consistent risk factors or sources of infection.

Endemic areas & those at risk

Regarding the risk of an outbreak in refugee or internal displaced camps, it is very important to evaluate the risk and vulnerability of the displaced population considering endemicity of population origin and hosting area (check CDC map: Levels of endemicity for HEV)

When people migrate from a low into a high HEV-endemic area there is a greater risk to be impacted by an HEV outbreak due to the new exposure to this virus. For populations moving from an high into low HEV-endemic area, the risk also has to be considered due to the changes into the living conditions in the camps (density, water access, sanitation…) leading to a higher exposure and therefore higher transmission. Given the incubation period, this might not be visible immediately following the population afflux; however prevention measures should be implemented immediately.

Prevention measures

Shedding of enterically excreted HEV into the environment from infected patients plays a major role in HEV transmission. As stated, there is no specific treatment available; therefore the most effective method for prevention is access to clean water and sanitation.

Monitoring, Control & Case Detection

In endemic areas or areas at risk, HEV incidence and mapping should be in place as soon as possible. Water quality surveillance, including viral indicators in drinking water sources, should be ongoing (Guerrero-Latorre et al. 2011). Furthermore, increased monitoring & precaution should be implemented with any new population movements or flooding events.

Sensitization, promotion & awareness raising activities should include key messaging related to the risks of HEV.

Hygiene promotion training for health workers should include the virus cycle, risks, warning signs and monitoring to improve prevention & early detection.

Water quality & treatment

The preventive measures need to focus primarily on ensuring supply of safe drinking water at household level:

- Chlorination of all sources of drinking water to **ensure residual chlorine levels of 0.3–0.6 mg/l is the most adequate treatment as its effectivity has been recently evidenced in laboratory studies showing a 99% of HEV inactivation** with at least 1 minute of contact time at a concentration of 0.41 mg/l (Girones et al. 2014).
- Reinforce household monitoring of residual chlorine to avoid water recontamination.
- Suggested UV treatment shows to be also effective towards HEV at laboratory level (data not published) but no residual effect implies less protection.
- Boiling has also been proved to be effective towards HEV, showing 99% reduction at 60ºC during 1h (Emerson et al. 2005).

OXFAM

Humanitarian INNOVATION FUND HIF

TECHNICAL BRIEF HEPATITIS E OUTBREAK RESPONSE December 2014

Sanitation

As with other viral outbreaks, prevention measures include reduction / elimination of open defecation and contamination of water sources. This may involve: clean up campaigns where lime is spread on the open defecation and it is removed: latrine construction programmes and the promotion of the use and maintenance of the toilets. Hand Washing after defecation and before eating also plays a critical role.

In areas endemic for HEV, there is a greater argument and need to emphasize the risks linked with open defecation and protection of groundwater sources from latrines (with a security radio of 30m), especially during raining season.

If there is a population influx, immediate action should be taken to ensure that newcomers have access to safe sanitation.

Hygiene Promotion campaigns

Hygiene training in endemic areas must include information on HEV, its pattern, early warning & best prevention.

Following any population movement in an endemic / high risk area, immediate precaution and monitoring should take place.

Considering the major risk of fatality in pregnant women, there should be a strong effort on both providing information and the opportunity for discussion with this highly vulnerable group. Working with health and antenatal care actors and women's group should be envisaged.

Ensuring that access to safe water and sanitation is available is the key. Given the risk of poor water handling at household level, while on site water treatment should be ongoing, it is also advisable to provide water treatment at household level.

Sensitization for proper household water treatment (include water storage) should be emphasized.

Furthermore, ensuring that households have access to clean water storage options (jerrycans) is necessary to ensure that water is safe from collection to ingestion.

Key Prevention Measures

.Evaluate the risk of new settlements in endemic areas
.Monitoring water quality (viral indicators)
.Ensure water treatment at the source: chlorination is the most adequate treatment, although UV and boiling can also be used
. Avoid open defecation
. Reinforce hygiene messages for correct water storage, hand washing and food handling
. Protect major risk group: pregnant women

References

CDC Hepatitis E Information for Health Professionals. Page last updated: September 17, 2012

Emerson S. et al 2005. Thermal Stability of Hepatitis E Virus. Journal Infect Diseases. doi: 10.1086/432488

Epicentre. Hepatitis E Outbreak in Yusuf Batil refugee camp Maban County, Upper Nile State, South Sudan, 2012-13. Mediciens Sans Frontieres 2013.

