

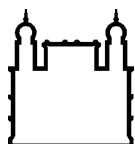
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE FLOCULAÇÃO
ORGÂNICA PARA RECUPERAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM
FRUTAS E QUEIJOS

FABIANA GIL MELGAÇO

Rio de Janeiro
Maio de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

FABIANA GIL MELGAÇO

Avaliação da metodologia de floculação orgânica para recuperação de vírus entéricos em frutas e queijos

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Orientador: Profa. Dra. Marize Pereira Miagostovich

RIO DE JANEIRO

Maio de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M521 Melgaço, Fabiana Gil

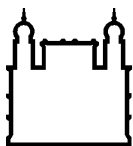
Avaliação da metodologia de floculação orgânica para recuperação de vírus entéricos em frutas e queijos / Fabiana Gil Melgaço. – Rio de Janeiro, 2016.
xiv, 102 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 59-71

1. Adenovírus. 2. Floculação orgânica. 3. Frutas. 4. Gastroenterite. 5. Norovírus. 6. Queijos. I. Título.

CDD 579.2443



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

FABIANA GIL MELGAÇO

**AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE FLOCULAÇÃO ORGÂNICA PARA
RECUPERAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM FRUTAS E QUEIJOS**

ORIENTADOR: Profa. Dra. Marize Pereira Miagostovich

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Edson Elias da Silva - Presidente (IOC)

Prof. Dr. Victor Augustus Marin (Unirio)

Prof. Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino (INCQS)

Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto (IOC)

Prof. Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (INCQS)

Rio de Janeiro, 24 de maio de 2016

Dedico esse trabalho à minha família, mãe, irmã, pai e ao meu namorado que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e compreendendo todos os momentos que precisei estar ausente.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro (MCTI/CNPq/ANVISA no. 23/2012; Processo 403264/212-0).

À Pós-graduação em Biologia Parasitária por oferecer um sistema de ensino importante para meu aprimoramento profissional e de formação científica.

A todos os colegas e amigos que fiz durante a realização de disciplinas e experimentos no laboratório.

À “família” do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental por me receber, me auxiliar, me compreender, me amparar e me orientar durante todo o curso de Doutorado.

Aos meus alunos e colegas de trabalho, do CEDERJ e do IFRJ, que compreenderam todas as minhas falhas e ausências, além de serem grandes companheiros para realização dessa jornada acadêmica.

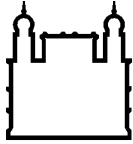
À toda equipe do Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-INCQS que participou das coletas e análise bacteriológica das matrizes alimentares.

À minha orientadora, Marize Pereira Miagostovich, que me aceitou como aluna, e auxiliou para o meu aprimoramento e desenvolvimento profissional e para a realização de um sonho.

A todos que direta ou indiretamente participaram na realização desse trabalho.

À Deus, pela oportunidade da vida e por me oferecer momentos maravilhosos.

“Desaprender para aprender. Deletar para escrever em cima. Houve um tempo em que eu pensava que, para isso, seria preciso nascer de novo, mas hoje sei que dá para renascer várias vezes nesta mesma vida. Basta desaprender o receio de mudar. ” Martha Medeiros



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

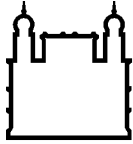
AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE FLOCULAÇÃO ORGÂNICA PARA RECUPERAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM FRUTAS E QUEIJOS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Fabiana Gil Melgaço

Atualmente, os vírus entéricos, principalmente os norovírus humanos (NoV), são descritos como os principais causadores de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), especialmente os de rápido preparo e consumo, como frutas e frios. Devido às baixas concentrações de vírus entéricos em amostras de alimentos, é necessário dispor de um método de detecção rápido e eficiente que permita esclarecer surtos de origem alimentar e implementar medidas de prevenção quando necessárias. Este estudo teve como objetivo adaptar e avaliar a metodologia de floculação orgânica com leite desnatado para recuperação de vírus em frutas e queijos, comparando sucesso e eficiência de recuperação viral com outras metodologias previamente estabelecidas, assim como avaliar a qualidade microbiológica destes alimentos em municípios do Estado do Rio de Janeiro incluindo a pesquisa de vírus gastroentéricos. Ensaios de contaminação artificial em morangos, tomates e queijos foram realizados para recuperação de NoV GII.4 e norovírus murino 1 (MNV-1). O método de floculação orgânica por leite se mostrou eficiente para recuperação de NoV a partir de morangos e tomates quando comparado com métodos de polietileno glicol (PEG) e filtração por membranas carregadas negativamente. Entretanto, não se mostrou eficiente na recuperação viral em queijos, quando comparado com o método de extração direta por TRIzol®. Para avaliação da qualidade microbiológica destes alimentos, 270 amostras (90 de cada matriz) obtidas comercialmente foram concentradas por floculação orgânica (morangos e tomates) e TRIzol® (queijos). Todas as amostras foram testadas por PCR quantitativo (qPCR) para investigação de NoV GI, GII e adenovírus humanos (HAdV). MNV-1 foi utilizado com sucesso como controle interno de processo em todas as reações. NoV foram identificados apenas nas amostras de queijos, enquanto a presença de HAdV foi observada em frutas e queijos. Adicionalmente foram realizadas análises bacteriológicas que revelaram coliformes termotolerantes em amostras de morangos e queijos. Nas amostras de queijos também se observou contaminação por *Staphylococcus coagulase positiva*, abaixo dos padrões determinados pela legislação brasileira. Concluindo, os resultados obtidos neste estudo apresentam a metodologia de floculação orgânica como alternativa de baixo custo, para frutas, e o uso do TRIzol® em queijos que auxiliarão na vigilância laboratorial de surtos, gerando informações que permitam uma estimativa mais exata da proporção de surtos de NoV atribuídos a transmissão de origem alimentar.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ASSESSMENT OF SKIMMED MILK ORGANIC FLOCCULATION METHOD FOR RECOVERY OF ENTERIC VÍRUSES IN FRUITS AND CHEESE

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Fabiana Gil Melgaço

Currently, enteric viruses, primarily human norovirus (NoV), are described as the main cause of foodborne disease outbreaks (FBD), especially those of rapid preparation and consumption, like fruits and dairy. Due to the low concentrations of enteric virus in food samples, it is necessary to have a fast and efficient detection method that allows to elucidate foodborne outbreaks and to implement preventive measures when necessary. This study aimed to adapt and evaluate the skimmed milk organic flocculation methodology for virus recovery in fruits and cheeses, comparing success and the efficiency of viral recovery with other previously established methods, and assess the microbiological quality of food in the State of the Rio de Janeiro municipalities including gastroenteric virus. Artificially contaminated strawberries, tomatoes and cheeses were evaluated for NoV GII.4 and murine norovirus 1 (MNV-1) recovery. The organic flocculation method was efficient for the NoV recovery from strawberries and tomatoes as compared to polyethylene glycol (PEG) and filtration negatively charged membranes. However, this methodology was not efficient for viral recovery in cheese when compared with the method of direct extraction by TRIzol®. To evaluate the microbiological quality of food, 270 samples (90 of each matrix) commercially obtained were concentrated by organic flocculation (strawberries and tomatoes) and TRIzol® (cheese). All samples were assayed by quantitative PCR (qPCR) for investigation NoV GI, GII and human adenovirus (HAdV). MNV-1 was successfully used as an internal control process in all reactions. NoV were identified only in the cheeses samples, while the presence of HAdV was observed in fruits and cheese. In addition bacteriological analysis revealed that fecal coliforms in samples of strawberries and cheese. In cheese samples was also observed contamination for *Staphylococcus coagulase positive* below the Standards Brazilian. In conclusion, the results of this study present a skimmed milk organic flocculation methodology as a low cost alternative, for fruits, and the use of TRIzol® in cheeses that can assist in laboratory surveillance of outbreaks, generating information for a more accurate estimate of the proportion of NoV outbreaks attributed to foodborne transmission.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Vírus em Alimentos	9
1.2	Vírus gastroentéricos associados à contaminação em alimentos	12
1.2.1	Norovírus	12
1.2.2	Adenovírus.....	16
1.2.3	Norovírus murino como controle interno de processo	19
1.2.4	Métodos de eluição e concentração para obtenção de vírus em alimentos.....	20
1.3	Prevenção e controle	22
1.4	Justificativa.....	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral.....	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Vírus utilizados nos experimentos de contaminação artificial.....	27
3.2	Matrizes alimentares	27
3.3	Limite de detecção do método de amplificação quantitativa (qPCR) e experimentos de contaminação artificial	28
3.4	Métodos de eluição e concentração viral.....	28
3.4.1	Morangos.....	28
3.4.2	Tomates.....	31
3.4.3	Queijos.....	32
3.5	Extração de RNA e detecção por reação de PCR em tempo real quantitativo (qPCR).....	34
3.6	Caracterização genômica	36
3.7	Avaliação bacteriológica	36
3.8	Análise dos dados e análise estatística	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Teste do limite de detecção da reação de PCR em tempo real (qPCR).....	38
4.2	Morangos	38

4.2.1	Estabelecimento do método de floculação orgânica por leite	38
4.2.2	Taxa de sucesso de recuperação e a eficiência de recuperação dos métodos 1, 2 e 3	38
4.2.3	Contaminação natural de vírus e bactérias.....	39
4.3	Tomates.....	43
4.3.1	Taxa de sucesso e eficiência de recuperação dos métodos aplicados.....	43
4.3.2	Contaminação natural de vírus e bactérias.....	44
4.4	Queijos	46
4.4.1	Taxa de sucesso e eficiência de recuperação dos métodos aplicados.....	46
4.4.2	Contaminação natural de vírus e bactérias.....	46
5	DISCUSSÃO	48
6	PERSPECTIVAS	56
7	CONCLUSÕES	57
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9	APÊNDICES E/OU ANEXOS	71
9.1	Artigo 1.....	71
9.2	Artigo 2.....	78
9.3	Artigo 3.....	83
9.4	Artigo 4.....	95

ÍNDICE DE QUADRO E FIGURAS

Quadro 1: Iniciadores e sondas utilizadas para detecção quantitativa de norovírus murino tipo 1 (MNV-1), norovírus genogrupos I e II (NoV GI e GII) e adenovírus humano (HAdV) por reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	35
Figura 1: Número de surtos de gastroenterite de origem alimentar identificados no Brasil no período de 2000-2014 de acordo com o agente etiológico envolvido.....	10
Figura 2: Possíveis rotas de transmissão de vírus entéricos. Adaptado de Mathijs et al., (2012).	12
Figura 3: Classificação dos norovírus em sete genogrupos baseada na diversidade da sequência completa de aminoácidos da proteína de capsídeo VP1 (Adaptado de Vinjé, 2015).	14
Figura 4: (A) Imagem da cristalografia de raio-X da estrutura do capsídeo de norovírus. (B) Estrutura da subunidade da proteína VP1 em representação ribossômica (Prasad et al., 1999).	15
Figura 5: (A) Separação e identificação das proteínas do adenovírus humano (HAdV) em eletroforese em gel de poliacrilamida; (B) Diagrama esquemático mostrando as proteínas estruturais da partícula viral; as principais proteínas do capsídeo (Hexon, Penton e fibras), formam as 20 faces do capsídeo icosaédrico; as proteínas essenciais, proteína terminal, Mu, V e VII, estão associadas com o genoma do DNA fita dupla linear (Adaptada de Russel, 2000).	18
Figura 6: Fluxograma dos métodos de eluição e concentração viral utilizados para recuperação de Norovírus GII e Murino tipo 1 em amostras de morangos.	30
Figura 7: Fluxograma dos métodos de eluição e concentração viral utilizados para recuperação de Norovírus GII e Murino tipo 1 em amostras de tomates.	32
Figura 8: Fluxograma dos métodos de eluição e concentração viral utilizados para recuperação de Norovírus GII e Murino tipo 1 em amostras de queijos.....	33
Figura 9: Taxa de sucesso de recuperação (%) de norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) (barras pretas) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) (barras com linhas verticais) de acordo com os métodos utilizando tampão alcalino e sacos com filtro.	41
Figura 10: Árvore filogenética baseada no fragmento parcial (171 pb) do hexon gene de adenovírus (HAdV) presente em amostras de morangos obtidas em diferentes cidades do estado do Rio de Janeiro. O número de nódulos internos representa o valor de bootstrap obtido de 1,000 replicatas. As amostras detectadas neste estudo estão marcadas com círculos em preto.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxa de sucesso de recuperação (%) e eficiência de recuperação (%) para um total de 24 reações de qPCR para norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) no método de floculação orgânica por leite.	40
Tabela 2: Eficiência de recuperação de norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) dos métodos avaliados utilizando tampão glicina Tris-HCl e sacos com filtro.	41
Tabela 3: Taxa de sucesso de recuperação (%) e eficiência de recuperação (%) para um total de 24 reações de qPCR para norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) nos dois métodos analisados.	45
Tabela 4: Análise qualitativa e quantitativa da recuperação de norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) do total de 24 reações de qPCR em amostras de queijos.	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AdV	Adenovírus
cDNA	DNA complementar
cg	cópias genômicas
Ct	Limiar do ciclo
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
Da	Dalton
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
g	gramas
h	horas
HAdV	Adenovírus humano
HAV	Vírus da Hepatite A
HBGA	Antígenos do grupo sanguíneo ABO
HCl	ácido clorídrico
HEV	Vírus da Hepatite E
HPyV	Poliomavírus humano
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
ISO	Organização Internacional para Padronização
kb	kilobases
M	molaridade
min	minutos
mL	mililitro
MNV-1	norovírus murinho 1
N	normalidade
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Diidrogeno fosfato de sódio
NLV	<i>Norwalk-like vírus</i>
nm	nanômetros
NoV GI	Norovírus genogrupo I
NoV GII	Norovírus genogrupo II

NoV GII.4	Norovírus genótipo GII.4
NoV	Norovírus humano
NS	Proteína não estrutural
ORF	sequência da região aberta de leitura
pb	pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial de hidrogênio
ppm	Partes por milhão
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
RNA	ácido ribonucleico
s	segundos
SLV	<i>Sapporo-like vírus</i>
SPCV	Controle interno dos procedimentos
TTV	Torque teno vírus
U.V.	luz ultravioleta
UFC	Unidade formadora de placa
v/v	volume por volume
VP1	Proteína de capsídeo de norovírus
xg	Força G
μL	microlitros

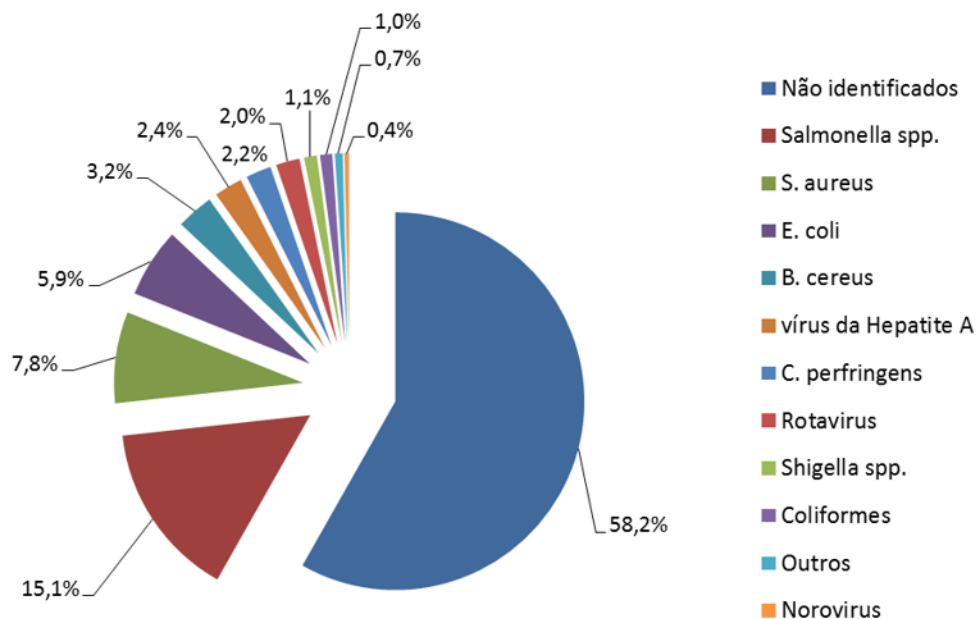
1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus em Alimentos

A transmissão de vírus veiculada por alimentos foi evidenciada no início do século XX, quando surtos de poliometelite foram associados ao consumo de leite (Gerba, 2006). Nos anos 1950, foi relatada a primeira transmissão de vírus da hepatite A (HAV) por moluscos bivalves na Suécia e posteriormente, nos Estados Unidos da América (EUA). Nos anos posteriores foram notificados surtos de origem alimentar, contudo nenhum vírus pôde ser isolado *in vitro*. Durante muitos anos, os estudos de transmissão viral por alimentos estavam restritos à detecção de vírus em moluscos bivalves e ao risco potencial de contaminação pela utilização de águas residuais não tratadas para irrigação na agricultura (Gerba, 2006).

O advento e aplicação de ferramentas moleculares de detecção, permitiram que os vírus fossem implicados como os principais agentes etiológicos de doenças associadas a alimentos contaminados no mundo todo. Atualmente, os norovírus (NoV) seguidos da bactéria *Campylobacter* spp., são reconhecidos como principais agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e representam um problema de saúde pública, acompanhadas por considerável perda econômica (Havelaar et al., 2015). No período de 2009-2012, 14,5% dos surtos relatados no perfil global foram causados por NoV e atribuídos a contaminação de alimentos (Verhoef et al., 2015).

No Brasil, no período de 2000-2014, foram notificados 10.509 surtos de DTA ao Ministério da Saúde, com 206.504 doentes e 164 óbitos. O sudeste foi a região que notificou maior número de surtos (40,0%), seguida das regiões sul (35,6%) e nordeste (14,5%). Em 58,2% dos surtos os agentes etiológicos não foram identificados, no restante foram detectados *Salmonella* spp (15,1%), *Staphylococcus aureus* (7,8%), *Escherichia coli* (5,9%), *Bacillus cereus* (3,2%), HAV (2,4%), *Clostridium perfringens* (2,2%), Rotavírus (2,0%), *Shigella* spp. (1,1%), Coliformes (1,0%), outros (0,7%), Norovírus (0,4%) (Figura 1) (Ministério da Saúde, 2015).



