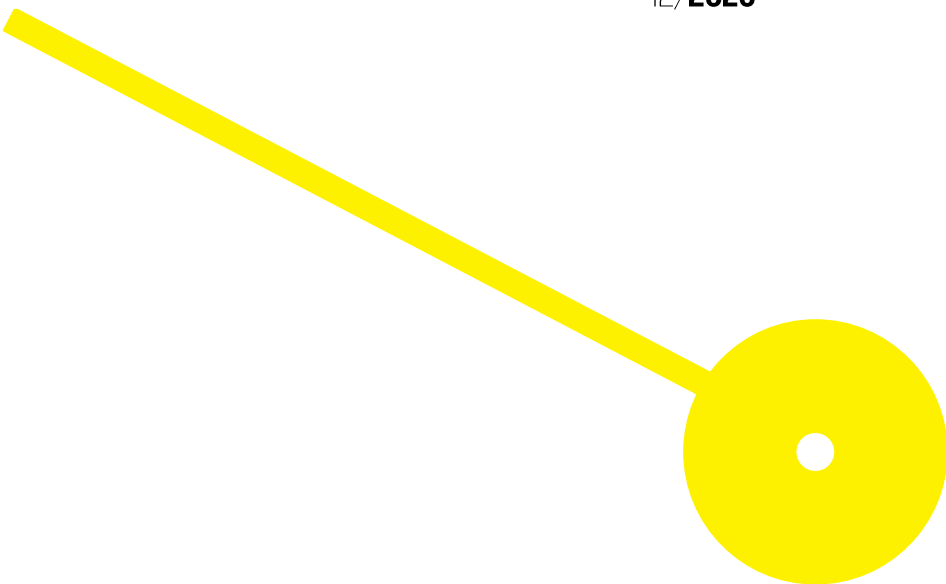




Deteção de Norovírus e vírus da Hepatite A em matrizes alimentares por RT-PCR

Lara Vanessa da Rocha Moura

12/2020





Deteção de Norovírus e vírus da Hepatite A em matrizes alimentares por RT-PCR

Autor

Lara Vanessa da Rocha Moura nº10110253

Orientadores

Prof. Doutor Ricardo Jorge Afonso Costa Magalhães

Professor associado da Universidade Fernando Pessoa

Maria Manuela Amorim de Silva e Sousa

Professor Especialista Análises Clínicas e Saúde Pública da ESS|PPorto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública** – Área de Especialização em **Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Tudo o que eu possa escrever aqui não será nunca suficiente para agradecer às pessoas que me ajudaram. Num ano inesperado como este, onde as dificuldades foram imensas, tenho de agradecer em primeiro lugar às minhas colegas de trabalho, nomeadamente a Sandra Jacinto, Marisa Nunes e Ana João, por me terem ajudado durante estes meses a selecionar, preparar e processar todas as amostras testadas e por terem assegurado o trabalho de maneira a eu ter algum tempo livre para trabalhar nesta dissertação. Sem elas, definitivamente que nada disto teria sido possível. Quero agradecer ainda à minha família, por nunca deixar de acreditar que eu seria capaz, mesmo nos momentos em que eu pensei que não conseguiria. Gostaria ainda de agradecer ao meu orientador, o Dr. Ricardo Magalhães por se ter mostrado sempre disponível e prestável ao longo do processo, contribuindo também para que esta dissertação fosse possível. Por fim, mas não menos importante, à Professora Manuela Amorim, por nunca ter perdido o contacto comigo e se ter disponibilizado sempre a ajudar para tudo o que fosse necessário. A todos eles, o meu muito obrigado, do fundo do meu coração, com a garantia de que nunca vou esquecer todo o esforço e dedicação que tiveram comigo.

Resumo

Introdução: Os vírus são responsáveis pelo maior número de casos de gastroenterite. A Organização Mundial da Saúde descreve os Norovírus (NoV) e o Vírus da Hepatite A (VHA) como as principais causas de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo.

Objetivo: Avaliar um método de extração já utilizado na rotina laboratorial, em produtos provenientes em meio de transporte viral, totalmente automatizado, para detetar a presença de NoV e VHA em matrizes alimentares suscetíveis, seguindo a norma ISO 15216-2:2019, pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR).

Materiais e Métodos: Foram realizados os procedimentos constantes na norma EN ISO 15216-2:2019 para a extração e quantificação de NoV e HAV em alimentos de alto risco. Para a deteção do vírus de controlo de processo e para a deteção dos vírus-alvo, foram adquiridos dois kits da marca Bioside.

Resultados: Foram selecionadas 143 amostras de matrizes alimentares de acordo com a norma ISO 15216-2:2019. Destas, apenas 64 foram extraídas com sucesso, tendo sido detetada a presença de NoV GI numa amostra de ostra.

Conclusão: Os resultados obtidos neste estudo, são sugestivos de não ser aconselhada a utilização deste método de extração com amostras de matrizes alimentares, uma vez que as taxas de extração foram baixas (44,7%). Este estudo deverá ser continuado dada a relevância da deteção destes vírus em matrizes alimentares.

Palavras-chave: norovírus, vírus hepatite A, deteção, RT-PCR, RNA, matrizes alimentares, extração

Abstract

Introduction: Viruses are responsible for the highest number of gastroenteritis cases. The World Health Organization describes Noroviruses (NoV) and Hepatitis A Virus (HAV) as the leading causes of foodborne diseases worldwide.

Objective: Evaluate an extraction method already used in laboratory routine, in products from viral transport medium, fully automated, to detect the presence of NoV and HAV in susceptible food matrices, following ISO 15216-2:2019, by real-time PCR (RT-PCR).

Materials and Methods: The procedures contained in EN ISO 15216-2:2019 were performed for the extraction and quantification of NoV and HAV in high-risk foods. For the detection of the process control virus and for the detection of target viruses, two Bioside kits were purchased.

Results: A number of 143 samples of food matrices were selected according to ISO 15216-2:2019. Of these, only 64 were successfully extracted, and the presence of NoV GI was found in an oyster sample.

Conclusion: The results obtained in this study are suggestive of not being advised to use this extraction method with samples of food matrices, since the extraction rates were low (44.7%). This study should be continued given the relevance of the detection of these viruses in food matrices.

Keywords: norovirus, hepatitis A virus, detection, RT-PCR, RNA, food matrices, extraction

Lista de Siglas e Abreviaturas

cDNA- cadeia de DNA complementar

CT- do inglês *cycle threshold*

FCV- calicivírus felino, do inglês *feline calicivirus*

HAV- Vírus Hepatite A, do inglês *Hepatitis A virus*

HEV- Vírus Hepatite E, do inglês *Hepatitis E virus*

IAC- Controlo Interno de Amplificação, do inglês *internal amplification control*

mRNA- ácido ribonucleico mensageiro , do inglês *messenger ribonucleic acid*

MNV-1- norovirus murinos

NoV- Norovírus

OMS- Organização Mundial da Saúde

ORF- sequências de leitura abertas, do inglês *Open Reading Frames*

PCR- Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PEG- polietilenoglicol

RT-PCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês *Real Time- Polymerase Chain Reaction*

VP1 – Proteína Viral, do inglês *Viral Protein 1*

Índice

1. Introdução.....	1
2. Fundamentação Teórica.....	2
2.1. Vírus vs. Alimentos.....	2
2.2. Matrizes alimentares suscetíveis.....	2
2.3. Métodos de disseminação e replicação dos vírus.....	3
2.4. Norovírus.....	4
2.4.1. Classificação e Nomenclatura.....	5
2.4.2. Estrutura da partícula viral.....	5
2.4.3. Patogénese e Replicação.....	5
2.4.4. Epidemiologia.....	6
2.4.5. Prevenção e Tratamento.....	6
2.5. Vírus da Hepatite A.....	7
2.5.1. Classificação e Nomenclatura.....	7
2.5.2. Estrutura da partícula viral.....	7
2.5.3. Patogénese e Replicação.....	7
2.5.4. Epidemiologia.....	8
2.5.5. Prevenção e Tratamento.....	8
2.6. Deteção por PCR em tempo real.....	9
3. Objetivos.....	10
4. Materiais e Métodos.....	10
4.1. Amostras: Matrizes alimentares em estudo.....	10
4.2. Recuperação e concentração das partículas virais.....	11
4.3. Extração RNA viral.....	12
4.4. Deteção de Nov GI e GII e VHA por RT-PCR.....	12
5. Resultados e Discussão.....	13
6. Conclusão.....	19
7. Referências Bibliográficas.....	20

Índice de Figuras

Figura 1: Amplificação específica do vírus de controlo de processo	14
Figura 2: Amostra de Ostra com amplificação específica de NoV GI e do controlo interno de amplificação (IAC).....	16
Figura 3: Amplificação específica do controlo interno de amplificação (IAC). NoV e HAV não detetados. Amostra relativa ao Controlo Negativo.....	16
Figura 4: Amplificação específica de NoV GI, GII, HAV e do controlo interno de amplificação (IAC). Amostra relativa ao Controlo Positivo.....	17

Índice de Tabelas

Tabela 1: Número de amostras das respetivas matrizes alimentares	11
Tabela 2: Número de amostras testadas em que foi possível amplificar o vírus de controlo de processo, validando o método de extração	13
Tabela 3: Resultados do ensaio correspondentes à deteção de NoV GI e GII e HAV nas amostras em estudo	15