Girones R. et al 2014. Chlorine inactivation of hepatitis E virus and human adenovirus 2 in water. Journal of Water and Health. In Press. doi:10.2166/wh.2014.027

Guerrero-Latorre, L. et al., 2011. Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. Journal of water and health. doi: 10.2166/wh.2011.126.

Krain JL. et al 2014. Host Immune Status and Response to Hepatitis E Virus Infection. Clin. Microbiol. Rev. doi: 10.1128/CMR.00062-13

Kumar, S. et al., 2013. Hepatitis E virus: the current scenario. Inter. journal of infectious diseases. doi: 10.1016/j.ijid.2012.11.026

Mirazo, S. et al., 2014. Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. Hepatic medicine : evidence and research, doi: 10.2147/HMER.S63417.

Rein, D.B. et al., 2012. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. Hepatology (Baltimore, Md.). doi: 10.1002/hep.25505

Teshale EH et al 2010. Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. Clinical Infectious Diseases. doi: 10.1086/651077.

UNHCR 2014. Field Brief: Hepatitis E Response In Refugee Settings.

UNHCR 2014. UNHCR steps up measures to rein in Hepatitis E among South Sudanese refugees in Ethiopia. Briefing Notes, 8 August 2014

WHO 2014 .Hepatitis E. Fact sheet n°280. Updated June 2014.

Annex III. Altres publicacions

Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improvingthe control of reclaimed water

J. Rodriguez-Manzano, J.L. Alonso, M. A. Ferrús, Y. Moreno, I. Amorós, B. Calgua, A. Hundesa, **L. Guerrero-Latorre**, A. Carratala, M. Rusiñol, R. Girones.

Water Science and Technology. 2012; 66(12):2517-23

Environmental Effectors on the Inactivation of Human Adenoviruses in Water

Carratalà A, Rusiñol M, Rodriguez-Manzano J, **Guerrero-Latorre L**, Sommer R, Girones R.

Food and Environmental Virology. 2013; 5(4): 203-214

UVC Inactivation of dsDNA and ssRNA Viruses in Water: UV Fluences and a qPCR-Based Approach to Evaluate Decay on Viral Infectivity

Calgua B, Carratalà A, **Guerrero-Latorre L**, de Abreu Corrêa A, Kohn T, Sommer R, Girones R.

Food and Environmental Virology. 2014; 6(4): 260-8.

Standard and new faecal indicators and pathogens in sewage treatment plants, microbiological parameters for improving the control of reclaimed water

J. Rodriguez-Manzano, J. L. Alonso, M. A. Ferrús, Y. Moreno, I. Amorós, B. Calgua, A. Hundesa, L. Guerrero-Latorre, A. Carratala, M. Rusiñol and R. Girones

ABSTRACT

This study involved collaboration between three centres with expertise in viruses, bacteria and protozoa. The focus of the research was the study of the dissemination and removal of pathogens and faecal indicators in two sewage treatment plants (STP1 and STP2) using tertiary treatments. Samples were collected over a period of five months through the sewage treatment processes. Analysis of the samples revealed that the plants were not efficient at removing the faecal indicators and pathogens tested during the study. From entry point (raw sewage) to effluent level (tertiary treatment effluent water), the experimental results showed that the reduction ratios of human adenoviruses were 1.2 $\log_{10}$ in STP1 and 1.9 $\log_{10}$ in STP2. Whereas for *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. the reduction ratios were 2.3 $\log_{10}$ for both pathogens in STP1, and 3.0 and 1.7 $\log_{10}$ in STP2, respectively. Furthermore, the presence of faecal indicators and pathogens at different sampling points was evaluated revealing that the tested pathogens were present in reclaimed water. Human adenovirus and *Arcobacter* spp. showed positive results in infectivity assays for most of the tertiary effluent water samples that comply with current legislation in Spain. The pathogens detected must be evaluated using a risk assessment model, which will be essential for the development of improved guidelines for the re-use of reclaimed water.