Fonte: SINAN net / Ministério da Saúde
 *Dados sujeitos a alteração.

Figura 1: Número de surtos de gastroenterite de origem alimentar identificados no Brasil no período de 2000-2014 de acordo com o agente etiológico envolvido.

Além da subnotificação e dos problemas e falhas na investigação de surtos ocasionados pelos diferentes agentes, muitas DTAs possuem outras rotas de transmissão (ambiental: água, solo e ar; contato pessoa-pessoa, fômites, aerossóis produzidos durante o vômito e contato pessoa-animais) dificultando a identificação do alimento como veículo transmissor (Havelaar et al., 2015).

Diversos vírus entéricos, tais como NoV, HAV, adenovírus humanos (HAdV), rotavírus A (RVA) e enterovírus estão relacionados a doenças ocasionadas pela ingestão de alimentos contaminados (Kotwal & Cannon, 2014). Entre os responsáveis pela gastroenterite aguda, os NoV são os agentes de maior impacto de veiculação alimentar (Lopman et al., 2003). Fatores como baixa dose infecciosa (menos de 10 partículas virais), ausência de imunidade duradoura, estabilidade do vírus no ambiente e a transmissão por variedade de rotas contribuem para o alto impacto dos surtos de gastroenterite por NoV (Lopman et al., 2003). A importância epidemiológica destes vírus nos surtos de origem alimentar é demonstrada pelo estabelecimento de redes laboratoriais de vigilância nos países industrializados (Verhoef et al., 2015).

A infecção por NoV tem período de incubação de 18-48h, apresentando sintomas como jatos de vômitos, diarreia com ausência de sangue, náuseas,

desconforto abdominal e febre branda. Em indivíduos saudáveis os sintomas não duram mais do que 48h, entretanto em crianças menores de cinco anos, idosos e em imunossuprimidos são mais prolongados e muitas vezes levam a hospitalização (Bok & Green, 2012).

Os HAdV são vírus entéricos também associados a contaminação de alimentos (Rodriguez-Manzano et al., 2013). Eles são frequentemente encontrados em águas residuárias no mundo todo, sendo considerados como vírus indicador de contaminação fecal humana em água (Wyn-Jones et al., 2011; Hewitt et al., 2013). Os tipos entéricos mais comuns são o HAdV-40 e o HAdV-41, associados a surtos e a transmissão por alimentos (Greening, 2006; Russell, 2009). Os HAdV podem manter a viabilidade no ambiente extracelular por períodos prolongados e, assim como os NoV, são estáveis na presença de diferentes agentes físicos e químicos, assim como condições adversas de pH e temperatura (Mena & Gerba, 2009). Os HAdV têm a capacidade de infectar distintos tecidos, incluindo o trato respiratório e a conjuntiva ocular sendo identificados como agentes etiológicos em diferentes patologias (Horwitz, 2001), também apresentando maior gravidade nas faixa etárias extremas e em indivíduos imunossuprimidos (Saha et al., 2014).

Devido às políticas de desenvolvimento sustentável discutidas atualmente, o reuso de água para irrigação e de dejetos animais para fertilização na agricultura tem sido frequentes, sendo possíveis fontes de contaminação na cadeia de produção de alimentos, principalmente de alimentos frescos (frutas e vegetais) (Maunula et al., 2013). Os NoV podem estar presentes tanto nas superfícies de alimentos e, em alguns casos, são internalizados. Moluscos bivalves acumulam e concentram partículas virais no sistema digestivo (Le Guyader et al., 2009) e em alguns vegetais, como em alfaces, morangos e cebolinha verde que, durante o cultivo, os vírus presentes no solo entram pelas raízes e se disseminam pelos tecidos vegetais das folhas e dos frutos (DiCaprio et al., 2012; Hirneisen & Kniel, 2013; DiCaprio et al., 2015). No caso de produtos lácteos e sanduíches preparados com queijo, frios e saladas, a rota mais comum de contaminação é a manipulação de alimentos que pode ocorrer nas fazendas (no preparo de queijos frescos), cantinas escolares, supermercados, restaurantes e outras fontes comerciais (Figura 2) (Mathijs et al., 2012; Godoy et al., 2016). Estes alimentos têm sido descritos como responsáveis por surtos gastrointestinais provocados por NoV em diversos países (Wit et al., 2007; Malek et al., 2009; Sarvikivi et al., 2012; Mäde et al., 2013),

sendo associados à manipulação inadequada (Stals et al., 2011a; Stals et al., 2011b).

A identificação direta de vírus em alimentos é dificultada, principalmente devido à complexidade da matriz alimentar, presença de inibidores, baixos níveis de contaminação viral e diversidade genética dos vírus. Diferentes métodos de eluição/concentração para a detecção de vírus em frutas e alimentos prontos para consumo têm sido descritos e otimizados. Atualmente, o uso de outros vírus animais como controle interno, em distintas etapas da análise de amostras de alimentos, tem sido sugerida (Baert et al., 2008a; Stals et al., 2011a; Stals et al., 2011b; Stals et al., 2012; Maunula et al., 2013).

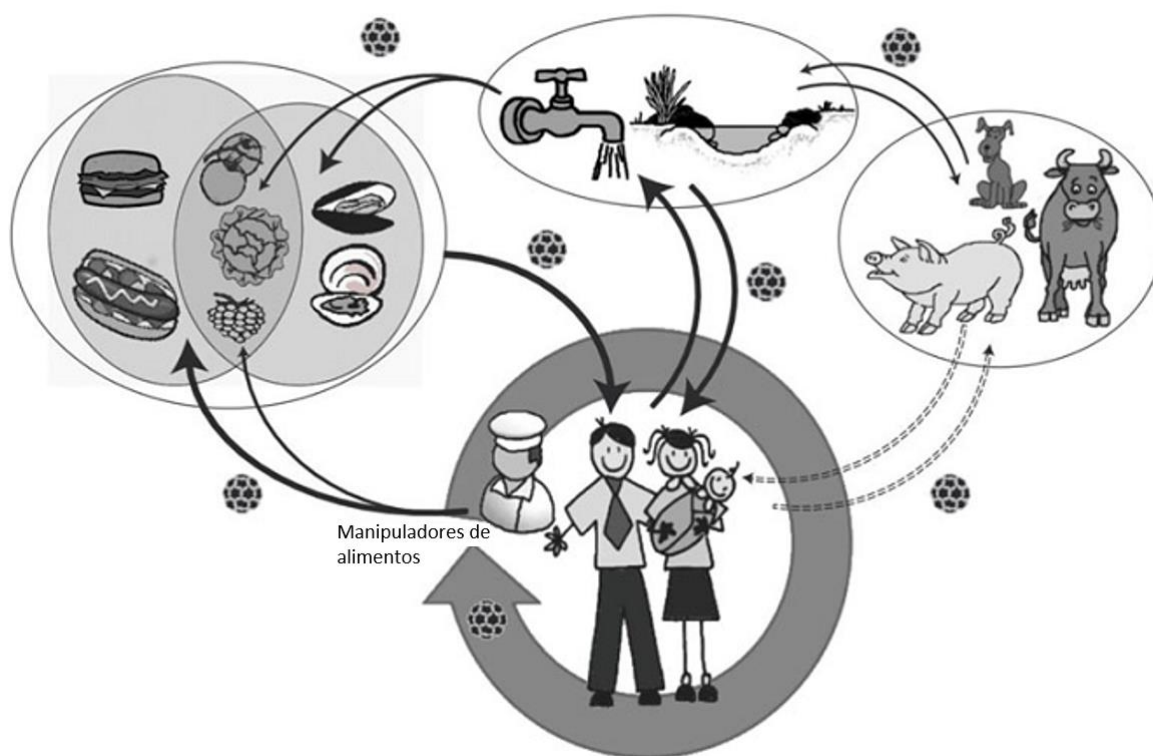


Figura 2: Possíveis rotas de transmissão de vírus entéricos. Adaptado de Mathijs et al., (2012).

1.2 Vírus gastroentéricos associados à contaminação em alimentos

1.2.1 Norovírus

1.2.1.1 Classificação e morfologia

Os NoV foram descobertos em 1972 por análise de imunomicroscopia eletrônica de amostras fecais de voluntários que foram induzidos ao

desenvolvimento da gastroenterite ingerindo filtrados fecais denominados “lavados fecais livres de bactérias” proveniente de amostras de surto ocorrido na cidade de *Norwalk*, Ohio em 1968 (Kapikian et al., 1972).

Nos anos 90, técnicas de biologia molecular possibilitaram a clonagem e sequenciamento completo do genoma do *Norwalk-like* vírus (Jiang et al., 1990; Lambden et al., 1993) resultando na sua inclusão na família *Caliciviridae*. Em 1998, no VII Encontro do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o gênero *Norwalk-like* vírus (NLV) foi criado com a espécie protótipo do vírus *Norwalk*. Em 2005, este mesmo Comitê renomeou o gênero *Norwalk-like* vírus para *Norovírus*. Atualmente, cinco gêneros compõem a família *Caliciviridae*: os *Vesivírus*, os *Lagovírus*, os *Norovírus*, os *Nebovírus* e os *Sapovírus* (Clarke et al., 2011).

As partículas de NoV possuem diâmetro variando entre 27 a 30 nm, são não envelopadas e de simetria icosaédrica com aproximadamente 32 grandes depressões em forma de cálice na superfície do seu capsídeo (Green et al., 2007).

Atualmente, os NoV são classificados em sete genogrupos (GI-VII) baseado na análise da sequência de nucleotídeos da região do genoma que codifica para a proteína do capsídeo VP1. Em cada genogrupo, os NoV são classificados em genótipos, com 40 genótipos distintos considerando todos os genogrupos. Os NoV humanos pertencem aos genogrupos GI, GII e GIV (Zheng et al., 2006; Vinjé, 2015). O genótipo GII.4 é o mais prevalente em surtos e em casos esporádicos de gastroenterite aguda no mundo todo representando até 80% dos surtos (Kroneman et al., 2008; Vinjé, 2015). Os GIII e GV, consistem de NoV de origem bovina e murina, respectivamente (Karst et al., 2003; Wobus et al., 2006) e os GVI e GVII de origem canina (Vinjé, 2015) (Figura 3).

A distribuição dos diferentes genogrupos de NoV humanos pode estar associada com as rotas de transmissão, taxa de disseminação, água e/ou alimentos como veículos de transmissão. Alguns genogrupos estão relacionados com a sua estabilidade nas diferentes matrizes ambientais (água ou alimentos), sendo o GI mais frequente em amostras de água e GII em amostras de alimentos (Bitler et al., 2013). Nos surtos de origem alimentar, 10% estão associados ao genótipo GII.4, 27% a todos os outros genótipos e 37% causados por contaminação mista de GII.4 e outros NoV (Verhoef et al., 2015).

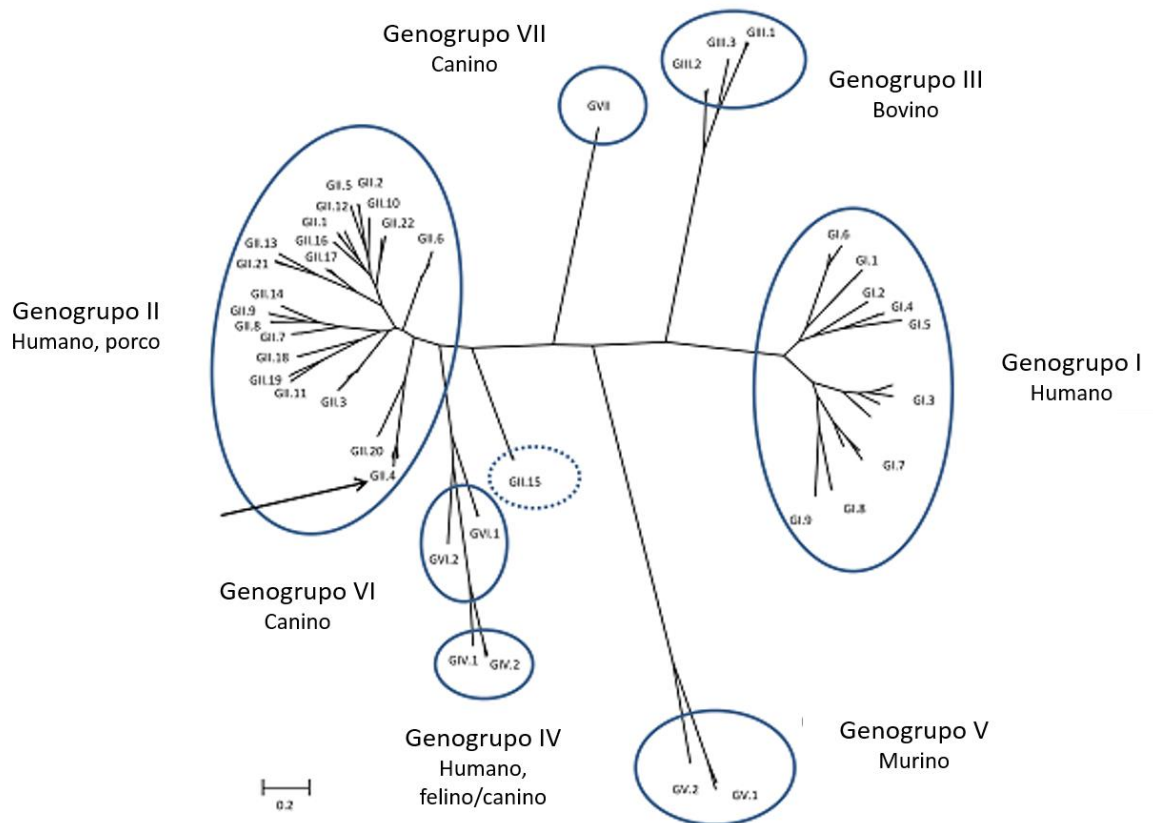


Figura 3: Classificação dos norovírus em sete genogrupos baseada na diversidade da sequência completa de aminoácidos da proteína de capsídeo VP1 (Adaptado de Vinjé, 2015).

1.2.1.2 Genoma e proteínas virais

O genoma do NoV é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva com tamanho entre 7,5 e 7,7 kb, organizado em três regiões abertas de leitura (ORF1, ORF2 e ORF3). A região da ORF1 codifica uma poliproteína, que sofre clivagem pós-traducional em sete proteínas não estruturais (NS1-NS7) relacionadas com a replicação viral. ORF2 produz a maior proteína estrutural (VP1), com aproximadamente 60 mil Da e a região da ORF3 codifica a menor proteína estrutural (VP2). O capsídeo viral contém 90 dímeros de VP1 e poucas cópias de VP2. A estrutura da VP1, por cristalografia de raio-X, revelou que essa proteína se desdobra em dois maiores domínios S e P (Figura 4). O domínio S circunda o RNA viral e o domínio P (ligado ao domínio S por articulação flexível) corresponde à parte C-terminal de VP1. O domínio P é dividido em dois subdomínios P1 e P2, sendo o segundo altamente variável contendo sítios de neutralização que interagem com os antígenos do grupo sanguíneo (HBGAs). VP2 é localizada no interior da partícula

viral e é, provavelmente, relacionada à montagem do capsídeo e ao encapsulamento do genoma (Prasad et al., 1999; Vongpunsawad et al., 2013).

Na extremidade 5' do genoma se encontra uma proteína covalentemente ligada denominada VPg e na extremidade 3' ocorre uma poliadenilação. Também é descrito constituindo o genoma viral um RNA subgenômico que funciona como molde para produção das proteínas estruturais durante a replicação viral. Assim como o RNA genômico, o subgenômico também está ligado covalentemente a proteína VPg na extremidade 5' e na extremidade 3' ocorre poliadenilação (Jiang et al., 1993; Lambden et al., 1993; Glass et al., 2000).

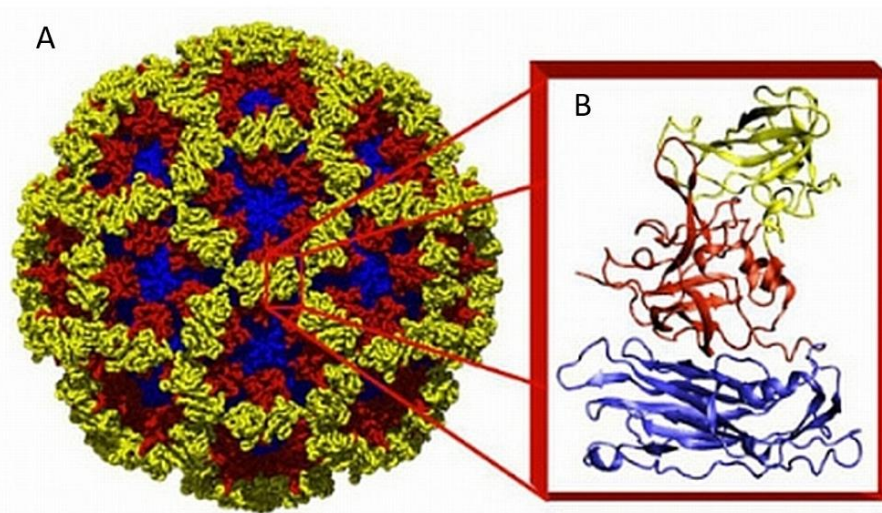


Figura 4: (A) Imagem da cristalografia de raio-X da estrutura do capsídeo de norovírus. (B) Estrutura da subunidade da proteína VP1 em representação ribossômica (Prasad et al., 1999).