1. Introdução

Ao longo dos últimos anos, tem vindo a verificar-se uma mudança gradual dos hábitos alimentares da população em geral. Com a quantidade de informação disponível atualmente e, conseqüentemente, a facilidade com que a obtemos, tem vindo a aumentar o interesse por dietas mais especializadas, que consistem no consumo de mais produtos não processados e frescos, bem como a necessidade de uma distribuição mais ampla e eficiente de bens alimentares. Devido a essas tendências, há uma variedade muito maior de produtos alimentares, disponíveis de forma mais abrangente, chegando assim a um maior número de pessoas.(1-4)

As doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados são um grande problema de Saúde Pública.(2) Se até à bem pouco tempo a grande preocupação se centrava nas bactérias, agora está claro que os vírus entéricos humanos, cuja transmissão é feita, essencialmente, por via fecal-oral, são um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos, havendo já mais de 100 vírus entéricos humanos reconhecidos.(1,5,6)

As gastroenterites referem-se a qualquer processo inflamatório da via entérica, embora o termo seja utilizado principalmente para descrever diarreia aguda, estas são frequentemente acompanhadas de vômitos, náuseas e dor abdominal.(4) Podem ser invasivas, não-invasivas ou inflamatórias. Embora os agentes de gastroenterite bacteriana sejam geralmente responsáveis pelos casos mais graves de gastroenterite invasiva, os vírus são responsáveis pelo maior número de casos, geralmente não-invasivos, chegando a ultrapassar as bactérias, pela primeira vez em 2014 nos Estados Unidos da América, como o principal agente causador de surtos de origem alimentar (20,4%).(4,7) Contudo, devido à inespecificidade dos sintomas, existe uma percentagem elevada de casos que não chegam a ser reportados.(8) Apenas uma parte das pessoas que ficam doentes depois de terem ingerido alimentos contaminados procuram assistência médica, e apenas uma fração desses casos é reconhecido como causado por um alimento contaminado, testado adequadamente, relatado pelas autoridades de saúde pública e registado em estatísticas oficiais de doenças. Para além disso, certas doenças crónicas como cancro, problemas renais ou hepáticos, aparecem muito tempo após a ingestão de alimentos contaminados, tornando a sua ligação causal difícil.(9) Acredita-se que o número de surtos virais provocados por alimentos excede o número atualmente relatado, estimando-se que pelo menos metade dos surtos de doenças virais transmitidas por alimentos não são reconhecidos devido aos métodos inadequados de amostragem e deteção.(10) Pode afirmar-se que existe um surto transmitido por alimentos quando se verifica a ocorrência de dois ou mais casos de doença semelhante resultante da ingestão de um alimento comum.(11)

Conseqüentemente, apesar dos alimentos estarem hoje em dia mais seguros do que nunca, as doenças transmitidas por alimentos ainda são uma causa importante de morbidade e mortalidade e os

vírus transmitidos por alimentos, encontrados no trato gastrointestinal humano, excretados nas fezes humanas e transmitidos pela via fecal-oral são reconhecidos como uma das principais prioridades no que diz respeito à segurança alimentar em todo o mundo.(4,12,13)

A Organização Mundial da Saúde (OMS), descreve os Norovírus (NoV) e o Vírus da Hepatite A (VHA) como as principais causas de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, sendo estes altamente contagiosos.(9,14) A OMS estima ainda que os NoV são a causa mais comum de doenças transmitidas por alimentos na Europa, com aproximadamente 15 milhões de casos e mais de 400 mortes por ano, seguido do VHA, com cerca de 100.000 casos de infecção e aproximadamente 200 mortes por ano.(9) A nível mundial, estima-se que o NoV esteja relacionado com cerca de 125 milhões de casos de doença, seguido do *Campylobacter spp*, com cerca de 96 milhões de casos.(15)

2. Fundamentação Teórica

2.1. Vírus vs. Alimentos

Como parasitas intracelulares obrigatórios, os vírus precisam de uma célula hospedeira susceptível, para poderem utilizar a sua maquinaria e o seu metabolismo de modo a conseguirem replicar-se.(16) Por esse motivo, a sua multiplicação não ocorre nos alimentos, atuando estes apenas como veículos de transmissão da infecção passivos, sendo esta a principal diferença entre a transmissão de bactérias e vírus através dos alimentos.(17,18)

Existe um grande número de vírus que podem ser encontrados no trato gastrointestinal humano, causando uma grande variedade de doenças, nomeadamente enterovírus, sapovírus, rotavírus, astrovírus, adenovírus ou vírus da hepatite E (HEV).(13,19,20) Todos eles são capazes de causar doenças após a sua ingestão por alimentos e/ou pela água, no entanto, as doenças virais transmitidas por alimentos mais relatadas são gastroenterite ou hepatite, causadas por NoV e HAV humano, respectivamente.(13,16,20,21)

2.2. Matrizes alimentares suscetíveis

As categorias de alimentos mais comumente ligadas a surtos alimentares por vírus consistem em vegetais de folhas verdes (alface, espinafre e brócolos), vegetais de caule ou bulbo (alho francês, cebola, cenoura, alho e espargos), frutos vermelhos e bagas (morangos, framboesas e mirtilos) e moluscos bivalves (ostras, ameijoas e mexilhões), estes últimos devido à sua capacidade de filtrar, acumular e concentrar microrganismos patogénicos presentes na água.(21) No entanto, qualquer alimento pode ser implicado em surtos, uma vez que ingredientes crus ou produtos frescos contaminados podem ser obtidos de locais muito distantes e usados como ingredientes numa ampla variedade de alimentos, aumentando assim o potencial de disseminação de infeções e o impacto de doenças na indústria dos alimentos.(12,19)

O consumo de vegetais frescos é promovido como parte de uma dieta saudável para a população. No entanto, isso pode representar um risco potencial para a saúde pública, uma vez que uma grande variedade dos vegetais folhosos é consumida crua.(22)

Relativamente aos frutos vermelhos, o número de surtos reportados tem vindo a aumentar. Em 2012, um surto de NoV em morangos congelados provenientes da China afetou cerca de 11 000 pessoas na Alemanha. Existiram ainda mais dois surtos de NoV reportados na Europa relacionados com framboesas congeladas e outros dois surtos de HAV associados a morangos e bagas congeladas, entre 2012 e 2014.(23,24)

Existe um Sistema de Alerta Rápido Europeu para Alimentos, onde em 2014 foram registados 85% dos alertas para moluscos bivalves.(4) Os mariscos, como ostras, ameijoas e mexilhões, são os produtos alimentares mais frequentemente relacionados com a contaminação por estes vírus e a surtos subsequentes.(25) Em semelhança com os vegetais de folhas verdes e frutos vermelhos, são geralmente consumidos crus ou levemente cozidos no vapor. Obviamente, os moluscos bivalves diferem dos produtos frescos, visto que são cultivados em águas marinhas que podem ser suscetíveis a eventos de contaminação fecal.(1)

Em alguns países europeus, têm vindo a ser desenvolvidas algumas técnicas de monitorização da contaminação fecal nas áreas de produção de moluscos bivalves, através da quantificação dos níveis da bactéria *Escherichia coli*.(26,27) No entanto, o uso de microrganismos indicadores de contaminação fecal não é um meio fiável para determinar a extensão da contaminação de moluscos por estes vírus.(27)

2.3. Métodos de disseminação e replicação dos vírus

A contaminação dos produtos alimentares pode ocorrer em qualquer momento do seu processamento, seja na fase de pré-colheita (poluição dos solos ou água de irrigação contaminada), colheita ou pós-colheita, envolvendo principalmente alimentos prontos para consumo.(4,12,28) As mãos contaminadas por vírus desempenham um papel importante na disseminação de vírus entéricos, particularmente em contextos institucionais e durante a preparação de alimentos.(29) As mãos humanas contaminadas podem transferir o vírus para objetos inanimados ou produtos alimentares, podendo estes chegar a pessoas suscetíveis e provocar doença.(30–32) Existem também outros fatores que podem levar à contaminação, nomeadamente: contato com fezes humanas ou animais, ou água contaminada com fezes; contato com objetos sujos com fezes; contato com vômito ou água contaminada com vômito; contato com o ambiente onde estiveram anteriormente pessoas contaminadas ou aerossóis contendo vírus produzidos por pessoas infetadas.(16) Os fatores mais importantes que afetam a sobrevivência dos vírus nos produtos alimentares são: tipo de vírus, temperatura, pH, humidade relativa, teor de humidade, exposição à luz solar e o tipo de alimento. Este último fator pode ter um grande impacto, dependendo do tipo de superfície. Por exemplo, a presença de fissuras e projeções na superfície dos frutos vermelhos

podem proteger os vírus de mudanças ambientais. Por outro lado, a presença de compostos antivirais naturais em determinados alimentos tornam os mesmos menos suscetíveis (erva cidreira, alho ou gengibre, por exemplo).(30)