Key words | efficiency removal, enteric pathogens, faecal indicators, sewage, tertiary treatment, treatment plant

J. Rodriguez-Manzano
B. Calgua
A. Hundesa
L. Guerrero-Latorre
A. Carratala
M. Rusiñol
R. Girones (corresponding author)
Department of Microbiology,
Faculty of Biology,
University of Barcelona. Av. Diagonal 643,
08028 Barcelona,
Spain
E-mail: *rgirones@ub.edu*

J. L. Alonso
I. Amorós
Research Institute of Water and Environmental Engineering,
Universidad Politécnica de Valencia,
Camino de Vera 14, 46022 Valencia,
Spain

M. A. Ferrús
Y. Moreno
Department of Biotechnology,
Universidad Politécnica de Valencia,
Camino de Vera 14, 46022 Valencia,
Spain

INTRODUCTION

Numerous studies have documented the presence of enteric pathogens in raw and treated sewage and, by using new molecular methods, new pathogens and potential indicators have also been described (Girones *et al.* 2010). Most pathogens found in environmental waters (rivers, lakes, seawater and groundwater) originate from contamination with sewage or directly with human or animal excreta. Although most pathogens can be removed by sewage treatment, many are discharged into the effluent and enter receiving waters, allowing their transmission through contaminated water. Many regions face water supply challenges due to water scarcity, resulting in an increased need for water re-use and for ways to solve water resource issues or create new sources of good quality water supplies.

Classic microbiological indicators such as faecal coliforms, *Escherichia coli* and enterococci are the most commonly analysed indicators used to evaluate the level of faecal contamination. However, whether these bacteria are suitable indicators of the occurrence and concentration of human viruses and protozoa cysts has been questioned (Lipp *et al.* 2001; Tree *et al.* 2003; Wéry *et al.* 2008). Compared with viral or protozoan pathogens, indicator bacteria are more sensitive to inactivation through treatment processes and exposure to sunlight (Hurst *et al.* 2002; Sinclair *et al.* 2009). Other limitations have been associated with their application: short survival compared with pathogens (McFeters *et al.* 1974), non-exclusive faecal source (Scott *et al.* 2002; Simpson *et al.* 2002), ability to multiply in some environments

doi: 10.2166/wst.2012.233

Food Environ Virol (2013) 5:203–214
DOI 10.1007/s12560-013-9123-3

ORIGINAL PAPER

Environmental Effectors on the Inactivation of Human Adenoviruses in Water

Anna Carratalà · Marta Rusiñol · Jesús Rodriguez-Manzano · Laura Guerrero-Latorre · Regina Sommer · Rosina Girones

Received: 5 June 2013 / Accepted: 2 August 2013 / Published online: 17 August 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Environmental factors are highly relevant to the global dissemination of viral pathogens. However, the specific contribution of major effectors such as temperature and sunlight on the inactivation of waterborne viruses is not well characterized. In this study, the effect of temperature (7, 20, and 37 °C), UVB and UVA radiation on viral inactivation was evaluated in phosphate buffered saline (PBS), mineral water, wastewater, 1,000-fold diluted wastewater and seawater. The stability of human adenoviruses infectivity, known as human pathogens and indicators of fecal contamination, was monitored during 24 h, both in the dark and exposed to UV radiation by immunofluorescence assays. In the dark, no Human adenovirus (HAdV) inactivation was observed in PBS and mineral water at any of the temperatures studied, whereas at 37 °C in reactors with higher microbial concentration (wastewater, diluted wastewater, and seawater), decays between 2.5 and 5 log were recorded. UVB radiation showed a dramatic effect on HAdV inactivation and 6-log were achieved in all reactors by the end of the experiments. The effect of UVA showed to be dependent on the water matrix analyzed. At 20 °C, HAdV showed a 2-log decay in all reactors radiation while at 37 °C, results in wastewater, diluted wastewater, and seawater reactors were equivalent to those observed in the dark. These results suggest UVB radiation as the major environmental factor challenging viral inactivation, followed by biotic activity indirectly associated to higher temperatures and finally, by UVA radiation.

Keywords UVA · UVB · Temperature · Microorganisms · Inactivation · Viruses · Water · Infectivity

A. Carratalà · M. Rusiñol · J. Rodriguez-Manzano · L. Guerrero-Latorre · R. Girones (✉)
Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain
e-mail: rgirones@ub.edu

Present Address:
A. Carratalà
Laboratory of Environmental Chemistry, School of Architecture, Civil and Environmental Engineering (ENAC), 1015 Lausanne, Switzerland

R. Sommer
Water Hygiene, Medical University Vienna, Institute for Hygiene and Applied Immunology, Vienna, Austria

Introduction

Wastewater and contaminated water used for irrigating, drinking, and recreational purposes has been widely linked with the transmission of infectious viral diseases among human populations (McKinney et al. 2006; ter Waarbeek et al. 2010; Riera-Montes et al. 2011; Nenonen et al. 2012). Viral pathogens are frequently released in stool and urine in high numbers, and may contaminate surface and coastal waters establishing an important route for their transmission and a public health concern.