1.2.1.3 Epidemiologia dos NoV

Surtos de gastroenterite aguda causados por NoV geralmente ocorrem em ambientes fechados com grande concentração de indivíduos, como em creches, asilos, hospitais, hotéis, escolas, quartéis e navios de cruzeiros (Wikswø et al., 2011; Doménech-Sánchez et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Godoy et al., 2016). Em navios de cruzeiros, alguns surtos relatam os alimentos ou os manipuladores de alimentos como origem da fonte de contaminação, com consequente expansão e rapidez no número de pessoas infectadas devido a transmissão pessoa-pessoa, via de transmissão predominante (Verhoef et al., 2008; Morillo et al., 2012; Bert et al., 2014).

Em 2006, no período de janeiro a agosto, o sistema de redes de vigilância laboratorial da Europa notificou 13 surtos em navios que coincidiram com a emergência de duas novas cepas do genótipo NoV GII.4, sem conseguir identificar a fonte de origem (alimentos ou água) (Verhoef et al., 2008).

Em um navio de cruzeiro no mar Báltico, no ano de 2007, foi relatado surto de gastroenterite apresentando como causa da infecção o NoV GII.4, identificado em amostras fecais de passageiros (Xerry et al., 2009). Recentemente, outro estudo identificou e caracterizou diferentes genótipos de NoV (GI e GII) como agentes responsáveis por um surto em navio de cruzeiro japonês, sem indicar fonte de origem de contaminação (Wang et al., 2015). O levantamento de dados de surtos em navios, na jurisdição norte americana no período de 2008-2014, revelou o total de 133 navios com surtos de gastroenterite, tendo 71% deles as amostras avaliadas, sendo 97% causados por NoV e a maioria por NoV GII.4 (Freeland et al., 2016).

No Brasil, NoV GI e GII foram identificados em amostras de alimentos (manteiga com ervas, queijo e molho branco) servidos em um navio de cruzeiro, indicando esses produtos como origem do surto (Morillo et al., 2012).

1.2.2 Adenovírus

1.2.2.1 Classificação e morfologia

O primeiro isolado de AdV foi descrito por um grupo de pesquisadores, em 1953, na tentativa de estabelecer uma linhagem celular de tecido de adenoide removido cirurgicamente de crianças e de recrutas militares com doenças febris (Rowe et al., 1953).

Segundo o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (ICTV, 2015b), os AdV são classificados na família *Adenoviridae* que está subdividida em cinco gêneros *Mastadenovirus* (vírus que infectam homens, símios, bovinos, equinos, caninos, suínos, ovinos e roedores), *Aviadenovirus* (infectam aves em geral), *Atadenovirus* (cervos, patos e répteis), *Siadenovirus* (anfíbios e perus) e *Ichtadenovirus* (infectam peixes).

Até o momento, já foram identificados 68 sorotipos distintos de HAdV, divididos em sete espécies (A-G), com base na similaridade de superfícies gênicas, padrões de hemaglutinação e perfis sorológicos (Nemerow et al., 2009; Henquell et al., 2009; Robinson et al., 2011; Ghebremedhin, 2014).

Os AdV são vírus não envelopados, com 70-90 nm de diâmetro, capsídeo icosaédrico (contendo vinte faces triangulares e doze vértices) (ICTV, 2015b).

1.2.2.2 Genoma e proteínas virais

Os AdV possuem dupla fita de DNA linear com 28–45 kb e apresentam 11 proteínas constituintes da partícula viral, denominadas polipeptídeos (II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e TP). As proteínas são numeradas de acordo com a sua migração em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (Figura 5). Sete compõem o capsídeo viral (II, III, IIIa, IV, VI, VIII, IX), que contém 252 capsômeros, sendo 240 constituídos pela proteína hexon (PII), compondo as faces do icosaedro, e os 12 restantes são compostos pelas proteínas penton-base (PIII) e fibra (PIV) (Figura 5). Cada penton projeta uma fibra proteica que varia para cada sorotipo de HAdV, com exceção de HAdV entéricos (sorotipos 40 e 41) que projetam duas fibras proteicas (Shenk, 1996; Smith et al., 2010; Robinson et al., 2011).

Por possuírem DNA dupla-fita como genoma, os AdV têm a capacidade de utilizar o sistema de reparo de DNA de células hospedeiras. Ter DNA como ácido nucléico também permite viabilidade prolongada no ambiente e aumenta sua resistência à inativação pela luz ultra-violeta (U.V.) (Thurston-Enriquez et al., 2003). Por conta do genoma estável, esses vírus apresentam difícil eliminação durante a higienização da superfície de alimentos contaminados.

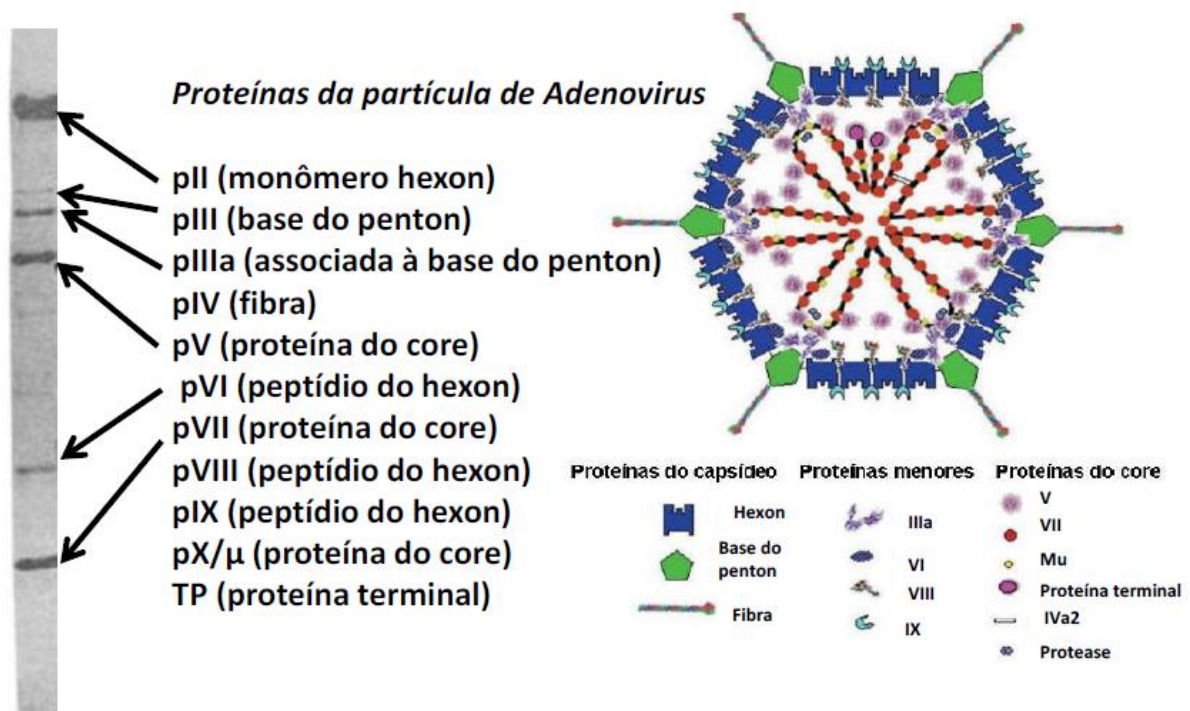


Figura 5: (A) Separação e identificação das proteínas do adenovírus humano (HAdV) em eletroforese em gel de poliacrilamida; (B) Diagrama esquemático mostrando as proteínas estruturais da partícula viral; as principais proteínas do capsídeo (Hexon, Penton e fibras), formam as 20 faces do capsídeo icosaédrico; as proteínas essenciais, proteína terminal, Mu, V e VII, estão associadas com o genoma do DNA fita dupla linear (Adaptada de Russel, 2000).

1.2.2.3 Adenovírus como indicador de contaminação fecal

Indicadores bacterianos de contaminação fecal, tais como *Enterococcus*, coliformes totais e coliformes termotolerantes são estabelecidos nas legislações internacionais e brasileira para avaliação do controle microbiológico da água para consumo e/ou recreacional (USEPA, 2000; WHO, 2008). No entanto, esses indicadores não apresentam correlação com a presença de vírus em diferentes matrizes ambientais, de modo que, atualmente, alguns estudos vêm sendo realizados para definir um vírus que possa ser utilizado como parâmetro de contaminação fecal humana (Bofill-Mas et al., 2013).

Estudos realizados com colifagos demonstraram que quando comparados com os parâmetros bacterianos, estes vírus apresentam melhor correlação do que os AdV, NoV e enterovírus (Jiang et al., 2007, Colford et al., 2007). No entanto, esses bacteriófagos não estão presentes em fezes humanas e de animais, como os indicadores bacterianos.

Torque teno vírus (TTV), assim como, os poliomavírus humano (HPyVs) também foram sugeridos como indicadores virais de contaminação fecal sendo correlacionados satisfatoriamente com os indicadores tradicionais (Griffin et al., 2008; McQuaig et al., 2009).

Os AdVs, assim como outros vírus e diferente das bactérias, não se replicam no ambiente e apresentam alta resistência. Eles têm especificidade de hospedeiro, são espécie-específicos, características que os confere como bom indicador em diferentes matrizes ambientais, associados a outros indicadores microbiológicos (Tong & Lu, 2011; Hundesa et al., 2006).

Dessa forma, alguns trabalhos têm utilizado AdV como indicador de contaminação fecal em amostras de alimentos. Diez-Valcarce et al., (2012) avaliaram amostras de mexilhões obtidas em diferentes países (Finlândia, Grécia e Espanha) quanto a presença de NoV, HAV e hepatite E (HEV) utilizando HAdV como indicador. Quando avaliado em amostras de morangos e framboesas, HAdV apresentou melhor resistência a variações de temperatura possibilitando sua detecção na superfície de frutas que tinham sido contaminadas artificialmente com NoV GI, GII, MNV-1 e HAdV, mostrando sua capacidade como indicador (Verhaelen et al., 2012).

1.2.3 *Norovírus murino como controle interno de processo*

Para padronização e validação dos métodos utilizados para recuperação e detecção de vírus a partir de matrizes alimentares se faz necessário o uso de um controle interno de processo, que permita demonstrar ausência de inibição do método, fator crítico para detecção molecular dos vírus, devido a presença de substâncias inibidoras das reações enzimáticas nas distintas matrizes. O vírus ideal para ser utilizado como controle interno dos procedimentos deve ser geneticamente relacionado ao vírus testado, de fácil cultivo e obtenção e improvável de ser encontrado por contaminação natural no alimento (Stals et al., 2012).

Em 2003, o Norovírus Murino 1 (MNV-1), pertencente ao genogrupo V (ICTVdB, 2015a) que infecta camundongos, foi descrito e caracterizado (Karst et al., 2003). Atualmente, é o único NoV capaz de se replicar tanto em cultura celular como em modelos animais, e por isso tem sido bem aceito como vírus modelo para os estudos de NoVs (Wobus et al., 2004). MNV-1 pode ser produzido rotineiramente

por infecção de macrófagos de origem murina, da linhagem celular RAW 264.7 e é facilmente quantificado utilizando ensaios de placa de lise (Wobus et al., 2006). Outros vírus, tais como: calicivírus felino, mengovírus e bacteriófago MS2 têm sido descritos como controle interno de procedimentos em análise de amostras de frutas e alimentos prontos para consumo (Mattison et al., 2009; Comelli et al, 2008; Blaise-Boisseau et al., 2010).

Do ponto de vista molecular, MNV-1 compartilha muitas características genéticas com NoVs. A análise do genoma de MNV (RNA fita-simples com aproximadamente 7.5 kb) identificou 3 fases abertas de leitura (ORF) características de *Norovírus* e *Versivírus*, dois gêneros da família *Caliciviridae* (Karst et al., 2003). Em relação à patogenia, MNV-1 também compartilha com NoVs a capacidade de se dispersar pela via fecal-oral e altas concentrações de partículas virais são encontradas nas fezes do animal infectado (Wobus et al., 2004).

Devido à sua relação taxonômica com os NoV humanos, capacidade de propagação em cultura celular e improvável detecção em alimentos higienizados, os MNV-1 vêm sendo utilizados como substitutos nos experimentos de recuperação de vírus em diferentes matrizes alimentares envolvendo NoV humanos (Stals et al, 2011a; Stals et al, 2011b).

1.2.4 Métodos de eluição e concentração para obtenção de vírus em alimentos

A estratégia para identificação de vírus em alimentos consiste em três etapas: extração viral, purificação do ácido nucléico e detecção molecular. A etapa de extração viral do alimento é definida em etapas de separação e concentração de partículas virais da matriz alimentar, também descrita como etapas de eluição e concentração (Stals et al., 2012).

Nos últimos anos, muitos métodos têm sido descritos e avaliados para recuperação de vírus, utilizando distintos tampões de eluição (alcalinos e neutros) associados a etapas de concentração com diferentes reagentes (Brandão et al., 2014a; de Abreu Corrêa & Miagostovich, 2013; David et al., 2007; Le Guyader et al., 2004). Para a etapa de concentração já foram descritos a utilização de precipitação pelo polímero polietilenoglicol (PEG), ultracentrifugação, imunoconcentração, filtração com membranas carregadas positiva ou negativamente, entre outros. Também são relatados métodos de extração direta por solventes orgânicos (reagente TRIzol®) combinados ou não com etapas de clarificação, utilizando grande variedade de reagentes (enzimas, detergentes catiônicos, clorofórmio/butanol,

Vertrel) (Baert et al, 2008b; Boxman et al., 2007; Brassard et al., 2012; Fumian et al., 2009; Le Guyader et al., 2008; Mäde et al., 2013; Morales-Rayas et al., 2009; Park et al., 2008; Rzezutka et al., 2005; Stals et al., 2011a; Stals et al., 2011b; Summa et al., 2012).

Cada tipo de matriz alimentar (frutas, laticíneos, entre outros) requer métodos específicos, que obtenham extração viral eficiente, diminuindo a presença de inibidores (proteínas, polissacarídeos, lipídeos, pigmentos) na detecção molecular (Demeke and Jenkins, 2010).

Em março de 2013, a Organização Internacional para Padronização (*International Organization for Standardization - ISO*) validou e padronizou métodos de eluição-concentração para recuperação e detecção de NoV e HAV para quatro classes de alimentos [(ISO)/TS 15216-1], incluindo água para consumo, frutas e vegetais, superfícies e moluscos bivalves. Nessa norma também foi estabelecido o método de extração de material genético por lise com guanidina e isotiocianato com adsorção em sílica (Boom et al., 1990). A detecção quantitativa de NoV GI e GII pela amplificação e detecção do RNA foi padronizada em única etapa: formação do DNA complementar por transcrição reversa e reação de amplificação em uma mesma reação, por PCR em tempo real (RT-qPCR), utilizando iniciadores e sondas descritos por Svraca et al. (2007) e da Silva et al., (2007) para NoV GI e Loisy et al., (2005) e Kageyama et al., (2003) para NoV GII.

Recentemente, o sistema de PCR em tempo real nanofluidico, método com alto rendimento para detecção molecular qualitativa e quantitativa de vírus entéricos por RT-PCR (RT-dPCR) digital, tem sido sugerido para detecção de vírus em matrizes alimentares. A técnica é baseada no cálculo de número de cópias genômicas obtidas por espectrofotometria o que reduz a interferência de substâncias inibitórias na quantificação de vírus em componentes de matrizes alimentares, entretanto o alto custo é uma desvantagem (Coudray-Meunier et al., 2016).

No Brasil, métodos de eluição e concentração para recuperação de vírus em matrizes alimentares ainda não são estabelecidos em laboratórios de análise microbiológica de alimentos. Este é um dos fatores da subnotificação deste agente etiológico como causa de surtos DTA no país (Figura 1). O desenvolvimento destes métodos para diferentes matrizes alimentares, assim como estudos de campo deverão contribuir para as políticas de segurança alimentar no país.

1.3 Prevenção e controle

A higienização adequada das mãos e das superfícies onde são armazenados e preparados os alimentos é a melhor forma de prevenção e controle da contaminação viral. Alguns estudos já comprovaram a alta taxa de transferência viral de alimentos contaminados para fômites e de fômites contaminados para alimentos (Escudero et al., 2012; Stals et al., 2013; Sharps et al., 2012), assim como a resistência de alguns vírus a períodos prolongados de congelamento (Croci et al., 2002).

Devido à grande estabilidade dos vírus entéricos (não envelopados) no ambiente por períodos prolongados alguns métodos de inativação de vírus têm sido estudados em diversas matrizes alimentares (Kramer et al., 2006). Alguns pesquisadores recomendam que purês de frutas (framboesas) sofram tratamento prévio com fervura por 1 minuto antes de serem consumidos (Einöder-Moreno et al., 2016). O processamento de alimentos com alta pressão hidrostática é uma técnica sem recursos térmicos, que conserva atributos sensoriais originais e evita perdas nutricionais, e vem sendo comercializada e avaliada no tratamento contra a contaminação viral de alguns produtos como doces de frutas, purês de morangos e framboesas, suco de laranja, salsa, guacamole, carnes e laticíneos, ostras e lagostas (Li et al., 2013; Ye et al., 2014; Huang et al., 2016).

A sanitização de frutas e verduras em contato com solução de hipoclorito de sódio por 30 minutos é a forma comumente recomendada no Brasil, assim como o uso da mesma para limpeza de artigos e superfícies (Anvisa, 2014). Lavagens de frutas com água clorada (com 200 ppm de cloro) e solução de dióxido de cloro (10 ppm/ 10 min ou 20 ppm/ 1 min) reduz a quantidade de partículas virais, mas não elimina totalmente o risco de infecção por ingestão do alimento higienizado (Butot et al., 2008; Girard et al., 2016). Outros agentes surfactantes, como dodecil sulfato de sódio (SDS), Nonidet P-40 (NP-40), Triton X-100 e Tween 20 em concentrações de 50 ppm apresentam resultados satisfatórios na atividade virucida em superfície de frutas e vegetais, sugerindo o uso desses produtos juntamente com a solução de cloro a 200 ppm para higienização efetiva desses produtos (Predmore & Li, 2011).