Em geral, os vírus entéricos mostram resistência aos métodos convencionais de processamento e preservação de alimentos.(33) Embora as taxas de sobrevivência de vírus transmitidos por alimentos variem com as diferentes condições de processamento e substrato, estes vírus podem sobreviver sob uma ampla gama de condições ácidas e alcalinas (pH 3 a 10). Por exemplo, a pasteurização do leite inativa o VHA, enquanto que no caso dos moluscos bivalves, é necessário um tratamento térmico prolongado para o conseguir eliminar. Alguns vírus entéricos adquiriram resistência contra a radiação ionizante, levando à aplicação de altas doses de controlo com impactos negativos nas propriedades organolépticas dos produtos alimentares.(20) Acredita-se que a maioria dos vírus entéricos tenham uma baixa dose infecciosa, entre 10 a 100 partículas ou possivelmente até menos.(34) Portanto, embora eles não se multipliquem em alimentos, basta existir uma pequena quantidade de partículas virais nos alimentos para causar infeção.(13)

Os vírus patogénicos de origem alimentar, como NoV e HAV, compõem a maioria dos casos clínicos em humanos. Estes vírus estão adaptados aos seres humanos e são transmitidos eficientemente entre os mesmos, facilitando a transmissão indireta através de alimentos e direta de humano para humano.(31)

2.4. Norovírus

Os NoV foram descritos pela primeira vez em 1972.(13) Porém o seu papel na etiologia de surtos epidémicos e casos esporádicos de gastroenterites não-bacterianas permaneceu em questão devido à sua dificuldade de deteção e amplificação, uma vez que ainda não é possível realizar uma cultura celular *in vitro*.(35) Somente a partir da década de 90, com o aparecimento de técnicas moleculares como a clonagem e a sequenciação, é que foi possível entender melhor a epidemiologia destes vírus.(16,36)

Os NoV são reconhecidos como uma das principais causas de gastroenterites agudas epidémicas e esporádicas em crianças e adultos, sendo responsáveis por mais de 90% das epidemias gastroenteríticas não bacterianas em todo o mundo.(34) Hoje em dia, são a principal causa de gastroenterite aguda entre crianças com menos de 5 anos de idade que procuram atendimento médico.(4)

Os moluscos bivalves são uma fonte bem documentada de infeção por este vírus, uma vez que têm a capacidade de acumular e concentrar partículas de NoV por filtração da água contaminada com fezes.(37) O NoV é um problema persistente nas águas costeiras durante os meses de inverno, levando à contaminação das áreas de produção de moluscos bivalves, representando as ostras um risco particular para a saúde humana, já que são consumidas habitualmente crúas.(27,38) O risco de doença aumenta com a quantidade ingerida e a cozedura a vapor não inativa o vírus.(16) A deteção e quantificação de NoV

é difícil, uma vez que o seu cultivo é extremamente limitado e complexo e a sua heterogeneidade biológica limita a aplicabilidade de métodos imunológicos e serológicos para fins de identificação. Contudo, nos últimos anos, a PCR em tempo real permitiu a confirmação e quantificação do NoV.(38)

2.4.1. Classificação e Nomenclatura

Os NoV pertencem à família Caliciviridae, e podem ser geneticamente e antigenicamente muito diversos.(39) Historicamente, a classificação dos NoV era feita com base em estudos com voluntários e na sua observação por Microscopia Eletrônica .(36) Atualmente, com base na análise de sequências completas do gene que codifica a proteína VP1 da cápside, os NoV foram classificados em sete genogrupos (GI a GVII).(4) Estirpes de GI, GII e GIV são encontrados em humanos, GIII em bovinos e GV em murinos. O grupo GII também pode aparecer em porcos.(36) Na última década, as estirpes pertencentes a GII, genótipo 4 (GII.4) foram responsáveis pela maioria dos casos de infecção em todo o mundo, periodicamente emergindo e substituindo a estirpe anteriormente predominante.(4)

2.4.2. Estrutura da partícula viral

As partículas virais têm cerca de 27–37 nm de diâmetro, uma cápside icosaédrica e sem invólucro, o que explica a alta resistência à desinfecção.(31) São estáveis em água clorada, pH ácido e permanecem infecciosas após congelamento e aquecimento até 60°C, fator que contribui para a transmissão e consequente contaminação do vírus através da água potável e recreacional.(36)

O genoma viral consiste numa molécula linear de RNA cadeia simples de polaridade positiva, que contém aproximadamente 7,5 kb, composto por 45%–56% de citosina + guanina, organizado em três sequências de leitura abertas (ORF) e uma cauda poli(A) na extremidade 3'.(39,40)

2.4.3. Patogénese e Replicação

A cápside é composta por duas proteínas virais estruturais, VP1 e VP2. O vírus é internalizado na célula através de interações entre a VP1 da cápside e os antígenos sanguíneos do hospedeiro.(41) Os genomas que possuem uma molécula linear de RNA de cadeia simples e polaridade positiva servem como mRNA. Assim que penetram na célula-alvo, ligam-se aos ribossomos celulares, ocorrendo a tradução de proteínas. O RNA genómico serve de molde para uma cadeia negativa complementar, que será transcrita em RNA genómico pela polimerase viral. A extremidade 5' do genoma apresenta a proteína VPg, que tem um papel essencial na infetividade viral e na tradução inicial. Na extremidade 3', após a síntese do gene, ocorre a adição da cauda poli A, com função de dar estabilidade à molécula e ajudar na tradução.(41) Posteriormente, a ORF1 codifica uma poliproteína de 194 K–Da que é clivada pela protease viral 3C em seis a sete proteínas não estruturais (NS1–NS7), incluindo a RNA polimerase-dependente de RNA. Assim, a

extremidade 5' do genoma codifica um precursor de proteínas não estruturais, envolvidas na transcrição e replicação viral. A ORF2 codifica a proteína da cápside (VP1) de 60 K-Da, sendo esta uma proteína estrutural com papel importante na replicação do vírus. A ORF3, considerada a região mais variável do genoma, codifica a proteína básica (VP2) de 23 K-Da e que interage com o RNA genômico quando ocorre a formação do virião.(39,40)

2.4.4. Epidemiologia

Os NoV, nomeadamente os NoV humanos, são classificados como a principal causa de gastroenterites epidémicas e/ou esporádicas em todo o mundo, causando cerca de 1 em cada 5 casos de gastroenterite em países desenvolvidos.(4,12,35) São altamente infecciosos, quer pela transmissão pessoa-a-pessoa pela via fecal-oral (transmissão direta), quer pelo consumo de alimentos e água contaminados (transmissão indireta).(35) Além disso, estes vírus variam antigenicamente e geneticamente, resultando em muitas estirpes diferentes com proteção imunológica cruzada limitada entre estirpes, sendo que a imunidade a qualquer uma das estirpes pode variar entre alguns meses a dois anos.(39)

Os NoVs humanos persistem no meio ambiente, com uma duração que pode ir de algumas semanas a anos, dependendo das condições ambientais, como temperatura e humidade. São também resistentes a quase todos os ingredientes ativos de produtos de limpeza e desinfetantes habitualmente utilizados na produção e processamento de alimentos, incluindo compostos de amónio quaternário, detergentes, álcoois e cloro em altas concentrações. O mesmo pode ser dito sobre os métodos de processamento e preservação de alimentos, como calor, radiação ionizante, ácidos orgânicos, conservantes e manipulação do pH ou da atividade da água.(39)

2.4.5. Prevenção e Tratamento

A interrupção da transmissão é a primeira estratégia para a prevenção, especialmente em hospitais e creches. Para cuidar de um doente diagnosticado com gastroenterite aguda é preciso tomar algumas precauções, como lavar as mãos com água e sabão antes e depois de ter contato com o doente ou com os seus objetos. É necessário também higienizar todas as superfícies, visto que os NoV podem persistir em superfícies inanimadas secas de 8 horas a 7 dias.(39) Com o objetivo de evitar transmissões secundárias, é necessária a prevenção da contaminação alimentar que ocorre durante a preparação dos alimentos, lavando as mãos continuamente.(42) Os manipuladores de alimentos devem utilizar luvas para a preparação de alimentos crus.(42) No caso de existirem funcionários doentes, estes não devem preparar alimentos por um período mínimo de 3 dias após a doença, de modo a evitar possíveis surtos.(43)

Como não há um tratamento com antiviral consolidado para combater as norovirose nem existe vacina, o foco consiste na prevenção e tratamento da doença. A hospitalização em casos de desidratação grave, embora rara, pode ser necessária. Sintomas como dor de cabeça, mialgia e náusea podem ser combatidos com analgésicos e antitérmicos.(43)

2.5. Vírus da Hepatite A

Tal como acontece com os NoV, o VHA é um dos principais agentes causais de gastroenterite não-bacteriana, assim como de vários surtos relatados.(34) É facilmente encontrado em moluscos bivalves pelo contacto destes com águas contaminadas. Após um período de incubação que pode variar entre 15 a 50 dias, a infeção pelo VHA causa hepatite aguda que normalmente não se prolonga por mais de 2 meses, contudo, algumas pessoas podem apresentar sintomas prolongados ou recorrentes até 6 meses.(36,44) Estima-se que cerca de 50% dos casos de hepatite sejam provocados pelo VHA.(12)

2.5.1. Classificação e Nomenclatura

O VHA é um vírus pertencente à família *Picornaviridae*, do género *Hepatovirus*.