It is widely accepted that the stability of a virus is key to its capability to remain infectious over time in the environment or after disinfection treatments and consequently, to spread and cause disease. In particular, a high stability has been reported for certain enteric viruses in a range of environmental conditions and after various disinfection treatments (Carter 2005). However, it is known that viral pathogens may be naturally inactivated, by both abiotic and biotic factors (Gordon and Toze 2003; Bertrand et al. 2012).

Sunlight is known as a challenge to the persistence of viruses (Viau et al. 2011; Boehm et al. 2009) and it has been

Food Environ Virol
DOI 10.1007/s12560-014-9157-1

ORIGINAL PAPER

UVC Inactivation of dsDNA and ssRNA Viruses in Water: UV Fluences and a qPCR-Based Approach to Evaluate Decay on Viral Infectivity

Byron Calgua · Anna Carratalà · Laura Guerrero-Latorre · Adriana de Abreu Corrêa · Tamar Kohn · Regina Sommer · Rosina Girones

Received: 15 January 2014 / Accepted: 4 June 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Disinfection by low-pressure monochromatic ultraviolet (UVC) radiation (253.7 nm) became an important technique to sanitize drinking water and also wastewater in tertiary treatments. In order to prevent the transmission of waterborne viral diseases, the analysis of the disinfection kinetics and the quantification of infectious viral pathogens and indicators are highly relevant and need to be addressed. The families *Adenoviridae* and *Polyomaviridae* comprise human and animal pathogenic viruses that have been also proposed as indicators of fecal contamination in water and as Microbial Source Tracking tools. While it has been previously suggested that dsDNA viruses may be highly resistant to UVC radiation compared to other viruses or bacteria, no information is available on the stability of polyomavirus toward UV irradiation. Here, the inactivation of dsDNA (HAdV2 and JCPyV) and ssRNA (MS2 bacteriophage) viruses was analyzed at increasing UVC fluences. A minor decay of 2-logs was achieved for both infectious JC polyomaviruses (JCPyV) and human adenoviruses 2 (HAdV2) exposed to a UVC fluence of 1,400 J/m^2, while a decay of 4-log was observed for MS2 bacteriophages (ssRNA). The present study reveals the high UVC resistance of dsDNA viruses, and the UV fluences needed to efficiently inactivate JCPyV and HAdV2 are predicted. Furthermore, we show that in conjunction with appropriate mathematical models, qPCR data may be used to accurately estimate virus infectivity.

Keywords JC polyomavirus · Adenovirus · MS2 bacteriophage · qPCR · UV inactivation

Byron Calgua and Anna Carratalà have contributed equally to this work.

B. Calgua · A. Carratalà · L. Guerrero-Latorre · A. de Abreu Corrêa · R. Girones (✉)
Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain
e-mail: rgirones@ub.edu

A. Carratalà · T. Kohn
Laboratory of Environmental Chemistry, School of Architecture, Civil and Environmental Engineering (ENAC), École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), 1015 Lausanne, Switzerland

R. Sommer
Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Institute for Hygiene and Applied Immunology, Water Hygiene, Medical University Vienna, Kinderspitalgasse 15, 1095 Vienna, Austria

Introduction

Water has been widely related to the transmission of viral infectious diseases (McKinney et al. 2006; ter Waarbeek et al. 2011; Riera-Montes et al. 2011; Nenonen et al. 2012). Consequently, the implementations of disinfection treatments such as chlorine and ultraviolet radiation are key processes for preventing the transmission of viral pathogens on a global scale. In spite of the improvements in the control of the microbiological quality of water, viral outbreaks arising from the consumption of treated water have been identified. Notably, these treated waters were in compliance with current legislations, which are mainly based on bacteriological indicators (Godoy et al. 2006; Gerba et al. 1979; Brunkard et al. 2011; Albinana-Gimenez et al. 2009). Thus, the use of additional viral indicators to evaluate water quality has been suggested (Pina et al. 1998; Bofill-Mas et al. 2000; Albinana-Gimenez et al. 2009) and should be useful as a complementary parameter to be considered in forthcoming water regulations.

Published online: 22 June 2014