Outra forma de prevenção e controle da contaminação de alimentos em toda a cadeia de produção é através da análise de risco de infecção (Bouwknegt et al., 2015). Com a obtenção de dados da identificação dos possíveis perigos biológicos, da concentração viral presente nos alimentos, nas superfícies (fômites), na água de

irrigação e nas mãos de manipuladores de alimentos, avalia-se o risco de infecção gastrointestinal obtida pelo consumo dos diferentes produtos alimentícios. A avaliação da quantidade de partículas virais (dose resposta) presente nas amostras de alimentos relacionada a quantidades ingeridas fornece dados que são analisados pelo programa @Risk 7.0 *Industrial Trial Version* que estima a probabilidade do risco proeminente de infecção que um indivíduo possui ao ingerir o alimento contaminado (Lodder et al., 2010; Bouwknecht et al., 2015). A relação entre uma cepa de NoV encontrada em um surto e a presença da mesma em amostras de produtos alimentícios define potencial risco de saúde pública que deve ser analisado e notificado a autoridades competentes.

1.4 Justificativa

A identificação do agente infeccioso viral em surtos de origem alimentar, em geral, baseia-se na detecção e caracterização do agente em amostras clínicas de pacientes infectados pela suspeita de ingestão de alimento contaminado. A detecção direta de vírus em alimentos é obtida raramente, devido à complexidade da matriz alimentar, presença de inibidores, baixos níveis de contaminação, e diversidade genética dos vírus. Diferentes métodos de eluição/concentração para a detecção de vírus em alimentos prontos para consumo e frutas têm sido descritos e otimizados, assim como, o uso de vírus animais como controle interno dos procedimentos, em distintas etapas da análise de amostras de alimentos. Como as metodologias de recuperação viral tendem a ser diversificadas, existe a necessidade de validação para cada tipo de matriz.

A importância epidemiológica dos vírus nos surtos de origem alimentar, especialmente dos NoV, é demonstrada pelo estabelecimento de redes de vigilância laboratorial destes vírus nos países industrializados (Europe Network/Noronet; CaliciNet; EpiSurv; NoV *Surveillance Network*; China CDC; *National Institute of Infectious Diseases*; *Central Laboratory, Medical Corps*). Neste contexto, o Comitê Europeu de Padronização (CEN), juntamente com Comitê Técnico ISO/TC 34, Produtos Alimentícios, Subcomitê SC 9 *Microbiology*, editou a norma ISO/TS 15216-1:2013 que visa padronizar as metodologias em todo o mundo e avançar no diagnóstico dos NoV, que conforme mencionado apresentam grande variabilidade, o que exige uma vigilância laboratorial ativa.

No Brasil, mais de 10 mil surtos associados à contaminação de alimentos foram notificados nos últimos anos, entretanto, mais da metade não possui agente etiológico definido. Até o momento, apenas um surto de gastroenterite de origem alimentar foi associado à contaminação por NoV no país, principalmente porque a legislação brasileira exige apenas indicadores de contaminação bacteriológica. Entretanto, devido a crescente importância epidemiológica dos surtos de NoV de origem alimentar em todo o mundo, em especial em navios de cruzeiros, o Programa Nacional de Fortalecimento das Ações de Vigilância Sanitária em Portos, Aeroportos e Fronteiras publicou em 6 de dezembro de 2012 a Portaria Nº 2.795, que estabelece a obrigatoriedade dos Laboratórios Centrais dos Estados (LACENs), que estejam na rota da temporada de cruzeiros (Amazonas, Bahia, Ceará, Pará, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo), de realizarem o diagnóstico de NoV a partir de águas e alimentos.

Dentro desta realidade, este estudo propôs a adaptação e otimização de uma metodologia de baixo custo baseada na floculação orgânica por leite desnatado, inicialmente descrita para recuperação viral em água do mar (Calgua et al., 2008), para recuperar vírus em distintas matrizes alimentares, utilizando o MNV-1 como controle interno destes procedimentos. O desenvolvimento destes métodos deve contribuir para a melhoria da avaliação do real impacto das infecções por NoV, bem como auxiliar estratégias de prevenção e controle da contaminação de vírus entéricos nos alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar a metodologia de floculação orgânica com leite desnatado para recuperação de vírus em frutas e queijos, comparando sucesso e eficiência de recuperação viral com outras metodologias previamente estabelecidas, assim como avaliar a qualidade microbiológica destes alimentos em municípios do Estado do Rio de Janeiro incluindo a pesquisa de vírus gastroentéricos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a recuperação de NoV GII.4 e MNV-1, por contaminação artificial, em amostras de morangos comparando as metodologias de floculação orgânica por leite, precipitação por PEG e filtração em membrana negativa;
2. Detectar e quantificar HAdV, NoV GI e GII e a presença de bactérias *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e coliformes termotolerantes pelo monitoramento de morangos obtidos comercialmente;
3. Avaliar, por contaminação artificial, a recuperação de HAdV em amostras de tomates utilizando a metodologia de floculação orgânica por leite e investigar a presença a contaminação por estes vírus, assim como a presença de bactérias *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e coliformes termotolerantes em amostras obtidas comercialmente;
4. Avaliar a recuperação de NoV GII.4 e MNV-1 em amostras de tomates contaminadas artificialmente, comparando as metodologias de floculação orgânica por leite e precipitação por PEG (ISO 15216-1), detectar e quantificar NoV GI e GII no monitoramento de amostras obtidas comercialmente;
5. Avaliar a recuperação de NoV GII.4 e MNV-1 em amostras de queijo “Minas” e queijo prato, artificialmente contaminadas, comparando as metodologias de floculação orgânica por leite e de eluição direta em solvente orgânico (TRIZOL®);

6. Detectar e quantificar HAdV, NoV GI e GII e presença de bactérias *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, coliformes termotolerantes, e *Staphylococcus coagulase positiva* no monitoramento de amostras de queijos obtidas comercialmente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a padronização da metodologia de floculação orgânica por leite e comparação com as metodologias previamente estabelecidas, foram realizados experimentos de contaminação artificial de vírus nas diferentes matrizes alimentares. Posteriormente, a metodologia que apresentou maior sucesso e eficiência de recuperação foi utilizada para monitoramento da contaminação viral em alimentos adquiridos comercialmente.

3.1 Vírus utilizados nos experimentos de contaminação artificial

Suspensão fecal contendo NoV GII, genótipo 4 (Genbank - DQ997040) obtida da coleção de amostras do Laboratório de Referência Regional de Rotavíruses (Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz) foi utilizada. MNV-1 cultivado e titulado em células RAW 264.7 (macrófagos transformados com Vírus da Leucemia Murina de Abelson, derivados de camundongos BALBc), cedido por Dr. Herbert W. Virgin da Universidade de Washington, Escola de Medicina, foi utilizado como controle interno dos procedimentos.

Os HAdV tipo 2 (HAdV-2) foram propagados em células HEK 293 (células de rim de embrião Humano) obtido da coleção de amostras do Laboratório de Referência Regional de Rotavíruses (Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz).

3.2 Matrizes alimentares

Foram utilizadas amostras de morangos frescos (*Fragaria vesca*), três variações de tomates [tomates frescos (*Lycopersicon esculentum*), tomates-cereja (*Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme*) e / ou híbridos (tomates uva)] e queijos do tipo prato e tipo “Minas” frescal. Os alimentos foram obtidos comercialmente em estabelecimentos comerciais de municípios do Estado do Rio de Janeiro: Morangos e tomates (Petropolis, Niterói e Rio de Janeiro) e queijos (Niterói e Rio de Janeiro).

As amostras foram transportadas à temperatura ambiente ao laboratório e, em seguida, resfriadas e/ou congeladas até a realização das etapas de processamento (eluição e concentração).

3.3 Limite de detecção do método de amplificação quantitativa (qPCR) e experimentos de contaminação artificial

Estoques virais e suas diluições (10^0 - 10^6) foram utilizados em triplicatas para avaliar o limite de detecção de NoV GII e MNV-1.

Nos ensaios de contaminação artificial avaliou-se a possibilidade de perda da carga viral durante as etapas de concentração e recuperação. NoV GII.4 e MNV-1 foram semeados sobre a superfície dos alimentos por aplicação direta de diluições de dez vezes (10^6 , 10^5 e 10^4 cópias genômicas/ml) de 250 μ L e 100 μ L, respectivamente, por aproximadamente 2 horas. HAdV-2 foram inoculados na superfície dos alimentos (10^6 cópias genômicas/mL de 200 μ L) conforme realizado com os outros vírus.

A quantidade de vírus inoculado nas amostras em experimentos de contaminação artificial foi determinada de acordo com o limite de detecção qPCR.

Para os experimentos de contaminação artificial e de campo foram analisadas 25g de amostras de morango e tomate e 10 g de queijo. Após pesagem, NoV GII e MNV-1 foram espalhados por aplicação direta na superfície dos alimentos que foram mantidos durante 2 horas à temperatura ambiente. Todos os experimentos de contaminação artificial foram realizados em triplicata e com um controle negativo (semeado com 350 μ L de PBS 1X).

Os métodos de recuperação viral mais eficientes para cada matriz alimentar foram aplicados para avaliar a contaminação de produtos comercializados nos municípios do Estado do Rio de Janeiro. Em todas as amostras de campo foram inoculadas 100 μ L de MNV-1 como controle interno de processo.

3.4 Métodos de eluição e concentração viral

3.4.1 Morangos

O método de floculação orgânica por leite foi primeiramente adaptado e otimizado para a matriz alimentar. Experimentos utilizando morangos inteiros e diferentes variáveis foram realizados, tais como tampões de eluição, recipientes e tratamento final com o detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Após a padronização, este método (Método 1) foi comparado com a precipitação com PEG (Método 2), e filtração com membranas carregadas negativamente

combinadas com ultra-filtração (Método 3) (Figura 6). O concentrado final (2 ml) obtido a partir de cada um dos métodos foi utilizado para extração de RNA e quantificado por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). A presença de HAdV, NoV GI e GII foi investigada em um total de 90 amostras, 25 g da fruta foram retiradas de 90 caixas distintas de morangos, obtidas durante junho-setembro de 2013 (seis amostras / semana) de mercados distintos. Além disso, a presença de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e coliformes termotolerantes também foi investigada.

3.4.1.1 Metodologias avaliadas

Método 1 (Floculação orgânica): este método que utiliza floculação orgânica por leite foi previamente descrito para detecção de NoV em amostras de água salgada (Calgua et al., 2008), e adaptado neste estudo para amostras de morangos. As frutas contaminadas artificialmente foram eluídas com dois tampões distintos (0,1 M Tris-HCl; 0,05 M glicina pH 9,5 e PBS 1x). Para avaliar a eficiência deste método, dois recipientes foram utilizados na etapa de eluição. Quando se utilizou o béquer, a eluição foi realizada por 1 hora com 400 mL de cada tampão (0,1 M Tris-HCl; 0,05 M glicina pH 9,5 e PBS 1x). Na eluição com saco com filtro (Nasco®, Fort Atkinson, Wisconsin, USA), foi utilizado volume de 225 mL por 30 min. de eluição. Antes de iniciar a floculação, o eluato foi transferido para recipiente limpo, o pH foi ajustado para 3,5 com HCl 6N e o leite foi adicionado na concentração final de 1%. A floculação orgânica foi realizada por 3 horas, sob agitação. Na etapa seguinte, a amostra floculada foi centrifugada (8,000 xg por 30 min) e o sedimento foi ressuspenso com 1 mL de tampão fosfato (pH 7.5; Na₂HPO₄ 0.2M/NaH₂PO₄ 0.2M; 1:2 v/v). A amostra concentrada foi avaliada quanto ao tratamento, utilizando 1,3% de detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Anterior a extração do material genético, soluções de 10% CTAB e 1,2 M NaCl foram adicionadas as amostras para atingir a concentração final de 1,25% CTAB e 0,45 M NaCl, incubado a 56°C por 30 min (Baert et al., 2008b).

Método 2 (Precipitação por polietilenoglicol): as amostras foram eluídas com tampão (0,1 M Tris-HCl; 3% extrato de carne; 0,05 M glicina pH 9,5) contendo 150 µL da enzima pectinase 1XL (Novozymes, Dittingen, Switzerland). Em seguida foram

concentradas e processadas com solução de polietilenoglicol (PEG 6000) conforme descrito por Baert et al (2008b); Stals et al., (2011a).

Método 3 (Filtração): as amostras foram eluídas em tampão (0,1 M Tris-HCl; 0,05 M glicina pH 9,5) e filtradas utilizando membranas carregadas negativamente, como descrito por Katayama et al. (2002) para recuperação de NoV em águas e adaptado por Fumian et al., (2009) e de Abreu Corrêa & Miagostovich, (2013) para recuperação de NoV a partir de matriz alimentar.

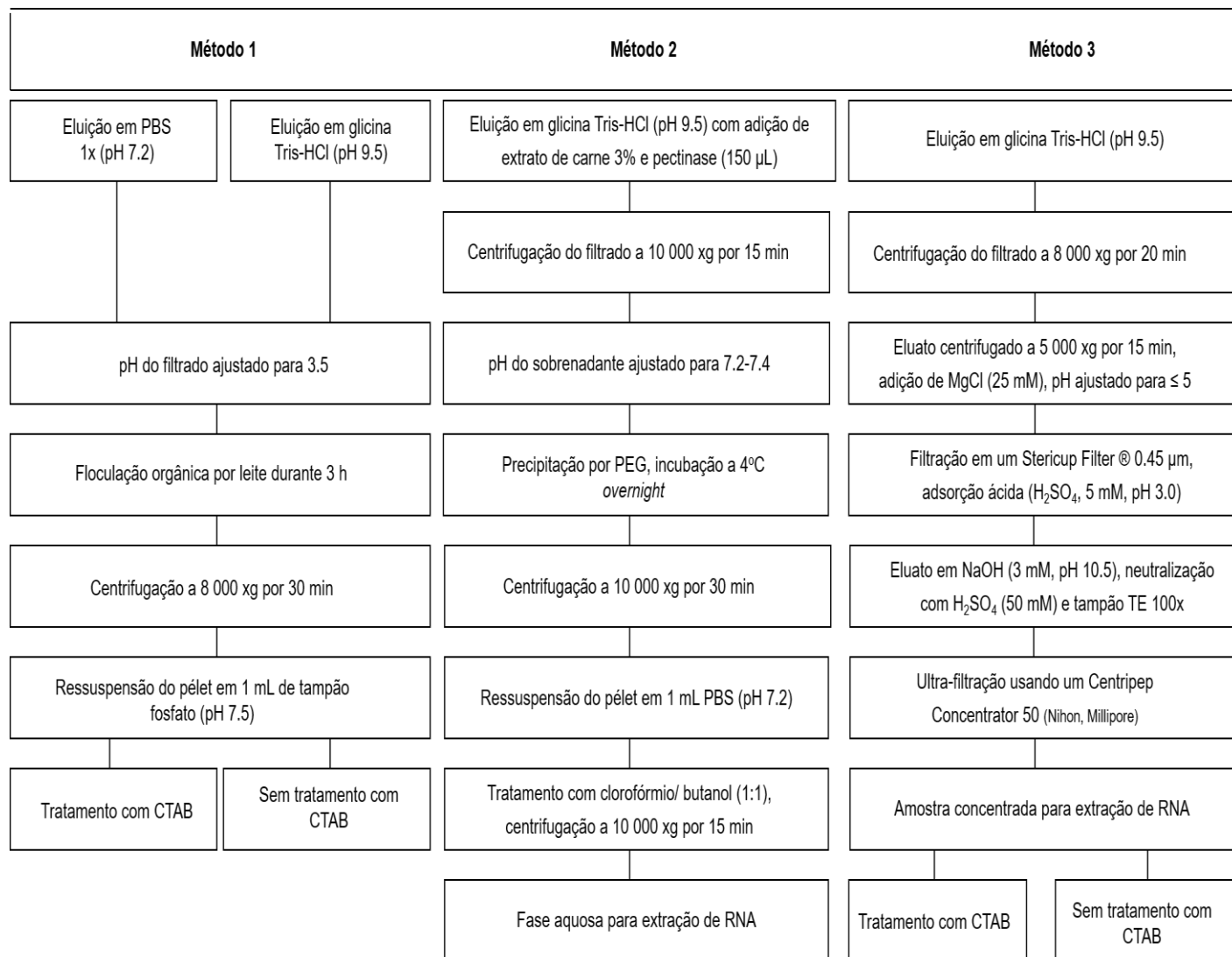


Figura 6: Fluxograma dos métodos de eluição e concentração viral utilizados para recuperação de Norovírus GII e Murino tipo 1 em amostras de morangos.

3.4.2 Tomates

As três variações de tomates [tomates frescos (*Lycopersicon esculentum*), tomates-cereja (*Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme*) e / ou híbridos (tomates uva)] foram utilizadas nos experimentos de contaminação artificial, sendo que o tomate uva também foi avaliado picado. Adicionalmente, foi realizada um experimento de contaminação artificial de HAdV pela adição de 200 µL deste vírus (1×10^6 cg/ml) em tomates para determinar a eficiência do método de floculação orgânica para recuperação nestas amostras.

Para esta matriz alimentar foram avaliados dois métodos: floculação orgânica por leite e precipitação por PEG, sendo o segundo avaliado apenas para contaminação por NoV. O método de floculação orgânica por leite foi realizado como descrito para as amostras de morangos, incluindo a utilização de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A precipitação por PEG foi efetuada de acordo com a norma ISO 15216-1:2013. As etapas referentes às duas metodologias estão representadas na Figura 7.

Posteriormente, noventa amostras de tomates [45 tomates frescos (*Lycopersicon esculentum*) e 45 tomates-cereja (*Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme*) e / ou híbridos (tomates uva)] obtidos de março a setembro de 2014 (três e cinco amostras/semana) de mercados distintos foram investigados no monitoramento quanto a presença de HAdV, NoV GI e GII, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e de coliformes termotolerantes. As noventa amostras correspondem a 25 g de uma unidade de tomate fatiado a partir de 45 tomates frescos distintos e 25 g de cada variação de tomate obtida de 45 caixas diferentes contendo as frutas (tomate cereja e tomate uva).