O VHA possui alguns graus de diversidade genómica, organizados em seis genótipos (I-VI).(45) Os genótipos I-III estão associados a infeções em seres humanos e são divididos em dois sub-genótipos (A e B).(44) Estes genótipos e respetivos sub-genótipos estão frequentemente associados a diferentes distribuições geográficas. Em geral, o genótipo I é o genótipo mais prevalente, sendo o sub-genótipo IA mais comum que o IB.(44,45) O genótipo III tem uma distribuição global e foi identificado em alguns países da Europa e Ásia.(46)

2.5.2. Estrutura da partícula viral

Possui um genoma composto por uma cadeia simples de RNA de sentido positivo, com aproximadamente 7,5 Kb.(36,44) Para além disso, é um vírus que não possui invólucro, de simetria icosaédrica, com diâmetro entre 27 e 32 nm.(36,44)

2.5.3. Patogénese e Replicação

O VHA é um vírus hepatotrópico.(16,46) O RNA serve de molde para a síntese de um RNA complementar de polaridade negativa. Esta cadeia, por sua vez, serve de molde para a síntese de novas moléculas de RNA de polaridade positiva, que funcionam como RNA genómico e como RNA mensageiro, para a produção de uma poliproteína. Para a montagem do vírus, é produzido um pró-capsídeo que permite a encapsidação do RNA genómico. Finalmente, um evento de processamento de provírus permite a formação da partícula viral madura.(36)

Durante o período de incubação, o vírus multiplica-se nas células do epitélio intestinal, antes de chegar ao fígado, via corrente sanguínea. Na última fase do período de incubação, o vírus é libertado nas fezes.(36)

2.5.4. Epidemiologia

Estima-se que todos os anos há 1,4 milhões de pessoas infetadas no mundo.(47) A melhoria das condições sanitárias e de higiene, levou a uma diminuição da exposição ao vírus. No entanto, tende a aparecer numa fase posterior da vida quando a doença se torna mais grave.(48) A doença, geralmente assintomática ou leve, principalmente em crianças menores de cinco anos, é altamente transmissível.

O VHA pode ser transmitido através da água, dos alimentos contaminados e por via fecal-oral entre contactos diretos.(25) O longo período de incubação da doença dificulta extremamente a identificação da fonte. Por esta razão, é difícil saber qual a percentagem de casos de HAV que são causados pela transmissão por alimentos.(4)

Com base no nível de anticorpos anti-HAV, o nível de endemicidade é agrupado em: baixo (<15%), intermediário (15–50%) e alto (> 50%). Observa-se endemicidade particularmente alta na África subsaariana e na Índia, enquanto que na Europa Ocidental, EUA e na Austrália observam-se níveis baixos. No entanto, o ônus da doença nas regiões de alta endemicidade é comparativamente baixo. Esse “paradoxo do risco de hepatite A” deve-se ao facto de que em áreas endémicas as crianças são infetadas desde tenra idade (por exemplo na África subsariana a infeção em crianças pequenas é frequentemente assintomática ou atípica, contudo desencadeia uma imunidade robusta, observando-se que 90% das crianças de 10 anos são positivas para anti-VHA). Por outro lado, em regiões com baixa endemicidade, pode-se observar um aumento de surtos clínicos mais graves, devido a um alto grau de suscetibilidade, a não vacinação e pessoas mais idosas. Os movimentos populacionais e os mercados globalizados desempenham um papel adicional importante. Por exemplo, o primeiro surto registado associado a mariscos resultou do armazenamento de ostras limpas num porto de pesca enquanto aguardavam a sua venda, tendo sido registados cerca de 600 casos de Hepatite A.(11) . Mais tarde, entre 2013 e 2014, bagas congeladas importadas contaminadas por VHA levaram ao maior surto de hepatite A registado na Europa.(31)

2.5.5. Prevenção e Tratamento

Embora exista uma vacina eficaz, estima-se que milhões de novas infeções por HAV ocorram todos os anos, o que leva a cerca de 90.000 mortes em todo o mundo.(23)

Nos adultos, o início da doença é geralmente abrupto com febre, provocando mal-estar e desconforto abdominal, sendo a icterícia o sintoma predominante. Em 15% dos casos, a hepatite pode

prolongar-se por até um ano não evoluindo para um estado crónico. A infeção confere imunidade ao longo da vida.(45,46)

2.6. Detecção por PCR em tempo real

A metodologia por PCR em tempo real (RT-PCR) automatiza a técnica de PCR, tornando-a mais eficiente, rápida e segura. A metodologia de PCR em Tempo Real foi descrita em 1993 por Russell Higuchi e representou um dos mais significativos avanços no diagnóstico alimentar, pois agiliza a obtenção de resultados e diminui o risco de contaminação da amostra, num curto espaço de tempo e em tempo real. (49)

O PCR em tempo real, combina a metodologia do PCR convencional com um mecanismo que deteta sinais de fluorescência na qual os processos de deteção, amplificação e quantificação ocorrem numa única etapa, dispensando a eletroforese no fim do processo.(50) O momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra é detetada inequivocamente acima do ruído de fundo (*background*) é denominado de *cycle threshold* (CT).(50) Atualmente, as sondas utilizadas na PCR em tempo real, variam em função do fabricante e da tecnologia aplicada, sendo as sondas TaqMan (5' exonuclease) as mais utilizadas.(50,51)

O RNA pode ser analisado de forma semelhante ao DNA, através da técnica de PCR, a partir da transcrição reversa. Esta é uma variação da técnica de PCR que, por meio da criação de uma cadeia de DNA complementar (cDNA), a partir de transcritos de mRNA, deteta a expressão génica. O RNA molde é primeiramente convertido em cDNA através da enzima transcriptase reversa. Posteriormente, o cDNA é utilizado como molde para a amplificação exponencial por PCR em tempo real. A principal vantagem deste método é que o RNA, instável, é convertido em cDNA, conferindo uma maior tolerância à degradação.(52,53)

Esta metodologia tem várias vantagens em comparação com o método cultural, incluindo a rapidez, alta sensibilidade, seletividade e potencial capacidade para quantificação.(54) Contudo, o uso de pessoal qualificado, o custo dos reagentes e equipamentos e a falta de protocolos standardizados tornam difícil a implementação deste método.(2)

Como a deteção de vírus em matrizes alimentares é desafiadora devido às propriedades físicas e químicas dos alimentos, a norma ISO 15216-2:2019 inclui certos critérios destinados a evitar o aparecimento de falsos-negativos.(12,21)

3. Objetivos

O objetivo principal desta dissertação é testar/avaliar um método de extração já utilizado na rotina laboratorial, em produtos provenientes em meio de transporte viral, totalmente automatizado, para detectar a presença de NoV e VHA em matrizes alimentares suscetíveis, seguindo a norma ISO 15216-2:2019, pela técnica de PCR em tempo real (RT-PCR). Este estudo tem por finalidade verificar a possível utilização deste método de extração também na rotina laboratorial da detecção de NoV e VHA em matrizes alimentares, contribuindo assim para o aumento da segurança alimentar e prevenção da ocorrência de novos surtos.

4. Materiais e Métodos

Em relação aos vírus, é necessário uma elevada sensibilidade dos métodos, devido ao baixo número de partículas virais presentes na amostra e à complexidade das matrizes.(2) Dessa forma, a concentração e purificação das amostras são passos importantes para diminuir os limites de detecção do ensaio.(2)

A estratégia geral para a detecção de vírus entéricos em amostras de alimentos consiste em três etapas: concentração das partículas virais, extração do RNA viral e detecção molecular do RNA extraído e purificado, por RT-PCR. Os procedimentos constantes na norma EN ISO 15216-2:2019, descrevem métodos padrão para a extração e quantificação de NoV e HAV em alimentos de alto risco, como por exemplo os vegetais e os moluscos bivalves.(14,21) Esta norma fornece ainda todas as informações relativamente aos reagentes, materiais e equipamentos necessários ao longo de todo o processo.

4.1. Amostras: Matrizes alimentares em estudo

A seleção do método de recuperação e concentração das partículas virais varia consoante a matriz a testar. Neste caso, foram utilizados os métodos descritos pela ISO 15216-2:2019 para a extração de ácidos nucleicos virais em frutos vermelhos frescos ou congelados, moluscos bivalves vivos ou congelados e vegetais de folha, caule ou bulbo frescos ou congelados. As amostras não foram sujeitas a qualquer tipo de cozedura, lavagem ou desinfecção. Ao longo dos últimos 4 meses foram armazenadas e congeladas amostras, recebidas no laboratório para análise microbiológica, de moluscos bivalves (ostra, mexilhão e ameijoia), vegetais de folha verde (espinafre e bróculo) e frutos vermelhos congelados e frescos (framboesa e morango). Para além destas, foram obtidas mais 25 amostras destas matrizes em diversas superfícies comerciais, aleatoriamente. As amostras estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Número de amostras das respetivas matrizes alimentares em estudo utilizadas no ensaio

Moluscos Bivales	Número de amostras
Ostras	55
Mexilhões	15
Ameijoas	15
Vegetais de folha verde, caule ou bulbo	Número de amostras
Espinafres	18
Brócolos	18
Cebola	2
Frutos vermelhos	Número de amostras
Framboesas	10
Morangos	10
Total	143

4.2. Recuperação e concentração das partículas virais

As taxas de recuperação das partículas virais variam consoante a matriz a testar, por esse motivo, a norma explica detalhadamente qual o método a utilizar para cada tipo de matriz suscetível. Todos os métodos foram seguidos na sua totalidade segundo as indicações da norma ISO 15216-2:2019.

As amostras foram todas processadas em duplicado. Foi ainda realizado um Controlo Negativo que acompanhou todo o processo.

A recuperação das partículas virais é composta por uma fase de eluição dos vírus, através do uso de soluções tampão, sendo estes depois concentrados por precipitação com polietilenoglicol (PEG) ou ultracentrifugação. É ainda utilizada a Proteinase K para a lise das proteínas presentes na matriz.(38) No caso dos vegetais de folha verde foi utilizada uma solução tampão TGBE preparada de acordo com a norma, adicionada a cerca de 25 gramas de amostra, seguida de diversos passos de incubação e centrifugação a 10000 g para eluir os vírus. Posteriormente, foi adicionada uma solução PEG/NaCl seguida de uma nova centrifugação a 10000g de modo a precipitar os vírus. Por fim, foi adicionada uma solução PBS para ressuspender o *pellet* resultante. No caso dos frutos vermelhos, como estes possuem um pH baixo, foi necessário fazer ajustes de pH e um passo extra no processo de recuperação das partículas virais através da adição de uma solução clorofórmio/butanol, seguida de uma nova centrifugação. No caso dos moluscos bivales, o processo é mais simples, tendo sido preparadas porções de 2 gramas da glândula digestiva das amostras, onde foi adicionada a proteinase K, seguida de vários períodos de incubação, agitação e centrifugação, a diferentes temperaturas.(21)

No fim desta fase e imediatamente antes do processo de extração, foi adicionado a cada amostra um controlo de processo, uma vez que a recuperação das partículas virais e respetiva extração são

processos complexos, que envolvem várias etapas, sendo possível haver perda do material genético.(55) Os mais frequentemente utilizados são os norovirus murinos (MNV-1), Mengovirus (linhagem MCO), calicivírus felino (FCV) e os bacteriófagos MS2 e PP7.(56) Neste caso, foi utilizado como controlo um fago enterobacteriano, que tem propriedades morfológicas e físico-químicas similares aos vírus alvo, de modo a poder fornecer dados relativos à eficiência da extração, sendo geneticamente bastante distinto destes alvos, de modo a evitar o aparecimento de falsos-positivos.(55,57)

4.3. Extração RNA viral

Para este ensaio, foi testado o método de extração de RNA viral MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit automático, da marca *Thermo Fisher scientific®*, utilizado para amostras provenientes em meio de transporte viral, num equipamento da marca *Opentrons®*. Este método de extração não está indicado para matrizes alimentares, no entanto, devido à grande eficácia e fiabilidade do método, foi testado neste tipo de amostras.(58)

A extração utiliza a tecnologia de esferas magnéticas, que permitem a recuperação de ácidos nucleicos num pequeno volume de eluição, com uma concentração relativamente alta.(58) Inicialmente, é preparada uma *mix*, constituída por uma solução ligante (*binding solution*), composta por cloreto de guanidina, capaz de lisar as partículas virais (inativando o vírus e eliminando possíveis contaminantes proteicos da amostra), uma enzima proteolítica (Proteinase K), com o objetivo de ajudar no processo de lise e na destruição de possíveis nucleases presentes na amostra e as esferas magnéticas. As amostras são adicionadas a esta mistura de reagentes e, posteriormente, sujeitas a uma série de lavagens com uma solução de lavagem e etanol a 80%, permitindo que sejam removidas quaisquer impurezas que ainda possam estar presentes na amostra.(58) Por fim, é adicionado um tampão de eluição para permitir ressuspender os ácidos nucleicos e proceder à deteção. Todo o processo é realizado em placas com 96 poços, permitindo a extração automática e em simultâneo de 96 amostras.

4.4. Deteção de Nov GI e GII e VHA por RT-PCR

Neste caso, foram adquiridos dois kits da marca *Bioside®*, rápidos, sensíveis, específicos e reprodutíveis, um para deteção e discriminação de hepatite A e Norovírus GI e GII em amostras ambientais e de alimentos (qalyfast HAV, NoV GI and GII) e outro para deteção e discriminação do vírus de controlo de processo (qalyfast virus process control), compatível com os principais instrumentos de PCR em tempo real (conforme ISO 15216-2:2019).(21,59)

Paralelamente à deteção destes vírus, o kit *Bioside®* qalyfast HAV, NoV GI and GII contém ainda um controlo interno de inibição de amplificação (RNA – IAC), de modo a garantirmos que não ocorreu qualquer anomalia durante o programa de PCR.(59) A inibição da amplificação dos vírus-alvo é avaliada

pela adição de um controlo positivo, proveniente no kit de deteção. O uso de sondas e mistura de oligonucleotídeos permite monitorizar em tempo real a reação após o aumento da fluorescência para cada amostra. Os programas têm um ciclo inicial de transcrição reversa de 45 minutos a 50 °C, seguido de um ciclo de pré-aquecimento de 10 minutos a 95°C e por fim 50 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (*annealing* e extensão). (59)

Todos os reagentes são pré-dosados e liofilizados nos tubos de reação, embalados em tiras de 8. Cada kit contém ainda um tubo de solução livre de DNA e uma tira de 8 tubos de reação de controlos positivos prontos para uso.(55,59)

5. Resultados e Discussão

Inicialmente, procedemos à deteção do fago nas amostras em estudo, tendo-se verificado amplificação do mesmo em 64 amostras, como está indicado na Tabela 2. Na Figura 1 é possível observar a amplificação do fago numa das amostras testadas, com um valor de CT de 20.

Tabela 2: Número de amostras testadas em que foi possível amplificar o vírus de controlo de processo, validando o método de extração

Moluscos Bivalves	Número de amostras testadas	Amplificação do Vírus de Controlo de Processo
Ostras	55	20
Mexilhões	15	5
Ameijoas	15	5
Vegetais de folha verde, caule ou bulbo		
Espinafres	18	12
Brócolos	18	12
Cebola	2	2
Frutos vermelhos		
Framboesas	10	8
Morangos	10	0
Total	143	64

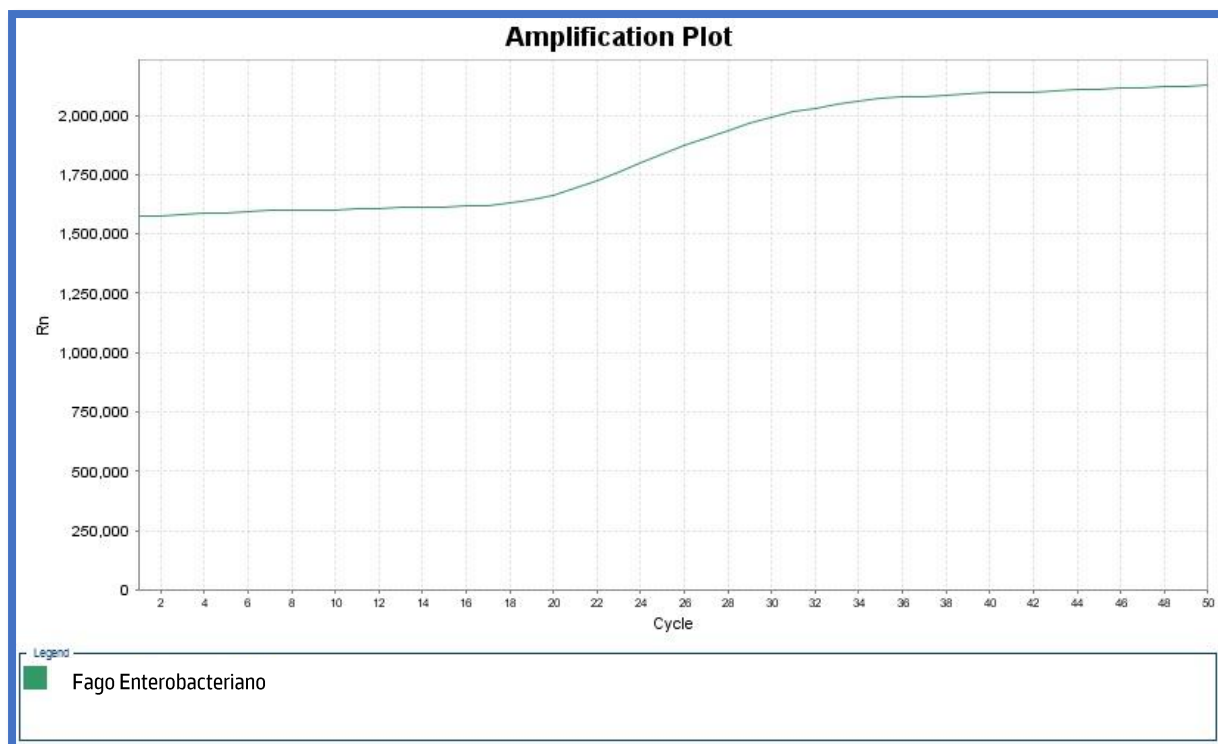


Figura 1: Gráfico de amplificação da reação PCR-RT. Amplificação específica do vírus de controlo de processo, em que o eixo do y corresponde à intensidade de emissão de fluorescência (Rn) e o eixo do x corresponde ao número de ciclos