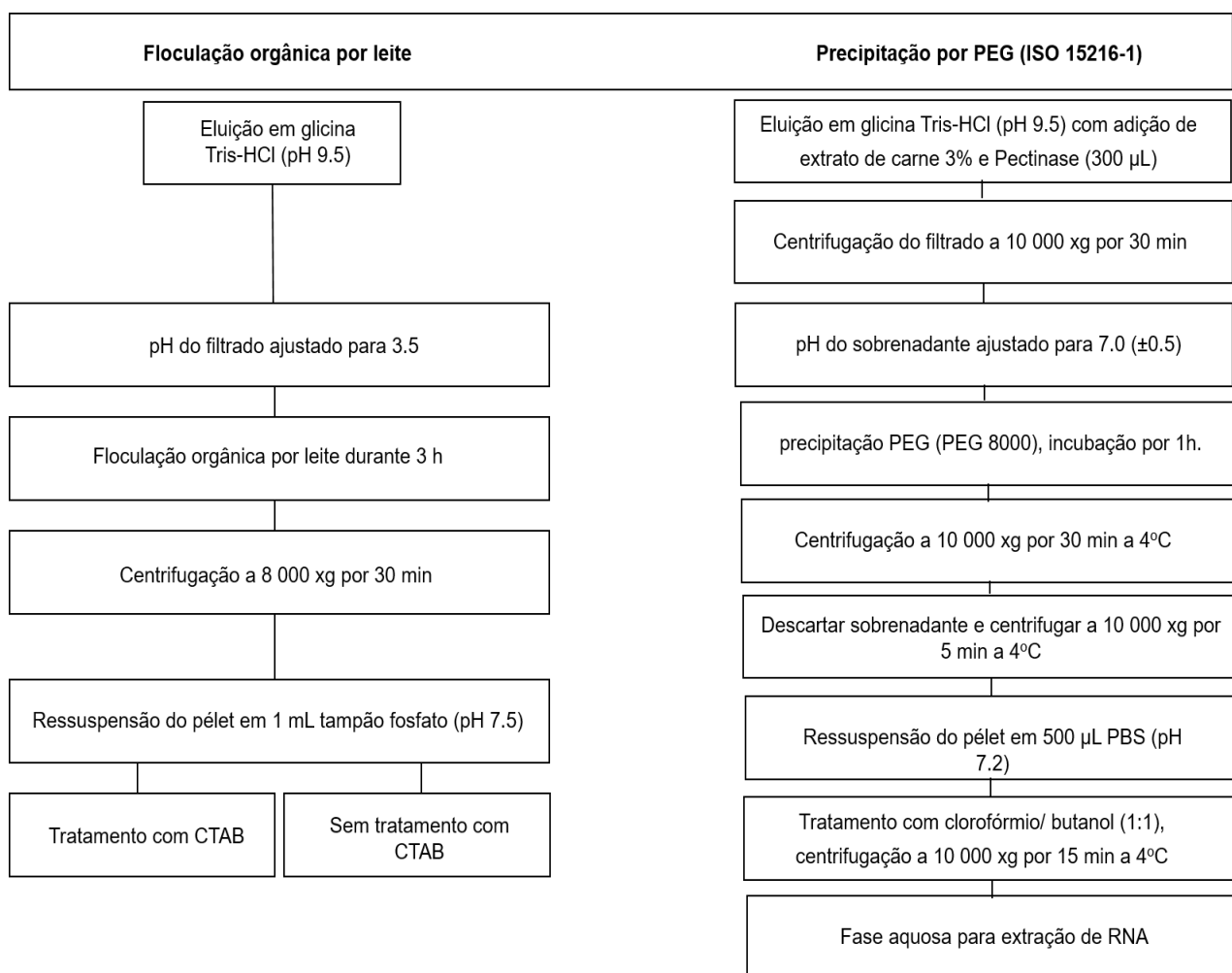


Figura 7: Fluxograma dos métodos de eluição e concentração viral utilizados para recuperação de Norovírus GII e Murino tipo 1 em amostras de tomates.

3.4.3 Queijos

Ao método de floculação orgânica, otimizado para amostras de frutas, foi adicionado um tratamento na etapa final com TRIzol®, a fim de otimizar sua eficiência neste tipo de matrix. Para a avaliação da recuperação viral de amostras de queijos "minas" e queijos prato esse método foi realizado e comparado com o método de extração direta por reagente TRIzol® (Método 2) descrito por Stals et al. (2011b). Para a investigação da presença de microrganismos (AdV, NoV GI e GII, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e coliformes termotolerantes), 90 amostras de lotes distintos foram coletadas (30 amostras de queijo "Minas", 30 amostras de queijo prato e 30 de queijo prato fatiados pelos estabelecimentos comerciais), no período de maio a novembro de 2015.

3.4.3.1 Metodologias avaliadas

Método 1 (Floculação orgânica por leite): As amostras de queijos (10 g) foram eluídas em 90 ml de tampão glicina 0,05 M/Tris-HCl 0,1 M durante 30 minutos em um saco com filtro (Nasco®, Fort Atkinson, Wisconsin, EUA). Em seguida, os eluatos foram transferidos para frascos estéreis e o pH ajustado a 3,5 utilizando HCl 6 N. O leite foi acrescentado a concentração final de 1%. O processo de floculação orgânica foi realizado durante três horas com agitação constante. Após esta etapa, as amostras floculadas foram centrifugadas (8 000 xg durante 30 min) e o pélet foi ressuspensão em 1 ml de TRIzol®.

Método 2 (extração direta por TRIzol®): 10 g de queijos foram homogeneizadas por contato direto com 6 ml de reagente TRIzol®, durante 20 minutos sob agitação em sacos com filtro. A seguir, o eluato foi centrifugado a 8 000 xg por 20 min a 4 °C e o sobrenadante recuperado e armazenado a -20 °C para posterior extração do ácido nucléico como descrito por Baert et al., (2008b).

Um esquema do fluxograma dos métodos utilizados está representado na Figura 8.

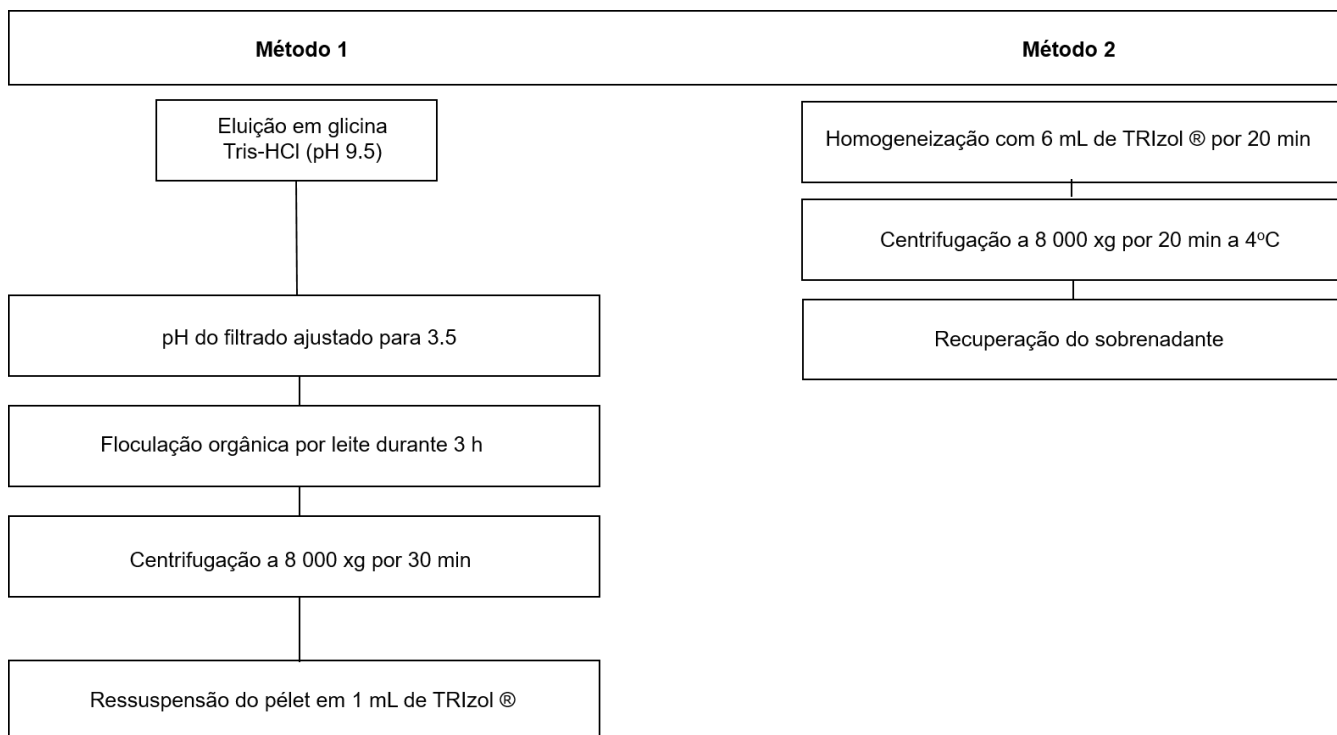


Figura 8: Fluxograma dos métodos de eluição e concentração viral utilizados para recuperação de Norovírus GII e Murino tipo 1 em amostras de queijos.

3.5 Extração de RNA e detecção por reação de PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

O RNA/DNA viral foi extraído a partir de 140µL das amostras concentradas pelas diferentes metodologias pelo método *QIAamp viral RNA mini-kit*® (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando iniciadores randômicos (Invitrogen®, EUA) para a detecção de vírus de RNA.

Para reação de PCR em tempo real para MNV-1, NoV (GI e GII) e HAdV utilizou-se o sistema TaqMan® (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando o conjunto de iniciadores e sondas específicos como apresentado no Quadro 1. Para quantificação do material genômico curva padrão foi produzida com oito pontos de diluições seriadas de material obtido de plasmídeos (10^7 - 10^0 cópias genômicas/reação) que produz valor de *slope* igual a -3,59 com eficiência de reação de 0,90.

Para as reações de qPCR foram utilizados 5 µL de amostra de DNA/cDNA, 12,5 µL de *Master mix universal* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), iniciadores e sondas correspondentes. Para as etapas de amplificação foram seguidas as seguintes condições: ativação de uracil N-glicosilase por 2 min a 50 ° C, ativação de *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) por 10 min a 95 ° C, seguido de 45 ciclos de amplificação (15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C). Todos os ensaios foram realizados no sistema de PCR em tempo real ABI PRISM 7500™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Todas as amostras foram testadas em duplicatas utilizando RNA/DNA não diluído e diluído (1:10), totalizando quatro reações de RT-PCR por amostra. As amostras foram consideradas positivas quando, pelo menos, uma réplica foi detectada no limiar do ciclo (Ct = 38) ou inferior.

Quadro 1: Iniciadores e sondas utilizadas para detecção quantitativa de norovírus murino tipo 1 (MNV-1), norovírus genogrupos I e II (NoV GI e GII) e adenovírus humano (HAdV) por reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Iniciadores e Sondas	Sequência (5'–3')	Referência
MNV-1		Baert et al. (2008a)
Fw-ORF1/ORF2	CAC GCC ACC GAT CTG TTC TG	
Rv-ORF1/ORF2	GCG CTG CGC CAT CAC TC	
MGB-ORF1/ORF2	6FAM-CGC TTT GGA ACA ATG-MGBNFQ	
		Kageyama et al. (2003)
NoV GI		
COG 1F (+)	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	
COG 1R (-)	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	
Ring 1(a)-TP	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA	
Ring1(b)-TP	FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA	
NoV GII		
COG 2F (+)	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	
COG 2R (-)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	
Ring 2-TP	FAM- TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	
HAdV		Hernroth et al. (2002)
AdF	C(AT)T ACA TGC ACA TC(GT) C(CG)G G	
AdR	C(AG)C GGG C(GA)A A(CT)T GCA CCA G	
AdP1	6FAM-CCG GGC TCA GGT ACT CCG AGG CGT CCT-TAMRA	

3.6 Caracterização genômica

Para caracterização molecular foi realizado sequenciamento nucleotídico parcial do genoma dos vírus detectados utilizando produtos obtidos pela PCR convencional para HAdV e NoV conforme descritos por Allard et al. (2001), Kojima et al. (2002) e Beuret et al. (2002), respectivamente. Os produtos obtidos pela PCR foram purificados com o kit comercial *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para as reações de sequenciamento foi utilizado o kit comercial *Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, CA, EUA) e os mesmos iniciadores específicos usados para as amplificações de PCR. A edição e o alinhamento das sequências foram realizados pelo programa *BioEdit Sequence Editor 7.0 software* (Hall, 1999). As sequências dos nucleotídeos analisadas no sequenciador automático *ABI Prism 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) pela Plataforma de Sequenciamento PDTIS/Fiocruz, foram alinhadas e comparadas com sequências depositadas no GenBank. A análise filogenética das sequências foi realizada pelo programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013).

3.7 Avaliação bacteriológica

Todas as análises bacteriológicas foram realizadas pela equipe do Departamento de Microbiologia, Setor de Alimentos, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

As análises de *Salmonella* spp. foram realizadas com o sistema semi-automatizado VIDAS® (bioMérieux, França) usando o Kit VIDAS® *Salmonella* (SLM). Para *Listeria monocytogenes*, o método de cultura pela técnica de enriquecimento seletivo foi realizado de acordo com metodologia padronizada [Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual online (BAM-FDA)] (Hitchens e Jinneman, 2011). Coliformes termotolerantes foram investigados por contagem de placas, usando um Petrifilm™ Coliform Count Plate (3 M, USA), ou pela técnica de tubos múltiplos de fermentação (Número Mais Provável - NMP) descrito por BAM-FDA (Feng et al., 2002). A contagem de *Staphylococcus coagulase-positiva* foi realizada através da técnica de tubos múltiplos de fermentação (Número Mais Provável - NMP) de acordo com a norma ISO 6888-3:2003.

3.8 Análise dos dados e análise estatística

As recuperações de MNV-1 e NoV GII.4 de todas as matrizes alimentares foram avaliadas qualitativa e quantitativamente de acordo com os métodos de Stals et al. (2011a). Análise qualitativa foi realizada para determinar a “taxa de sucesso de recuperação”, que foi calculada como “o número de reações de qPCR mostrando sucesso de recuperação de NoV GII.4 ou MNV-1” por “número de reações totais de qPCR realizadas”. Análise quantitativa da recuperação viral nas amostras foi considerada como “eficiência da recuperação (%)”, que foi calculada da seguinte forma “a média do número de cópias genômicas virais” por “média do número de cópias genômicas de NoV GII.4 ou MNV-1 inoculadas”.

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism 5.01* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O nível de significância dos testes foi de p valor $< 0,05$. Para cada tipo de matriz alimentar (morangos, tomates e queijos), um tratamento estatístico foi realizado.

Morangos: análise estatística das taxas de recuperação de MNV-1 foi realizada com o uso de testes não paramétricos: Kruskal–Wallis (KW-test) e Mann–Whitney (MW-test), tratadas pelo teste Kolmogorov–Smirnov (KS-test). Para NoV GII.4 foi realizado teste paramétrico pela análise de variância one-way (ANOVA) e o teste não paramétrico Wilcoxon test (t test), seguido por KS-test.

Tomates: para avaliação estatística de MNV-1 e NoV GII.4 foram utilizados os testes não paramétricos Mann–Whitney (MW-test) e Wilcoxon test (t test), tratados por KS-test.

Queijos: a análise das taxas de recuperação de NoV GII.4 foram realizadas utilizando os testes não paramétricos: Kruskal–Wallis (KW-test) e Wilcoxon test (t test), seguido por KS-test. Para MNV-1 foram aplicados o teste paramétrico pela análise de variância one-way (ANOVA) e o não paramétrico Wilcoxon test (t test), tratados por KS-test.

4 RESULTADOS

4.1 Teste do limite de detecção da reação de PCR em tempo real (qPCR)

Os limites de detecção da qPCR para o NoV GII.4 foram de $1,8 \text{ E}+03$ a $1,5 \text{ E}+04$ cg/mL com valor médio do limiar do ciclo (Ct) de 37,59; para o MNV-1, os limites de detecção foram de $4,3 \text{ E}+02$ a $1,8 \text{ E}+03$ cg/ml com valor médio de Ct igual a 36,08. Com a perda de dois logs nas etapas de concentração e recuperação e com limite de detecção de 10^2 cg/mL para MNV-1 e 10^3 cg/mL para NoV GII, a quantidade de inóculo utilizada para os experimentos de contaminação artificial foi de 10^5 cg/mL e 10^6 cg/mL, respectivamente.

4.2 Morangos

4.2.1 Estabelecimento do método de floculação orgânica por leite

A associação de sacos com filtro com tratamento de CTAB resultou na taxa de sucesso de recuperação de 100% para NoV GII.4 utilizando ambos tampões de eluição, glicina Tris-HCl e PBS 1X. Para MNV-1 a taxa de sucesso variou de 83,3% a 87,5% de acordo com o tampão de eluição (Tabela 1). Em relação à análise quantitativa, a eficiência de recuperação de NoV GII.4 foi maior quando se utilizou tampão glicina Tris-HCl do que o tampão PBS, com uso de sacos com filtro e CTAB (Tabela 1). Após aplicação da análise ANOVA e dos testes estatísticos, o uso de tampão glicina Tris-HCl com saco com filtro e tratamento CTAB obteve melhor êxito quando comparado a nenhum tratamento com CTAB ou com a utilização do béquer sem tratamento de CTAB ($p = 0,0313$). A maior eficiência de recuperação do MNV-1 foi quando se utilizou tampão PBS 1X (Tabela 1), sem significância estatística.

4.2.2 Taxa de sucesso de recuperação e a eficiência de recuperação dos métodos 1, 2 e 3

A comparação das taxas de sucesso de recuperação de todos os métodos revelou que o Método 1 obteve 100% de recuperação para NoV GII.4, embora o mesmo não pode ser observado com MNV-1 (83,3%). Com baixa taxa de sucesso

de recuperação, o Método 3 também mostrou diferenças entre NoV GII e MNV-1. Embora o Método 2 não tenha obtido 100% da taxa de sucesso de recuperação, mostrou taxa de recuperação similar para ambos os vírus (Figura 9).

A análise quantitativa, da eficiência de recuperação, mostrou que o método de floculação orgânica, utilizando tampão glicina Tris-HCl com sacos com filtro e tratamento com CTAB, apresentou melhor eficiência de recuperação para MNV-1 e NoV GII.4 quando comparado com os Métodos 2 e 3 (Tabela 2). Portanto, estes resultados mostram que o Método 3 foi ineficiente. A eficiência de recuperação de MNV-1 foi estatisticamente diferente quando comparado o uso do tampão neutro usando sacos com filtro e tratamento com CTAB, com tampão alcalino utilizando béquer e tratamento com CTAB ($p = 0,0450$). MW-Test mostrou que tampão glicina Tris-HCl ou tampão PBS 1X, utilizando sacos com filtro e tratamento com CTAB, apresentaram melhor desempenho do que o Método 3 ($p = 0,0260$ e $p = 0,0022$, respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas entre os Métodos 1 e 2 ($p = 0,2188$). Método 2 mostrou diferença significativa quando comparado com o Método 3 para NoV GII.4 ($p = 0,0313$) e MNV-1 ($p = 0,0022$).

4.2.3 Contaminação natural de vírus e bactérias

Com o uso do método de floculação orgânica por leite, não foi possível detectar NoV em nenhuma das amostras analisadas. MNV-1 (5×10^5 cg/mL) utilizado como controle interno foi detectado em 86 amostras (95,5%). Por outro lado, HAdV foi detectado em 18 (20,0%) das 90 amostras testadas por PCR em tempo real possuindo carga viral de 10^3 - 10^4 cg/mL. Cinco amostras foram caracterizadas por sequenciamento genômico e identificadas como *Mastadenovírus* Humano da espécie F (três amostras) e HAdV-2 (duas amostras). As sequências determinadas neste estudo foram depositadas no GenBank sob os números de acesso KR052917 (2064), KR052918 (2068), KR052919 (2084), KR052920 (2162) e KR052921 (2238) (Figura 10). As amostras positivas para HAdV foram obtidas em estabelecimentos de diferentes localidades.

A análise bacteriana mostrou contaminação por coliformes termotolerantes em três amostras (3,3%) com concentrações que variaram de 10 a 23 células/g. Amostras de morangos não apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*.

Tabela 1: Taxa de sucesso de recuperação (%) e eficiência de recuperação (%) para um total de 24 reações de qPCR para norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) no método de floculação orgânica por leite.

Recipiente	Tratamento	Glicina 0.05M/Tris-HCl 0.1M, pH 9.5				PBS 1X, pH 7.2				
		NoV GII.4		MNV		NoV GII.4		MNV		
		Reações positivas qPCR (% de amostras positivas)				Reações positivas qPCR (% de amostras positivas)				
Taxa de sucesso de recuperação	Sacos com filtro	CTAB *	24 (100.0)		20 (83.3)		24 (100.0)		21 (87.5)	
		Sem CTAB	23 (95.8)		19 (79.2)		23 (95.8)		18 (75.0)	
	Béquer	CTAB	21 (87.5)		15 (62.5)		23 (95.8)		16 (66.6)	
		Sem CTAB	20 (83.3)		10 (42.0)		21 (87.5)		15 (62.5)	
Eficiência de recuperação	Sacos com filtro	CTAB	Média (%)	Variação (%)	Média (%)	Variação (%)	Média (%)	Variação (%)	Média (%)	Variação (%)
			15.93	1.29-41.37	22.83	0.98-35.06	6.83	0.71-12.97	17.02	1.7-30.71
		No CTAB	3.06	0.92-9.14	7.73	1.05-22.92	2.38	0.73-4.78	8.32	2.34-87.53
	Béquer	CTAB	2.68	0.57-5.10	4.35	0.00-20.97	2.64	0.47-6.83	10.94	2.06-25.17
Sem CTAB		2.27	1.06-5.07	5.04	0.67-12.91	1.21	0.47-2.25	14.74	3.85-50.49	

*CTAB= brometo de cetiltrimetilamônio

Tabela 2: Eficiência de recuperação de norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) dos métodos avaliados utilizando tampão glicina Tris-HCl e sacos com filtro.

Métodos	Tratamento	Vírus			
		NoV GII.4		MNV-1	
		Média (%)	Variação (%)	Média (%)	Variação (%)
Método 1 (Floculação)	CTAB*	15.93	1.29-41.37	12.83	0.98-35.06
Método 2 (PEG)	Clorofórmio/ butanol	6.44	3.51-10.96	10.83	3.12-28.20
Método 3 (Filtração)	CTAB	0.50	0.10-1.28	1.08	0.00-2.55

*CTAB= brometo de cetiltrimetilamônio

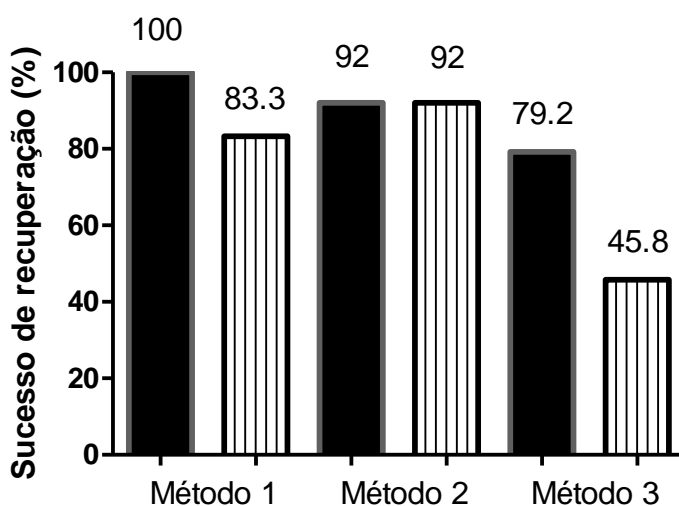


Figura 9: Taxa de sucesso de recuperação (%) de norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) (barras pretas) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) (barras com linhas verticais) de acordo com os métodos utilizando tampão alcalino e sacos com filtro.

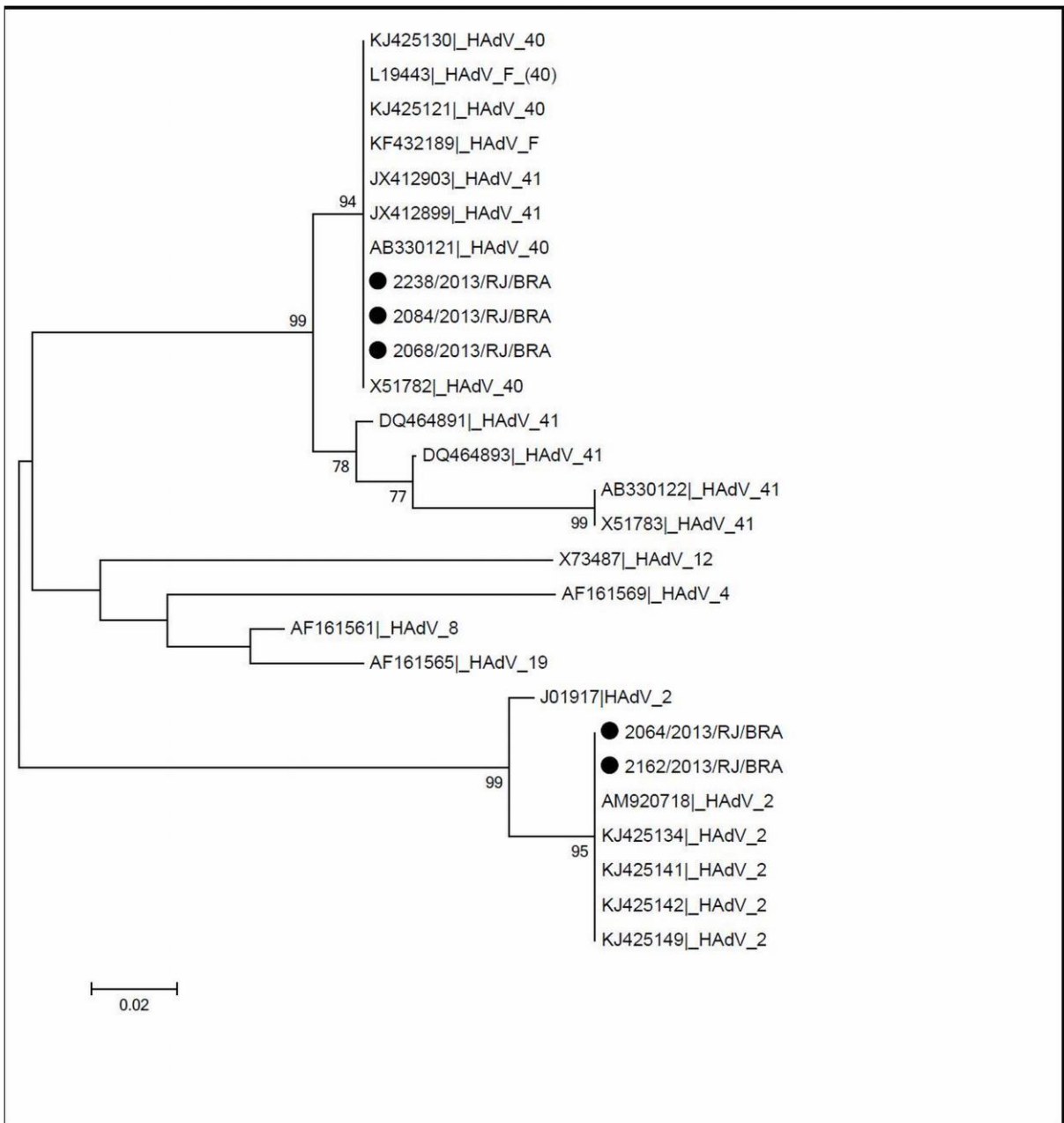


Figura 10: Árvore filogenética baseada no fragmento parcial (171 pb) do hexon gene de adenovírus (HAdV) presente em amostras de morangos obtidas em diferentes cidades do estado do Rio de Janeiro. O número de nódulos internos representa o valor de bootstrap obtido de 1,000 replicatas. As amostras detectadas neste estudo estão marcadas com círculos em preto.

4.3 Tomates

4.3.1 Taxa de sucesso e eficiência de recuperação dos métodos aplicados

A análise comparativa para recuperação de NoV GII.4 demonstrou que o método de floculação orgânica por leite apresentou melhores resultados quando comparado com a precipitação por PEG, considerando-se ambas taxas de sucesso e eficiência de recuperação (*t* teste, $p = 0,0313$) (Tabela 4). Para recuperação de MNV-1 não houve nenhuma significância estatística ($p = 0,4375$) entre os métodos avaliados.

A análise das três variações de tomates demonstrou que independentemente do método utilizado, a eficiência de recuperação para tomates cereja foi menor quando comparado com outros tipos de tomate (Tabela 3). Análise por *t* teste demonstrou que na recuperação de NoV GII.4, o método de floculação orgânica teve diferença significativa em comparação com o método de precipitação por PEG ($p = 0,0313$) em amostras de tomates cereja, independente do tratamento com CTAB.

Ao avaliar tomates uva, o uso do detergente catiônico no método de floculação orgânica foi efetivo na recuperação de NoV GII.4 e MNV-1 em amostras de tomates fatiados, bem como nas amostras de tomates inteiros. Nas amostras de tomates uva inteiros, o uso de CTAB não afetou a melhora da detecção viral (Tabela 3). O uso de CTAB não influenciou os resultados em relação a tomates uva inteiros ou fatiados, mostrando resultados significativos apenas na recuperação de NoV GII.4 em tomates uva fatiados ($p = 0,0313$).

Comparando a eficiência de recuperação de NoV GII.4 nos dois métodos aplicados nos tomates cereja com os outros tipos de tomates, a análise do MW-test mostrou diferença significativa entre o uso ou não de CTAB no método de floculação orgânica para amostras de tomates uva fatiados ($p = 0,0022$) e tomates frescos ($p = 0,0043$). Na recuperação de MNV-1 para todas as amostras de tomates testadas não se observou diferença significativa.

Avaliação da eficiência e da taxa de sucesso de recuperação de HAdV em amostras de tomates frescos e tomates uva no método de floculação orgânica também foi realizada. HAdV mostrou eficiência de recuperação de 60,7% (9,8-92,7%) para tomates frescos e 27,4% (2,8-53,2%) para tomates uva, apresentando 100% de sucesso de recuperação em ambas variações de tomates.

4.3.2 Contaminação natural de vírus e bactérias

HAdV foi detectado em quatro amostras de tomates (4,5%) pelo método de eluição-concentração por floculação orgânica, sendo três tomates uva e um tomate fresco, com concentrações de 10^2 - 10^3 cg/mL. MNV-1 foi detectado em 97,7% das amostras, sendo considerado como controle interno de processo para este tipo de matriz alimentar. Não houve detecção de NoV GI e GII, nem contaminação por *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* (ausência em 25 g) e os níveis de coliformes termotolerantes foram <10 UFC/g nas amostras avaliadas.

Tabela 3: Taxa de sucesso de recuperação (%) e eficiência de recuperação (%) para um total de 24 reações de qPCR para norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) nos dois métodos analisados.

Métodos	Tipos de tomates	Tratamento	NoV GII.4			MNV-1			
			Amostras positivas (sucesso de recuperação %)	Eficiência de recuperação (%)		Amostras positivas (sucesso de recuperação %)	Eficiência de recuperação (%)		
				Média	Variação		Média	Variação	
Floculação orgânica por leite	Tomate	CTAB	24 (100.0)	33.4	7.9-66.3	18 (75.0)	4.1	1.7-9.5	
		Sem CTAB	22 (91.6)	18.1	5.8-31.6	21 (87.5)	4.1	1.6-5.2	
	Tomate cereja	CTAB	20 (83.3)	5.2	0.4-12.9	11 (45.8)	0.6	0.0-1.2	
		Sem CTAB	21 (87.5)	9.8	0.5-27.0	11 (45.8)	1.9	0.0-5.7	
	Tomate uva	CTAB	24 (100.0)	16.9	0.3-52.7	18 (75.0)	2.3	0.05-5.2	
		Sem CTAB	24 (100.0)	29.6	2.5-110.9	19 (79.2)	4.2	0.2-11.1	
	Tomate uva fatiado	CTAB	24 (100.0)	47.7	26.0-68.0	23 (95.8)	4.6	2.1-9.5	
		Sem CTAB	23 (95.8)	29.8	18.4-43.7	22 (91.6)	4.3	1.0-7.1	
	Precipitação por PEG (ISO 15216- 1)	Tomate	Clorofórmio/butanol	21 (87.5)	5.5	0.3-18.5	22 (91.6)	8.5	0.9-30.4
		Tomate cereja		07 (29.2)	0.1	0.01-0.1	18 (75.0)	2.1	0.3-5.8
Tomate uva		18 (75.0)		4.7	0.02-10.3	24 (100.0)	15.0	0.9-56.9	
Tomate uva fatiado		22 (91.6)		8.5	0.5-29.5	24 (100.0)	12.5	0.9-45.2	

4.4 Queijos

4.4.1 Taxa de sucesso e eficiência de recuperação dos métodos aplicados

A análise qualitativa revelou que o Método 2 (extração direta por TRIzol®) teve taxa de sucesso de recuperação de 100% para ambos vírus avaliados e nos dois tipos de queijos (“Minas” e prato). A eficiência de recuperação de NoV GII.4 mostrou resultados de 51,0% e 79,9% e para MNV-1 obteve-se 57,1% e 42,9% para queijo “Minas” e queijo prato respectivamente (Tabela 4).

Os resultados da análise por *t* teste para NoV GII.4 demonstraram que os Métodos 1 e 2 não apresentaram significância estatística nas amostras de queijo “Minas” e queijo prato ($p= 0,2188$). Quando análise de variância one-way (ANOVA) e *t* teste foram aplicados para MNV-1, o Método 2 apresentou melhor desempenho do que o Método 1 para queijo “Minas” ($p= 0,0001$). O Método 2 mostrou diferença significativa quando comparado com o Método 1 para as amostras de queijo prato ($p = 0,0313$) no *t* teste.

4.4.2 Contaminação natural de vírus e bactérias

Um total de 10,0% das amostras foram positivas para vírus entéricos. NoV foram detectados em duas amostras de queijos, uma de queijo “Minas” ($7,3 \times 10^2$ cg/mL) e outra de queijo prato ($1,5 \times 10^3$ cg/mL), e HAdV em sete (7,7%) (10^1 cg/mL). Na análise bacteriológica, 27 (30,0%) amostras estavam contaminadas por coliformes termotolerantes ($1,1 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^5$ UFC/g), 10 (11,1%) por *Staphylococcus coagulase-positiva* (3 a 93 NMP/g) e cinco (5,5%) por *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* spp. não foi detectada nas amostras estudadas. MNV-1 foi detectado em 89 (98,8%) das amostras.

A amostra de queijo “Minas” contaminada por NoV GII, também apresentou presença de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus coagulase-positiva* e *Listeria monocytogenes*. Uma amostra de queijo prato fatiado pelo estabelecimento foi positiva tanto para HAdV quanto para *Staphylococcus coagulase-positiva*. As demais amostras estavam contaminadas com vírus ou com bactérias.

Tabela 4: Análise qualitativa e quantitativa da recuperação de norovírus genogrupo II. 4 (NoV GII.4) e norovírus murino tipo 1 (MNV-1) do total de 24 reações de qPCR em amostras de queijos.