Das 143 amostras em estudo, apenas 64 (44,7%), foram extraídas com sucesso, recorrendo ao método de extração automático testado. A concentração e recuperação de partículas virais num volume pequeno de amostra é uma etapa crítica do processo, uma vez que nas matrizes alimentares as concentrações virais são bastante baixas. Isto pode levar a uma quantidade de RNA extraído abaixo do limite de deteção do RT-PCR.(12) Para além disso, moléculas como polissacarídeos, proteínas e ácidos gordos são removidos para prevenir a inibição da extração de RNA e subsequente deteção molecular. Se esta remoção não for bem sucedida, toda a extração fica comprometida.(40) Falhas durante esta etapa também podem ocorrer devido à falta de equipamentos necessários para todas as fases do processo ou devido à complexidade de algumas das matrizes em estudo, nomeadamente os moluscos bivalves. Tal fator também é comprovado com os resultados deste estudo, uma vez que no caso dos moluscos bivalves, apenas foi detetado o vírus de controlo de processo em 30 das 85 amostras testadas, ou seja, 35,3%. Por sua vez, no caso dos vegetais, de um total de 38 amostras testadas, o vírus de controlo de processo foi detetado em 26 dessas amostras, ou seja, uma taxa superior a 68%. Também os frutos vermelhos como as framboesas e os morangos são uma matriz alimentar desafiadora para deteção de vírus, uma vez que possuem um pH baixo e contêm compostos que podem inibir a reação do PCR.(60)

A deteção dos vírus alvo, nomeadamente o NoV e o VHA, foi realizada apenas nas amostras onde foi possível observar amplificação do vírus de controlo de processo. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados do ensaio correspondentes à deteção de NoV GI e GII e HAV nas amostras em estudo

Moluscos Bivalves	Número de amostras	NoV detetado		HAV detetado
		GI	GI	
Ostras	20	1	0	0
Mexilhões	5	0	0	0
Ameijoas	5	0	0	0
Vegetais de folha verde, caule ou bulbo				
Espinafres	12	0	0	0
Brócolos	12	0	0	0
Cebola	2	0	0	0
Frutos vermelhos				
Framboesas	8	0	0	0
Morangos	0	0	0	0
Total	64	1	0	0

Das amostras testadas, foi detetado NoV GI numa ostra, conforme ilustrado na Figura 2. Todas as restantes amostras foram negativas para ambos os vírus em estudo. Tanto o NoV como o VHA não amplificaram no controlo negativo (Figura 3) e amplificaram na amostra utilizada como controlo positivo (Figura 4). Relativamente à Figura 2, é possível observar uma ligeira amplificação gradual ao longo dos ciclos no NoV GII. Tal poderá ser justificado com o facto de ter sido utilizado um kit comercial já com a deteção dos dois vírus-alvo em simultâneo e não separadamente, podendo haver alguma competição entre as sondas e os primers no tubo de reacção.(61)

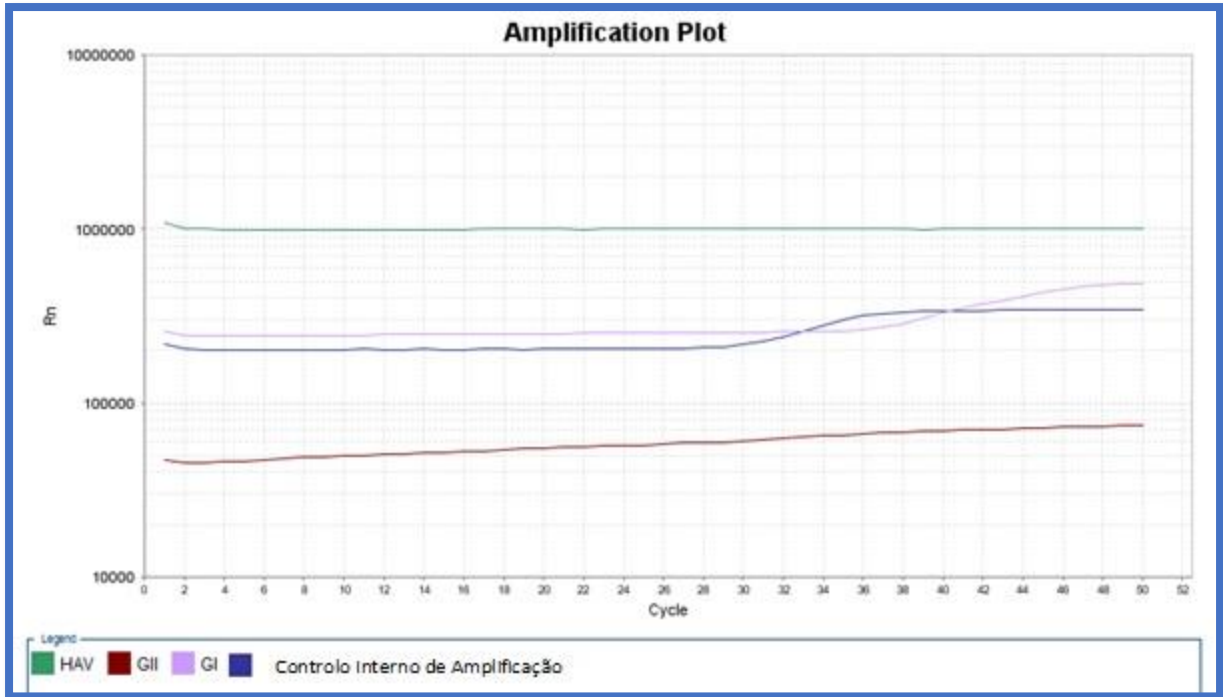


Figura 2: Gráfico de amplificação da reação PCR-RT. Amostra de Ostra com amplificação específica de NoV GI e do controlo interno de amplificação (IAC).

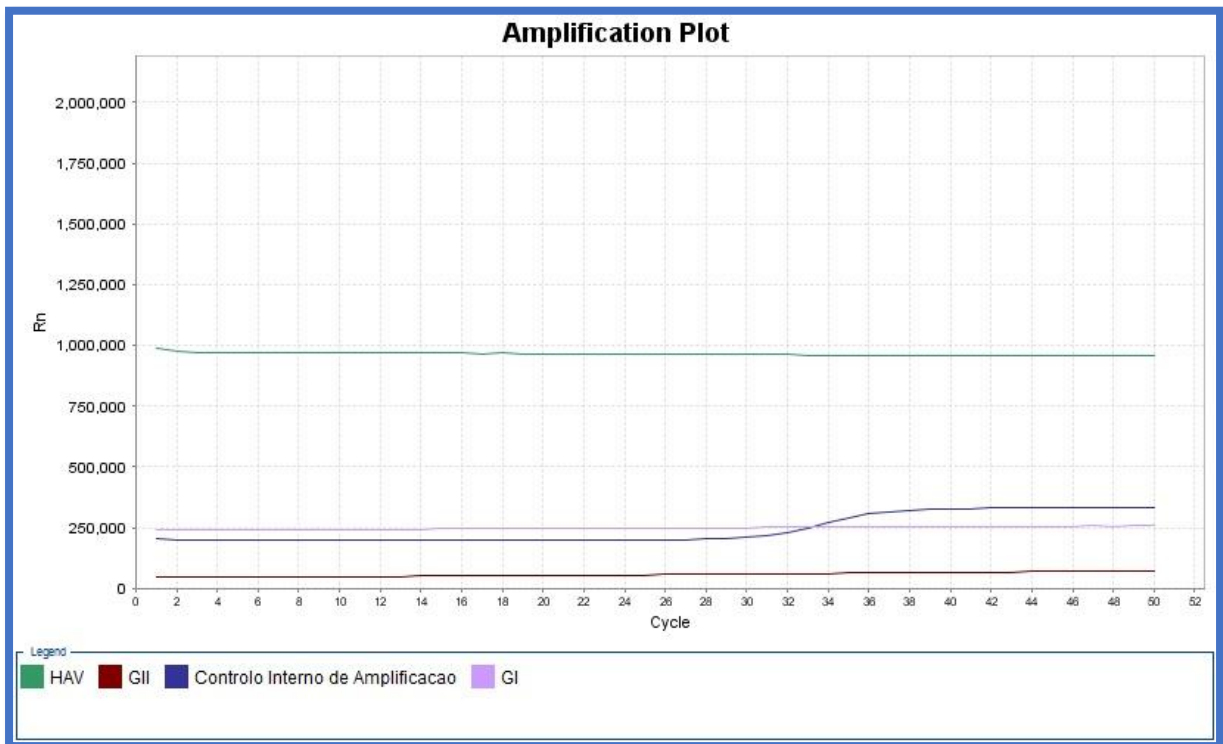


Figura 3: Gráfico de amplificação da reação PCR-RT. Amplificação específica do controlo interno de amplificação (IAC). NoV e HAV não detetados. Amostra relativa ao Controlo Negativo