Métodos	Queijos	NoV GII.4			MNV-1			
		Sucesso de Recuperação	Eficiência de recuperação (%)		Sucesso de Recuperação	Eficiência de recuperação (%)		
			Média (%)	Variação (%)		Média (%)	Variação (%)	
Floculação orgânica por leite	TRIZOL®	“Minas”	20 (83.3)	22.0	1.6-82.9	16 (66.7)	2.5	0.1-8.2
		Prato	24 (100.0)	25.1	2.1-77.0	24 (100.0)	5.6	1.0-15.0
Extração direta por TRIZOL®		“Minas”	24 (100.0)	51.0	1.6-147.6	24 (100.0)	57.1	7.5-159.3
		Prato	24 (100.0)	79.9	5.2-313.9	24 (100.0)	42.9	10.8-92.5

5 DISCUSSÃO

Com a finalidade de estabelecer um novo protocolo de baixo custo para a recuperação de vírus a partir de alimentos, o método de floculação orgânica por leite, previamente descrito para recuperação de vírus a partir de água do mar (Calgua et al., 2008) e depois adaptado para outras matrizes aquáticas (Calgua et al., 2013), foi neste estudo adaptado e otimizado para recuperação de vírus em alimentos perecíveis tais como frutas e queijos. O método de floculação orgânica consiste em duas etapas principais, incluindo a eluição com tampão alcalino e precipitação de proteína devido à diminuição do pH, permitindo a adsorção do vírus e sua subsequente ressuspensão em tampão neutro (Calgua et al., 2008). O método não requer equipamento sofisticado e utiliza apenas pequena quantidade dos reagentes principais (menos do que 0,5 g de leite para processar 10 amostras), sendo 13 e 24 vezes mais barato do que os métodos de precipitação por PEG e filtração utilizando membranas carregadas negativamente, respectivamente.

Deste modo, foram realizados experimentos de contaminação artificial para amostras de morangos, tomates e queijos, a fim de avaliar a eficiência e o sucesso de recuperação dos NoV GII.4, MNV-1 e HAdV. NoV GII.4 por serem os principais agentes virais de surtos de gastroenterite de origem alimentar, MNV-1 pela sua utilização como controle interno e HAdV por ser considerado como indicador viral de contaminação fecal humana (Verhoef et al., 2015; Wobus et al., 2006; Hewitt et al., 2013). Nestes experimentos, o método de floculação orgânica foi comparado com as principais metodologias utilizadas para cada matriz, sendo o método de escolha para utilização no monitoramento de campo de amostras de morangos e tomates, onde apresentou melhores taxas de recuperação viral. Adicionalmente, foram realizadas análises para avaliação da qualidade microbiológica dessas matrizes alimentares, obtidas em distintos estabelecimentos comerciais de três municípios do Estado do Rio de Janeiro, incluindo a investigação viral que representou um avanço nos estudos de segurança alimentar.

As discussões dos resultados obtidos neste estudo serão apresentadas de acordo com as matrizes estudadas.

5.1 Morangos (Artigo 1)

A utilização do método de floculação orgânica com tampão alcalino, saco com filtro e CTAB mostrou melhor eficiência de recuperação viral, quando comparado ao uso da enzima pectinase e tratamento com clorofórmio/butanol utilizados no método

de precipitação por PEG. A utilização de sacos com filtro no eluato produziu uma pequena quantidade de material particulado, diferente do eluato obtido no béquer. Além disso, o CTAB removeu partículas menores e substâncias que poderiam estar presentes no material filtrado, eliminando possíveis inibidores. Algumas substâncias liberadas de matrizes alimentares, tais como compostos orgânicos, pigmentos e açúcares, são capazes de inibir a reação de PCR, dificultando a detecção de vírus em alimentos (Demeke e Jenkins, 2010). Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos, com a precipitação por PEG, com amostras de framboesas usando tampões alcalinos, sacos com filtro e tratamento com CTAB (Baert et al, 2008b; Stals et al, 2011a).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a floculação orgânica pode ser uma alternativa ao método de precipitação por PEG, utilizado em vários países para recuperação e detecção de NoV em frutas (Mäde et al, 2013; Stals et al, 2011a; Summa et al., 2012).

O uso de MNV-1 como controle interno de processo foi satisfatório para essa matriz alimentar, corroborando os resultados negativos obtidos na investigação de NoV (Baert et al, 2008a; Wobus et al, 2006). A não detecção de NoV em morangos pode estar relacionada ao limite de detecção do método, associada a uma carga viral baixa, assim como a instabilidade do vírus no meio ambiente (Kramer et al., 2006) ou, simplesmente a ausência de NoV circulante na população. No Brasil, apesar do grande número de casos e a circulação de muitos genótipos de NoV (Fioretti et al., 2011), vários estudos realizados em diferentes matrizes ambientais apresentaram baixa prevalência de tais vírus, quando comparado com outros vírus entéricos (Fumian et al, 2013; Miagostovich et al., 2008; Victoria et al., 2014). Estudos realizados em países desenvolvidos detectaram NoV em frutas coletadas antes e após irrigação (Brassard et al., 2012) e associadas a surtos gastrointestinais (Mäde et al, 2013; Maunula et al, 2009).

Entretanto, o mesmo método detectou HAdV em 20,0% dos morangos coletados. O HAdV têm sido relatado como importante candidato a indicador de contaminação fecal humana. Além de espécie-específico, fatores como alta prevalência, estabilidade no ambiente, associação com quadros de infecção persistente e excreção ao longo do ano em diferentes regiões geográficas contribuíram para esta escolha (Bofill-Mas et al., 2013; Hewitt et al., 2013; Pina et al., 1998).

No Brasil, não existem estudos que relatam a contaminação por NoV em amostras de morango. NoV foram investigados somente em amostras de alface mas sem sucesso de detecção viral (Brandão et al., 2014b). Apesar dos dados limitados, NoV tem sido associado com 42 surtos de origem alimentar (0,4%) de um total de 10509 casos notificados pelo Ministério da Saúde 2000-2014 (Ministério da Saúde, 2015). Frutas e produtos similares foram implicados como veículos de contaminação em 33 (0,3%) dos surtos de origem alimentar. Esta associação é geralmente estabelecida pela análise de amostras clínicas de casos gastroentéricos envolvidos em surtos. As normas brasileiras para controle microbiológico de alimentos não incluem vírus como parâmetros para nenhum tipo de produto alimentício, devido a falta de disponibilidade de métodos em laboratórios de microbiologia para recuperação de NoV em matrizes alimentares (Anvisa, 2001). Diante da necessidade de se obter um método eficaz, esse trabalho tem como finalidade propor o método de floculação orgânica por leite à Anvisa para vigilância e investigação de contaminação de vírus em frutas, com inclusão na legislação brasileira.

De acordo com as normas brasileiras (Anvisa, 2001), todas as amostras apresentaram condições de higiene satisfatória pela análise bacteriológica (máximo de 2×10^3 /g para coliformes termotolerantes). *Salmonella spp.* é o patógeno comumente isolado em surtos de origem alimentar no país, já identificado em 1564 (38,2%) dos casos (Anvisa, 2014), entretanto não foi detectado no grupo de amostras avaliadas. Como pode ser observado, a ausência de um indicador bacteriano não implica na ausência de contaminação viral. A detecção de HAdV nas amostras revelaram contaminação viral na cadeia de produção e fornecimento de morangos cultivados na região montanhosa do Estado do Rio de Janeiro. É importante salientar que toda a produção dessa fruta no Estado é proveniente dessa região, onde é cultivada e distribuída para os diferentes municípios onde foram adquiridos. É notável a dificuldade de se estabelecer a fonte de contaminação destes alimentos, podendo estar relacionadas à má qualidade da água utilizada para irrigação ou até mesmo à inadequada manipulação de alimentos desses produtos durante o transporte ou distribuição nas prateleiras dos mercados. Estes dados alertam para a utilização de água de reúso para a irrigação, assim como o uso de restos e fezes de animais para fertilização, uma vez que estas práticas são responsáveis pela contaminação de produtos naturais e frescos já na cadeia de produção (Maunula et al., 2013). Estes dados globalmente enfatizam a importância

da qualidade microbiológica das águas utilizadas para irrigação. A adaptação do método de floculação orgânica por leite obteve sucesso na recuperação de vírus em morangos, e deve ser considerado um método alternativo a ISO 15216-1, especialmente em países em desenvolvimento que ainda precisam estabelecer metodologias laboratoriais para investigação de contaminação viral em alimentos.

5.2 Tomates (Artigos 2 e 3)

Para as amostras de tomates primeiro investigou-se a presença de HAdV, principalmente devido aos resultados obtidos nos morangos. Do total de 90 amostras coletadas para investigação de contaminação microbiológica, a presença de HAdV foi observada em 4,5% dos tomates avaliados. Nenhuma foi positiva para NoV com o uso do método de floculação orgânica por leite. Comparando-se este método com o método de precipitação por PEG estabelecido e otimizado pela norma ISO 15216-1:2013 foi possível observar melhores resultados da recuperação de NoV GII.4, fortalecendo e corroborando os resultados negativos obtidos. Os resultados também demonstraram que MNV-1, utilizado como SPCV, foi detectado em 97% das amostras.

MNV-1 tem sido utilizado como SPCV em outros estudos com diferentes matrizes alimentares apresentando boa porcentagem de recuperação, variando de 7,78% a 75,65% (Stals et al., 2011b) e 8,4% a 66,4% (de Abreu Corrêa & Miagostovich, 2013), concordando com os resultados obtidos neste trabalho.

Na última década muitos métodos para a eluição e concentração viral foram avaliados para recuperação de vírus em distintas matrizes alimentares (Stals et al., 2012). Em 2013, o método de precipitação por PEG foi padronizado pela ISO 15216-1 descrevendo uso de tampão alcalino adicionado de 3% de extrato de carne e utilizando Mengovírus como SPCV, entretanto a norma permite a utilização de outros vírus que satisfaçam as características descritas como SPCV. O método de floculação orgânica associado a tampão alcalino, saco com filtro e tratamento com CTAB produziu elevadas taxa de recuperação conforme relatado para as amostras de morango. Brandão et al. (2014a) também obteve bons resultados usando tampão glicina (tampão alcalino) quando comparado com tampão PBS 1X para a recuperação de NoV GII em alface. Outro estudo avaliando recuperação viral em amostras de framboesas contaminadas artificialmente com MNV-1 e fago GA comparou um método de extração direta de RNA por isotiocianato de guanidina com o método de precipitação por PEG padronizado pela ISO 15216-1:2013, obtendo melhores resultados de recuperação de ambos vírus, mesmo em menores

concentrações, com a utilização do método por extração direta de RNA, semelhante ao encontrado neste trabalho (Perrin et al., 2015). MNV-1 e Mengovírus foram avaliados quanto ao vírus ideal para ser utilizado como SPCV no método de precipitação por PEG (ISO 15216-1:2013) em amostras de alface, tomates semi-secos e água potável contaminadas artificialmente com NoV GII e HAV e, o melhor resultado obtido foi utilizando MNV-1 (Hennechart-Collette et al., 2015).

Considerando os resultados das três variedades de tomates, foi notável que ambos os métodos apresentaram insatisfatória recuperação de NoV e MNV-1 em tomates cereja. A baixa eficiência de recuperação de vírus nessa variação de tomate foi semelhante aos resultados encontrados por Pan et al. (2012). Provavelmente, a dificuldade de detecção pode estar relacionada com a utilização de pesticidas no cultivo desse alimento, inibindo a adsorção do vírus na superfície destes frutos (Pinho et al., 2011).

Mesmo com um método (precipitação por PEG) padronizado e otimizado internacionalmente, o protocolo de floculação orgânica por leite deve ser considerado como importante método de recuperação de vírus em amostras de frutas, principalmente quando os resultados apresentaram menor sucesso e eficiência de recuperação viral pelo método já estabelecido em 2013.

A ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em tomates está de acordo com os resultados de estudos anteriores realizados no Brasil (Ferreira et al., 2011) e em outros países (Cárdenas et al., 2013). No entanto, HAdV foram detectados em amostras que atendem aos padrões microbiológicos da legislação brasileira (Anvisa, 2001), que defende um máximo de $10^2/g$ de coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g da amostra de alimento. Nas amostras de morangos, HAdVs também foram detectados, o que também não apresentou correlação entre os resultados microbiológicos, de vírus e de bactérias. Os baixos níveis de coliformes termotolerantes encontrados nas três variações de tomates neste estudo podem ser atribuídos à boa prática agrícola realizada pelos produtores ou ao grande uso de pesticidas no cultivo dessas frutas (Anvisa, 2014), não sendo possível determinar a origem da contaminação das amostras avaliadas neste trabalho. Embora o Brasil ofereça melhores condições de fontes de água e instalações sanitárias (97,50% e 81,30%, respectivamente) (FAO, 2015), comparados aos dados do mundo todo (89,40% e 63,70%, respectivamente), nossos resultados sugerem que os indicadores virais também podem ser usados para a segurança alimentar na agricultura. Além disso, pesquisas de vírus entéricos

em tomates realizada por Serraca et al. (2012), demonstrou contaminação por NoV GII em amostras obtidas comercialmente nos mercados italiano e por Chi et al. (2014), demonstraram um caso de hepatite fulminante ocorrido pelo consumo de tomate seco contaminado com hepatite A, revelando o risco de que esta contaminação representa. Desta forma, ressalta-se a necessidade de melhorar programas de segurança alimentar, considerando vírus entéricos como indicadores de contaminação fecal de amostras de alimentos.

5.3 Queijos (Artigo 4)

Com base nos resultados obtidos com amostras de frutas, o método de floculação orgânica por leite foi previamente adaptado com adição de uma etapa de clarificação com clorofórmio/butanol para recuperação de NoV GII e MNV-1 em amostras de queijo “Minas”. Com resultados insatisfatórios de taxa de sucesso de recuperação de NoV GII.4 e MNV-1 variando de 16,7% a 37,5% e eficiência de 0,2% a 1,0%, respectivamente (dados não mostrados), nossos experimentos revelam que essa adaptação do método de floculação orgânica por leite não foi eficaz em conseguir maior taxa de sucesso ou eficiência para este tipo de matriz alimentar. Quando foi realizada outra modificação neste método na etapa final de ressuspensão do péllet com reagente TRIzol[®], melhores resultados de sucesso e eficiência de recuperação foram obtidos tanto em amostras de queijo “Minas” quanto nas amostras de queijo prato. Entretanto, os melhores resultados obtidos foram com a extração direta por reagente TRIzol[®].

Fumian et al. (2009) relataram uma boa recuperação de NoV GII.4 em queijo “Minas” (56,3%) utilizando o método de filtração em membranas carregadas negativamente com solvente Vertrel XF[®] (Fluke, Steinheim, Switzerland) na etapa de clarificação. O uso de clorofórmio/butanol (1:1) como clarificador foi com intuito de auxiliar na eliminação de gorduras e/ou proteínas, substâncias que inibem a detecção de ácido nucléico (Baert et al 2008b.). Quando Stals et al. (2011b) avaliaram métodos de recuperação de NoV em alimentos prontos para consumo utilizando o reagente TRIzol[®], como clarificador, resultados excelentes foram obtidos, semelhantes aos encontrados neste estudo.

A extração direta por TRIzol[®] foi utilizada para a avaliação dos queijos obtidos comercialmente sendo bem sucedida para a recuperação de NoV e HAdV. Reagente TRIzol[®] foi usado anteriormente e capaz de detectar NoV GII em amostras de queijos coletadas de um surto de gastroenterite ocorrido em um navio de cruzeiro no Brasil (Morillo et al., 2012). Além disso, HAdV já foi detectado nas mãos de

manipuladores de alimentos em algumas fazendas (Maunula et al., 2013) sugerindo potencial de contaminação de produtos laticíneos.

Em relação aos resultados bacteriológicos, a ausência de *Salmonella* spp. nas amostras de queijos concordam com resultados de estudos anteriores realizados no Brasil (Carvalho et al., 2007; Lima et al., 2008; Cardoso et al., 2013). A presença de *L. monocytogenes* em cinco (5,5%) amostras é similar ao relatado por Carvalho et al. (2007), que detectou *L. monocytogenes* em 3/93 (3,2%) amostras de queijo “Minas” frescal no Estado de São Paulo, Brasil. Queijo “Minas” Frescal tem um pH baixo (4,9-5,3), alta atividade de água e níveis de umidade (55-58%) que favorecem a sobrevivência de *L. monocytogenes* (Silva et al, 2003). Uma vez que as amostras de queijo analisadas são consideradas como alimentos prontos para consumo, a presença de *L. monocytogenes* representa grande risco, especialmente para mulheres grávidas e imunocomprometidos. Em 2008, foi relatado um caso de infecção por *L. monocytogenes* em um recém-nascido cujo nascimento ocorreu após o 7º mês de gestação; sendo informado pela mãe febre e inércia após o consumo de queijo gorgonzola (Vasconcelos et al., 2008).

Coliformes termotolerantes foram detectados em 20 amostras (66,7%) de queijo “Minas”, duas amostras (6,7%) de queijo prato e sete amostras (23,3%) de queijo prato fatiado pelo estabelecimento, refletindo condições de higiene insatisfatórias e não atendendo as normas estabelecidas pela legislação (Anvisa, 2001). Resultados similares foram relatados em outros estudos no Brasil (Araújo et al, 2002; Carvalho et al, 2007; Cardoso et al, 2013). A pós pasteurização inadequada é comumente avaliada por meio de testes de coliformes termotolerantes, que são destruídos pela pasteurização eficiente. Apesar disso, os nossos resultados sugerem a possibilidade de contaminação fecal do leite pasteurizado usado para produção de queijo por um tratamento térmico ineficiente ou condições insalubres durante a fabricação do queijo (Araújo et al, 2002; Cardoso et al, 2013).

Todas as amostras apresentaram contaminação por *Staphylococcus coagulase-positiva* com valores inferiores aos estabelecidos pela legislação (dados não mostrados) (Anvisa, 2001). Resultados diferentes foram relatados por Araújo et al. (2002) que analisaram 45 amostras de pastas de queijos e detectou-se valores de *Staphylococcus coagulase-positiva* acima de $10^3/g$ em 8 (17,7%) amostras. A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das DTAs mais comuns e resulta da ingestão de enterotoxinas estáveis ao calor produzidas por cepas enterotoxigênicas

de *Staphylococcus* spp. que podem causar náuseas, vômitos e diarreias quando ingeridas (Hennekinne et al, 2010). A intoxicação alimentar causada por cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus*, presentes em queijos “Minas”, foi previamente relatada (Carmo et al., 2002).