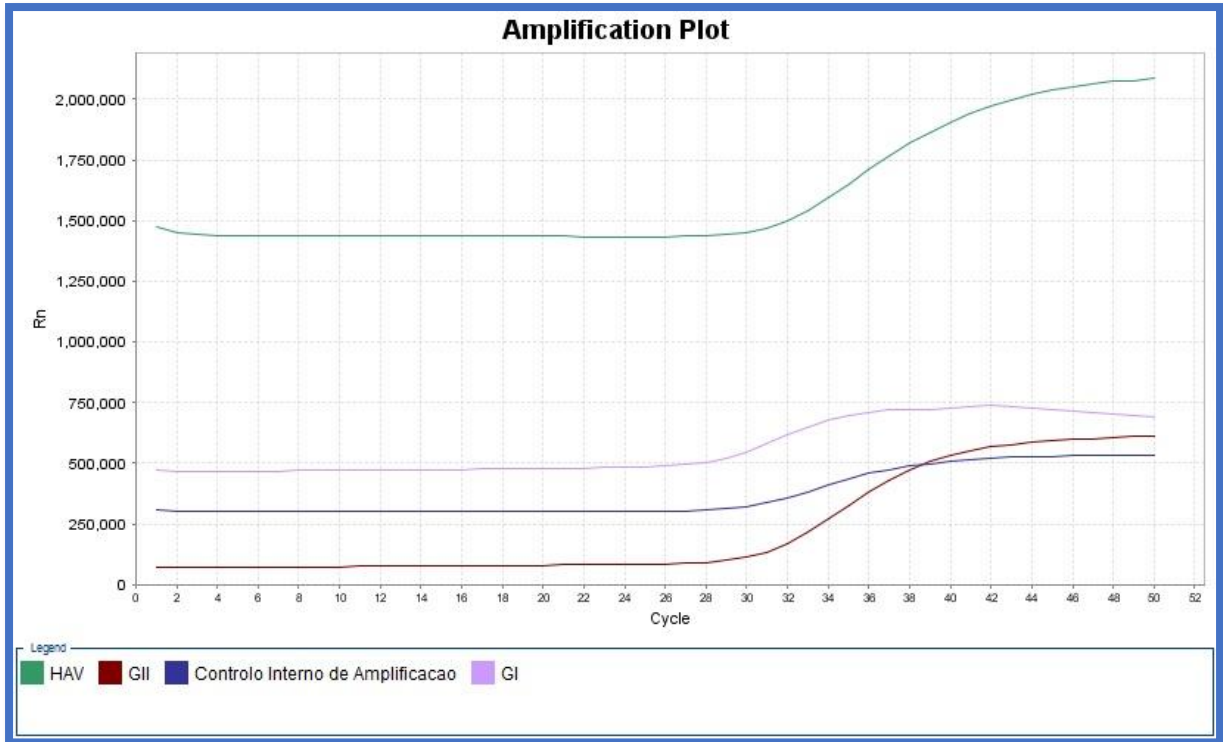


Figura 4: Gráfico de amplificação da reação PCR-RT. Amplificação específica de NoV GI, GII, HAV e do controlo interno de amplificação (IAC). Amostra relativa ao Controlo Positivo.

A detecção de ácidos nucleicos virais em matrizes alimentares não indicam, por si só, a infectividade viral. Isso cria problemas na interpretação dos resultados para possíveis avaliações de risco, uma vez que se torna difícil relacionar a detecção de ácidos nucleicos com a probabilidade de causar doenças.(12)

O método de detecção utilizado tem algumas vantagens e desvantagens. O reconhecimento internacional de um método ISO aumenta a harmonização na implementação do método em laboratórios, introduzindo a possibilidade de comparar e avaliar resultados entre diferentes laboratórios, facilitando a acreditação dos mesmos para a detecção destes vírus. No entanto, existem alguns fatores limitantes, como por exemplo o facto de não incluir métodos para matrizes alimentares processadas, assim como poder levar à não detecção de baixos níveis de vírus em algumas matrizes específicas e ainda não ser possível distinguir partículas infecciosas e não infecciosas.(12)

Para além disso, é necessário ter em consideração que o método de extração testado não foi desenvolvido com o objetivo de extrair amostras alimentares. Existem alguns estudos(10,14,33,56,62) sobre a detecção de NoV e VHA em matrizes alimentares, cujos métodos de recuperação das partículas virais foram idênticos aos métodos realizados neste estudo, mudando o método de extração. Todos eles obtiveram melhores resultados, o que indica que, muito provavelmente, o problema estará mesmo no método de extração utilizado. Este método de extração poderá, eventualmente, ser bastante útil de futuro, uma vez que é um método totalmente automatizado, mas será necessário desenvolver estudos mais aprofundados, otimizando os protocolos de extração, para que possa ser testado novamente e utilizado

na rotina laboratorial, com várias concentrações de amostra e amostras contaminadas com materiais de referência, o que também foi uma limitação neste estudo uma vez que não foi possível obter materiais de referência a tempo.

Subsistem também algumas lacunas na compreensão dos vírus transmitidos por alimentos e no seu comportamento. A relação desconhecida entre cópias do genoma e partículas infecciosas do vírus, o uso de substitutos para imitar o comportamento de vírus transmitidos por alimentos em ambientes industriais, bem como em estudos laboratoriais, e o pouco conhecimento sobre a sua dose infecciosa, características e persistência dos mesmos em diferentes matrizes alimentares, são alguns dos problemas atuais que têm de continuar a ser investigados. (12)

Não existe, até ao momento, legislação aplicável que leve à obrigatoriedade de controlo analítico destes vírus, em matrizes alimentares.(63)

6. Conclusão

Os surtos e doenças causados por patógenos microbianos transmitidos por alimentos constituem uma grande preocupação para a saúde pública, não apenas na produção, mas também nos custos associados às medidas adotadas para reduzir os impactos nas populações. Atualmente, a globalização e comércio livre, potencializam a disseminação de doenças transmitidas por alimentos.

Os vírus transmitidos por alimentos causam taxas de morbidade e mortalidade consideráveis. Controlá-los significa cumprir as boas práticas de higiene pessoal e alimentar, boas práticas agrícolas, efetuar controlos pós-colheita e realizar uma gestão eficiente da rede doméstica para evitar e controlar possíveis transmissões. A avaliação de risco para transmissão de vírus emergentes através da cadeia alimentar deve ter em consideração todos os meios pelos quais os alimentos podem representar um perigo, que não é apenas o seu consumo.

A deteção de agentes virais em alimentos é fundamental para complementar investigações epidemiológicas de surtos alimentares, assim como rastrear preventivamente produtos alimentícios para a presença destes vírus. Apesar de o processo de deteção ser bastante simples, a fase de extração viral ainda é bastante complexa. Neste estudo, com os resultados obtidos, não parece ser aconselhada a utilização deste método de extração com amostras de matrizes alimentares, uma vez que as taxas de extração foram baixas.

Existem outros métodos que potenciam a resolução de algumas das fragilidades aqui descritas. Nomeadamente as novas tecnologias, como por exemplo o PCR digital que é menos sensível aos inibidores das matrizes alimentares ou a sequenciação de nova geração que, para além de ter a capacidade de detetar vírus emergentes e ainda novas estirpes, pode ainda fornecer novos dados sobre a utilização de primers e sondas mais específicas e direcionadas para estes vírus. Contudo, estas metodologias implicam um aumento de custos e pessoal especializado, tornando a sua implementação difícil para grande parte dos laboratórios de saúde pública.

Neste trabalho, foi possível testar/avaliar um método de extração já utilizado para extrair um vírus com um genoma composto por uma cadeia simples de RNA de sentido positivo, à semelhança no NoV e do HAV. No entanto, considero que não foram realizados testes suficientes que permitam garantir a possível utilização ou não do método de extração em questão. De futuro, seria interessante dar continuidade ao trabalho realizado ao longo deste ano, uma vez que poderia ser uma mais valia para a rotina laboratorial.

7. Referências Bibliográficas

1. Yeargin T, Gibson KE. Key characteristics of foods with an elevated risk for viral enteropathogen contamination. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2019 Apr 1;126(4):996–1010.
2. Rodríguez-Lázaro dcn-614. 3. Rod. Real-time PCR in food science [Internet]. Norfolk: Caister Academic Press;; 2013.
3. Pereira JG, Soares VM, de Souza FG, Tadielo LE, dos Santos EAR, Brum MCS, et al. Hepatitis A Virus, Hepatitis E Virus, and Rotavirus in Foods of Animal Origin Traded at the Borders of Brazil, Argentina, and Uruguay. *Food Environ Virol* [Internet]. 2018;10(4):365–72.
4. Bosch A, Pintó RM, Guix S. Foodborne viruses. *Current Opinion in Food Science*. 2016.
5. Adams MR, Moss MO, McClure P. *Food Microbiology* [Internet]. Royal Society of Chemistry; 2016.
6. Strubbia S, Phan MVT, Schaeffer J, Koopmans M, Cotten M, Le Guyader FS. Characterization of Norovirus and Other Human Enteric Viruses in Sewage and Stool Samples Through Next-Generation Sequencing. *Food Environ Virol*. 2019;
7. Purpari G, Macaluso G, Di Bella S, Gucciardi F, Mira F, Di Marco P, et al. Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples, and surface swabs in Sicily. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2019;80:66–72.
8. Lane D, Husemann E, Holland D, Khaled A. Understanding foodborne transmission mechanisms for Norovirus: A study for the UK's Food Standards Agency. *Eur J Oper Res* [Internet]. 2019;275(2):721–36.
9. WHO. Who estimates of the global burden of foodborne diseases. WHO Library Cataloguing. 2015.
10. Stals A, Baert L, Van Coillie E, Uyttendaele M. Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 2012.
11. Bintsis T. Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol*. 2017;3(3):529–63.
12. Bosch A, Gkogka E, Le Guyader FS, Loisy-Hamon F, Lee A, van Lieshout L, et al. Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2018;285:110–28.
13. Greening GE, Cannon JL. Human and Animal Viruses in Food (Including Taxonomy of Enteric Viruses). Goyal SM, Cannon JL, editors. *Viruses in Foods* [Internet]. 2016 Aug 26;5–57.
14. Hennechart-Collette C, Niveau F, Martin-Latil S, Fraisse A, Perelle S. Development of an extraction method to detect enteric viruses in dressed vegetables. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2019;311:108349.
15. Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med*. 2015 Dec;12(12):e1001921–

- e1001921.
16. Vasickova P, Dvorska L, Lorencova A, Pavlik I. Viruses as a cause of foodborne diseases: A review of the literature. *Veterinarni Medicina*. 2005.
 17. Adams Mr, Moss Mocn-614. 3. A 614. 3. A 614. 3. ADA. Food microbiology [Internet]. Cambridge, United Kingdom: The Royal Society of Chemistry;; 2008.
 18. JAY JM, TONDO EC, RECH RCN-614. 3. J 614. 3. JAY. Microbiologia de alimentos. Biblioteca Artmed. Porto Alegre: Artmed;; 2005.
 19. Lowther JA, Bosch A, Butot S, Ollivier J, Mäde D, Rutjes SA, et al. Validation of EN ISO method 15216 – Part 1 – Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2019;288(November 2017):82–90.
 20. Shukla S, Cho H, Kwon OJ, Chung SH, Kim M. Prevalence and evaluation strategies for viral contamination in food products: Risk to human health—a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2018 Feb 11;58(3):405–19.
 21. ISO – ISO 15216-2:2019 – Microbiology of the food chain – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR – Part 2: Method for detection [Internet].
 22. Coluccini ML. Vegetales de hojas como potenciales transmisores de Norovirus en la ciudad de Córdoba, Argentina. *Rev Fac Cienc Med Cordoba* [Internet]. 2020 Mar 18;77(1 SE-Artículos Originales):15–8.
 23. Ortiz-Solà J, Viñas I, Colás-Medà P, Anguera M, Abadias M. Occurrence of selected viral and bacterial pathogens and microbiological quality of fresh and frozen strawberries sold in Spain. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2020;314:108392.
 24. Torok VA, Hodgson KR, Jolley J, Turnbull A, McLeod C. Estimating risk associated with human norovirus and hepatitis A virus in fresh Australian leafy greens and berries at retail. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2019;309:108327.
 25. Woods JW, Burkhardt W. Occurrence of norovirus and hepatitis a virus in U.S. Oysters. *Food Environ Virol*. 2010;
 26. Atmar RL, Neill FH, Romalde JL, Le Guyader F, Woodley CM, Metcalf TG, et al. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1995 Aug;61(8):3014–8.
 27. Mesquita JR, Vaz L, Cerqueira S, Castilho F, Santos R, Monteiro S, et al. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiol*. 2011;
 28. Terio V, Bottaro M, Pavoni E, Losio MN, Serraino A, Giacometti F, et al. Occurrence of hepatitis A and E and norovirus GI and GII in ready-to-eat vegetables in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2017;
 29. Somura Y, Nagano M, Kimoto K, Oda M, Mori K, Shinkai T, et al. Detection of norovirus in food

- samples collected during suspected food-handler-involved foodborne outbreaks in Tokyo. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2019 Sep;69(3):175–80.
30. Sánchez G, Bosch A. Survival of Enteric Viruses in the Environment and Food. Goyal SM, Cannon JL, editors. *Viruses in Foods* [Internet]. 2016 Aug 26;367–92.
 31. Bachofen C. Selected Viruses Detected on and in our Food. *Curr Clin Microbiol reports* [Internet]. 2018/03/21. 2018;5(2):143–53.
 32. Wainaina E, Otieno CA, Kamau J, Nyachieo A, Lowther SA. Norovirus infections and knowledge, attitudes and practices in food safety among food handlers in an informal urban settlement, Kenya 2017. *BMC Public Health* [Internet]. 2020 Apr 10;20(1):474.
 33. NASHERI N, HARLOW J, CHEN A, CORNEAU N, BIDAWID S. Evaluation of Bead-Based Assays for the Isolation of Foodborne Viruses from Low-Moisture Foods. *J Food Prot* [Internet]. 2020 Feb 7;83(3):388–96.
 34. Iaconelli M, Muscillo M, Della Libera S, Fratini M, Meucci L, De Ceglia M, et al. One-year Surveillance of Human Enteric Viruses in Raw and Treated Wastewaters, Downstream River Waters, and Drinking Waters. *Food Environ Virol.* 2017;
 35. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science (80-)* [Internet]. 2016 Sep 23;353(6306):1387 LP – 1393.
 36. Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MDCN-578 SAN. *Introdução à virologia humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,; 2008.
 37. Polo D, Varela MF, Romalde JL. Detection and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. *Int J Food Microbiol.* 2015;
 38. (BIOHAZ) EP on BH. Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. *EFSA J* [Internet]. 2012 Jan 1;10(1):2500.
 39. Moore MD, Goulter RM, Jaykus L-A. Human Norovirus as a Foodborne Pathogen: Challenges and Developments. *Annu Rev Food Sci Technol* [Internet]. 2015 Apr 10;6(1):411–33.
 40. Luz I, Miagostovich M. Norovírus em alimentos. *Vigilância Sanitária em Debate Soc Ciência & Tecnol* [Internet]. 2017 Aug 31;5(3 SE-Revisão).
 41. De Graaf M, Van Beek J, Koopmans MPG. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature Reviews Microbiology.* 2016.
 42. Chen M-Y, Chen W-C, Chen P-C, Hsu S-W, Lo Y-C, Chen M-Y, et al. An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with asymptomatic food handlers in Kinmen, Taiwan. *BMC Public Health* [Internet]. 2016;16(1):1–6.
 43. Robiloti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):134–64.
 44. Naseri N, Vester A, Petronella N. Foodborne viral outbreaks associated with frozen produce.

- Epidemiol Infect [Internet]. 2019 Oct 18;147:e291–e291.
45. (EFSA) EFSA. Update: Outbreak of Hepatitis A virus infection in Italy and Ireland. EFSA Support Publ [Internet]. 2013 Jul 1;10(7):459E.
 46. Authority EFS. Tracing of food items in connection to the multinational hepatitis A virus outbreak in Europe. EFSA J [Internet]. 2014 Sep 1;12(9):3821.
 47. Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MSJ, et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. FEMS Microbiology Reviews. 2012.
 48. Fuentes C, Guix S, Pérez-Rodríguez FJ, Fuster N, Carol M, Pintó RM, et al. Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water. Food Microbiol. 2014;
 49. Talkington DF. Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications. Emerg Infect Dis [Internet]. 2013 Aug;19(8):1352–3.
 50. Gandra EÁ, Gandra TKV, de Mello WS, da Silva Godoi H. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. Acta Sci Technol. 2008;30(1):109–18.
 51. PIMENTA CAM. Genética Aplicada à Biotecnologia [Internet]. Saraiva Educação S.A.;
 52. Estrela C. Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa [Internet]. Artes Medicas; (Métodos de Pesquisa).
 53. McPherson M, Møller S. Real-time RT-PCR. In: PCR. 2020.
 54. Singh C, Roy-Chowdhuri S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. Methods Mol Biol. 2016;1392:161–76.
 55. Bioside. Technical Sheet: qualyfast Virus Process Control. Italy; 2020.
 56. Summa M, von Bonsdorff C-H, Maunula L. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. J Virol Methods [Internet]. 2012;183(2):154–60.
 57. Hennechart-Collette C, Martin-Latil S, Guillier L, Perelle S. Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water. Int J Food Microbiol [Internet]. 2015;202:57–65.
 58. Fang X, Willis RC, Burrell A, Evans K, Hoang Q, Xu W, et al. Automation of Nucleic Acid Isolation on KingFisher Magnetic Particle Processors. JALA J Assoc Lab Autom [Internet]. 2007 Aug 1;12(4):195–201.
 59. Bioside. Technical Sheet: qualyfast HAV, NoV GI and GII. Italy; 2020.
 60. Summa M, Maunula L. Rapid Detection of Human Norovirus in Frozen Raspberries. Food Environ Virol. 2018;10(1):51–60.
 61. Shin-Young Lee, Mi-Ju Kim, Hyun-Joong Kim KCJ and H-YK. Simultaneous Detection of Four

- Foodborne Viruses in Food Samples Using a One-Step Multiplex Reverse Transcription PCR. *J Microbiol Biotechnol.* 2018/02/28. 2018 Feb;28(2):210–7.
62. Hennechart-Collette C, Dehan O, Laurentie M, Fraisse A, Martin-Latil S, Perelle S. Detection of norovirus, hepatitis A and hepatitis E viruses in multicomponent foodstuffs. *Int J Food Microbiol.* 2021 Jan;337:108931.
63. QUALFOOD. Base de Dados de Qualidade e Segurança Alimentar [Internet]. 2021.