Apesar de não ter sido avaliada a fase de produção desses produtos, nossos resultados sugerem que a manipulação foi a causa da contaminação na etapa de produção, no caso de queijos “Minas”, e/ou na preparação da embalagem ou no momento de servir ao consumidor, enfatizando a necessidade de fiscalização das boas práticas de higiene e manipulação de alimentos nos estabelecimentos comerciais, a fim de melhorar a segurança alimentar dos consumidores.

6 PERSPECTIVAS

1. Caracterizar por sequenciamento parcial do genoma os NoV e HAdV detectados no monitoramento de campo, afim de compilar dados comparativos entre cepas de origem alimentar, ambiental e humana.
2. Realizar a propagação de HAdV em cultivos de células com a finalidade de verificar a viabilidade da partícula viral e avaliar o potencial risco de infecção utilizando programas de análise de risco a partir dos resultados obtidos.

7 CONCLUSÕES

1. O método de floculação orgânica por leite foi avaliado nas distintas matrizes alimentares) e se mostrou um método alternativo para recuperação de vírus em frutas (morangos, e tomates).
2. O método utilizando extração direta por TRIzol[®] se mostrou mais eficiente na detecção de NoV e HAdV em queijos, do que o método de floculação orgânica mesmo associado a um tratamento final para redução de gorduras nos queijos.
3. A detecção de HAdV em todas as matrizes avaliadas, inclusive quando não houve detecção de parâmetros bacterianos como nas amostras de tomates, sugere sua utilização como marcador viral de contaminação humana.
4. A não detecção de NoV em amostras de frutas (morangos e tomates) pode estar relacionada com a baixa prevalência desses vírus em amostras ambientais (água de irrigação) e associada ao uso excessivo de defensivos agrícolas durante o cultivo desses produtos.
5. A presença de bactérias em produtos de consumo imediato como os queijos, principalmente de *L. monocytogenes*, é preocupante devido ao alto risco de exposição a infecções gastrointestinais e demais enfermidades.
6. A presença de vírus e bactérias nas matrizes alimentares avaliadas associam os alimentos como veículos importantes na transmissão de DTAs relacionadas com outras possíveis fontes, como água de irrigação, falta de higiene dos manipuladores de alimentos e na produção industrial.
7. Os resultados obtidos demonstram a contaminação viral dos alimentos estudados e sugerem a inclusão na legislação brasileira da pesquisa destes vírus em surtos de gastroenterite aguda com intuito de diminuir os surtos com etiologia desconhecida e demonstrar o impacto destes vírus nas infecções e surtos de origem alimentar.
8. O estabelecimento destas metodologias (floculação orgânica por leite em frutas e extração direta por TRIzol[®] em queijos) nos laboratórios de microbiologia de alimentos tem a finalidade de auxiliar as autoridades brasileiras em ações relacionadas a segurança alimentar no país.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allard, A., Albinsson, B., Wadell G, 2001. Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (2), 498-505.

Anvisa (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília-DF, Brasil, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção1, pag 45.*

Anvisa (2014). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), Relatório Complementar, 2012.* Brasília-DF, Brasil, outubro 2014. In: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>> Acesso em 14 Julho 2015.

Araújo, V. S., Pagliares, V. A., Queiroz, M. L., Freitas-Almeida, A. C., 2002. Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol.* 92(6):1172-7.

Baert, L., Wobus, C. E., Coillie, E. V., Thackray, L. B., Debevere, J., Uyttendaele, M, 2008a. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Applied Environmental Microbiology* 74 (2), 543-546.

Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2008b. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *International Journal of Food Microbiology* 123, p. 101-108.

Bert, F., Scaioli, G., Gualano, M. R., Passi, S., Specchia, M. L., Cadeddu, C., Vighianchino, C., Siliquini, R. Norovirus Outbreaks on Commercial Cruise Ships: A Systematic Review and New Targets for the Public Health Agenda, 2014, *Food and Environmental Virology*, 6, 67–74.

Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A., Lüthi, T. M. Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68, 1925-1931.

Bitler, E. J., Matthews, J.E., Dickey, B.W., Eisenberg, J.N.S., Leon, J. S. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol. Infect.*, 2013, 1-9.

Blaise-Boisseau S., Hennechart-Collette C., Guillier L., Perelle S. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. *Journal of Virological Methods*, 2010, 166: 48–53.

Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., Girones, R. Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin

of the fecal contamination present in environmental samples. *Biomed Research International*, 2013, 2013, 1-11.

Bok, K. & Green, K. Y. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. *N Engl J Med*, 2012, 367:2126–2132.

Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., P. Wertheim-van Dillen M., van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.*, 1990, 28(3), 495-503.

Bouwknegt, M., Verhaelen, K., Rzeżutka, A., Kozyra, I., Maunula, L., Von Bonsdorff, C.-H., Vantarakis, A., Kokkinos, P., Petrovic, T., Lazic, S., Pavlik, I., Vasickova, P., Willems, K. A., Havelaar, A. H., Rutjes, S. A., de Roda Husman, A. M. Quantitative farm-to-fork risk assessment model for norovirus and hepatitis A virus in European leafy green vegetable and berry fruit supply chains. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 198, 50-58.

Boxman, I.L.A., Tilburg, J.J.H.C., Loeke, N.A.J.M., Vennema, H., de Boer, E., Koopmans, M., 2007. An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Food Protection* 70, 504–508

Brandão, M. L. L., Almeida, D. O., Marin, V. A., Miagostovich, M. P., 2014a. Recovery of Norovirus from lettuce (*Lactuca sativa*) using an adsorption-elution method with a negatively charged membrane: comparison of two elution buffers. *Visa em Debate* 2(3), 58-63.

Brandão, M.L.L., Almeida, D.O., Bispo, F.C.P., Bricio, S.M.L., Marin, V.A., Miagostovich, M.P., 2014b. Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready-to-eat lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *J. Food Sci.* 79 (5), M961–M966.

Brassard, J., Gagné, M. J., Génèreux, M. and Côté, C., 2012. Detection of Human Food-Borne and Zoonotic Viruses on Irrigated, Field-Grown Strawberries. *Applied and Environmental Microbiology* 78(10), 3763-3766.

Butot, S., Putallaz, T., Sánchez, G. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *International Journal of Food Microbiology* 2008, 126: 30–35.

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. *Journal of Virological Methods* 153(2), 79-83.

Calgua, B., Fumian, T., Rusiñol, M., Rodríguez-Manzano, J., Mbayed, V. A., Bofill-Mas, S., Miagostovich, M., Girones, R. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Research*, 2013, 47, 2797-2810.

- Cárdenas, C., Molina, K., Heredia, N., García, S. (2013). Evaluation of microbial contamination of tomatoes and peppers at retail markets in Monterrey, Mexico. *Journal of Food Protection*, 76(8), 1475-1479.
- Cardoso, V. M., Dias, R. S., Soares, B. M., Clementino, L. A., Araújo, C. P., Rosa, C. A., 2013. The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese. *Braz J Microbiol.* 44(3): 743–749.
- Carmo, L.S., Dias, R. S., Linardi, V. R., Sena, M. J., Santos, D. A., Faria, M. E., Pena, E. C., Jett, M., Heneine, L. G., 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* 19: 9–14.
- Carvalho, J. D. G., Viotto, W. H., Kuaye, A. Y., 2007. The quality of Minas frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control.* 18(3):262-7.
- Chi, H., Haagsma E. B., Riezebos-Brilman A., van den Berg A. P., Metselaar H. J., Knecht R. J. (2014). Hepatitis A related acute liver failure by consumption of contaminated food, case report. *Journal of Clinical Virology*, 61, 456-458.
- Clarke, I. N., Estes, M. K., Green, K. Y., Hansman, G. S., Knowles, N. J., Koopmans M. K., et al. Caliciviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. pp 977-986. San Diego: Elsevier. 2011.
- Colford Jr., J. M., Wade, T. J., Schiff, K. C., Wright, C. C., Griffith, J. F., Sandhu, S. K., Burns, S., Sobsey, M., Lovelace, G., Weisberg, S. B. Water Quality Indicators and the Risk of Illness at Beaches With Nonpoint Sources of Fecal Contamination. *Epidemiology*, 2007, 18, 27–35.
- Comelli, H. L., Rimstad, E., Larsen, S., Myrmet, M., 2008. Detection of norovirus genotype I.3b and II.4 in bioaccumulated blue mussels using different virus recovery methods. *International Journal of Food Microbiology* 127, 53–59.
- Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Delannoy, S., Fach, P., Perelle, S. A Novel High-Throughput Method for Molecular Detection of Human Pathogenic Viruses Using a Nanofluidic Real-Time PCR System. *PLoS ONE*, 2016, 11(1): e0147832.
- Croci, L., De Medici, D., Scalfarro, C., Fiore, A., Toti, L. The survival of hepatitis A virus in fresh produce. *Int. J. Food Microbiol.*, 2002, 73, 29-34.
- da Silva, A. K., Le Saux, J. C., Parnaudeau, S., Pommepey, M., Elimelech, M., Le Guyader, F. S. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors or genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73: 7891-7897.
- David, S.T., McIntyre, L., MacDougall, L., Kelly, D., Liem, S., Schallie, K., McNabb, A., Houde, A., Mueller, P., Ward, P., Trottier, Y.L., Brassard, J. An outbreak

of norovirus caused by consumption of oysters from geographically dispersed harvest sites, British Columbia, Canada, 2004. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2007, 4, 349–358.

de Abreu Corrêa, A. & Miagostovich, M. P., 2013. Optimization of an Adsorption–Elution Method with a Negatively Charged Membrane to Recover Norovirus from Lettuce. *Food Environ. Virol.* 5(3), 144-149.

Demeke, T. & Jenkins, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010, 396 (6), 1977-90.

DiCaprio, E., Ma, Y., Purgianto, A., Hughes, J., Li, J. Internalization and dissemination of human norovirus and animal caliciviruses in hydroponically grown romaine lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (17), 6143-52.

DiCaprio, E., Culbertson, D., Li, J. Evidence of the internalization of animal caliciviruses via the roots of growing strawberry plants and dissemination to the fruit. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81 (8), 2727-34.

Diez-Valcarce, M., Kokkinos, P., Söderberg, K., Bouwknecht, M., Willems, K., de Roda-Husman, A. M., von Bonsdorff, C.-H., Bellou, M., Hernández, M., Maunula, L., Vantarakis, A., Rodríguez-Lázaro, D. Occurrence of Human Enteric Viruses in Commercial Mussels at Retail Level in Three European Countries. *Food and Environmental Virology*, 2012, 4, 73-80.

Doménech-Sánchez, A., Juan, C., Pérez, J. L., Berrocal, C. I. Unmanageable norovirus outbreak in a single resort located in the Dominican Republic. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011, 17(6), 952-954.

Einöder-Moreno, M., Lange, H., Grepp, M., Osborg, E., Vainio, K., Vold, L. Non-heat-treated frozen raspberries the most likely vehicle of a norovirus outbreak in Oslo, Norway, November 2013. *Epidemiol. Infect.*, 2016, 1-8.

Escudero, B. I., Rawsthorne, H., Gensel, C., Jaykus, L. A. Persistence and transferability of noroviruses on and between common surfaces and foods. *J Food Prot*, 2012, 75, 927-935.

FAO (2015). Acesso em 09 de Julho 2015, Disponível em <http://faostat3.fao.org>

Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A., Burkhardt, W., 2002. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *In: Bacteriological analytical manual online*, Chapter 4. [S.l.]; FDA. [Accessed 2014 July 26]. Available from: [http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm].

Ferreira, M. S., Xavier, M. da P., Tinga, A. C., Rose, T. L., Fumian, T. M., Fialho, A. M., de Assis, R. M., Carvalho-Costa, F. A., de Oliveira, S. A., Leite, J. P., Miagostovich, M. P., 2012. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a

children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *Plos One*, 7(3), e33754.

Ferreira, S. M. R., Freitas, R. J. S., Silva, C. A., Karkle, E. N. L., Maia, C. B. (2011). Microbiological quality of organic and conventional tomatoes. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 70(4), 647-650.

Fioretti, J. M., Ferreira, M. S. R., Victoria, M., Vieira, C. B., Xavier, M. P. T. P., Leite, J. P. G., Miagostovich, M. P., 2011. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106 (8), 942-947.

Freeland, A. L., Vaughan, G. H., Banerjee, S. N. Acute Gastroenteritis on Cruise Ships — United States, 2008–2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2016, 65 (1), 1-5.

Fumian, T. M., Vieira, C. B., Leite, J. P., Miagostovich, M. P. Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.*, 2013,11(1),110-9.

Fumian, T. M., Leite, J. P., Marin, V. A., Miagostovich, M. P., 2009. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *J Virol Methods* 5(1), 39–43.

Gerba, P. C. Food Virology: Past, Present, and Future. In: Goyal, S.M. (Ed.), *Viruses in Food*. Springer Science+Business Media, LLC 2006, New York, pp. 01-04.

Ghebremedhin, B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*, 2014, 4 (1), 26-33.

Girard, M., Mattison, K., Fliss, I., Jean, J. Efficacy of oxidizing disinfectants at inactivating murine norovirus on ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 219: 7–11.

Glass, P. J., White, L. J., Ball, J. M., Leparac-Goffart, I., Hardy, M. E., Estes, M. K. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000; 74(14), 6581-91.

Godoy, P., Alsedà, M., Bartolomé, R., Clavería, D., Módol, I., Bach, P., Mirada, G., Domínguez, À. Norovirus gastroenteritis outbreak transmitted by food and vomit in a high school. *Epidemiol. Infect.*, 2016, 1-8.

Green, K. Y., Chanock, R. M., Kapikian, A. Z. Human caliciviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 949–980.

Greening, G.H. (2006). Human and Animal Viruses in food (Including Taxonomy of Enteric Viruses). *Viruses in Foods*. In: Ed. S. Goyal, Hardcover (Ed.), Chapter 2, pp. 345.

Griffin, J. S., Plummer, J. D., Long, S. C. Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. *Virology Journal*, 2008, 5, 112-117.

Hall, T. A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.

Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., Devleeschauwer, B., on behalf of World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group.. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *Plos Medicine*, 2015, 12(12): e1001923. doi:10.1371/journal.pmed.1001923.

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. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 2012, 57-65.

Hennekinne, J. A., Ostyn, A., Guillier, F.; Herbin, S., Pruger, A. L., Dragacci, S., 2010 How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized?. *Toxinis*. 1(8):2106-16.

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. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4523–4533.

Hewitt, J., Greening, G. E., Leonard, M., Lewis, G. D. Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 167, 177–185.

Hirneisen, K. A. & Kniel, K. E. Inactivation of internalized and surface contaminated enteric viruses in green onions. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166 (2), 201-6.

Hitchins, A. D. & Jinneman, K. (2011). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. *In: Bacteriological analytical manual Online*, Chapter 10. [S.I]; FDA. [Acesso em 26 Julho 2014]. Disponível em: [<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071400.htm>].

Horwitz, M. S. Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology*, 2001, 279, 1-8.

Huang, R., Ye, M., Li, X, Ji, L., Karwe, M., Chen, H. Evaluation of high hydrostatic pressure inactivation of human norovirus on strawberries, blueberries, raspberries and in their purees. *International Journal of Food Microbiology*, 2016, 223, 17–24.

Hundesda, A., Maluquer de Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Girones R. Identification of Human and Animal Adenoviruses and Polyomaviruses for Determination of Sources of Fecal Contamination in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(12), 7886-93.

ICTVdB (2015a). International Committee of Taxonomy of Viruses data Base, Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>. Acesso em 02 de julho de 2015.

ICTVdB (2015b). Disponível em <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em 16 de setembro de 2015.

International Organization for Standardization (ISO). ISO6888-3:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 3: Detection and MPN technique for low numbers.

Jiang, X., Graham, D. Y., Wang, K., Estes, M. K. Norwalk vírus genome cloning and characterization. *Science* 1990; 250, 1580-1583.

Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M. K. Sequence and genomic organization of Norwalk vírus. *Virology*, 1993, 195(1), 51-61.

Jiang, S. C., Chu, W., He, J.-W. Seasonal Detection of Human Viruses and Coliphage in Newport Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (20), 6468–6474.

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, 1548-1557.

Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., & Chanock, R. M. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 1972, 10(5), 1075–1081.

Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., Virgin, H. W. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science*, 299, 1575-1578, 2003.

Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. Development of a vírus concentration method and its application to detection of enterovírus and norwalk vírus from coastal seawater. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68(3), 1033–1039.

Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F. B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., Katayama, K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods*, 2002, 100, 107-114.

Koopmans, M., Von Bonsdorff, C.-H., Vinjé, J., Medici, D., Monroe, S., 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 187-205.

Kotwal, G., & Cannon, J. L. Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Curr Opin Virol*, 2014, 4C, 37-43.

Kramer, A., Schwebke, I., Kampf, G., 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BioMed Central Infectious Diseases* 6 (130).

Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., van Duynhoven Y, et al. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9), 2959-65.

Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science*, 1993, 22; 259(5094), 516-9.

Le Guyader, F.S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K.O., Alsterlund, R., Pommepuy, M., Svensson, L. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 97, 179–186.

Le Guyader, F.S., Le Saux, J.C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46, 4011–4017.

Le Guyader, F.S., Parnaudeau, S., Schaeffer, J., Bosch, A., Loisy, F., Pommepuy, M., Atmar, R.L. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75, 618–624.

Li, X., Chen, H., Kingsley, D.H., 2013. The influence of temperature, pH, and water immersion on the high hydrostatic pressure inactivation of GI. 1 and GII. 4 human noroviruses. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 138–143.

Lima, C. D.C., Cerqueira, M. M. O. P., Ferreira, E. G., Faria Jr, C. L. L., Nelson, D. L., Carmo, L. S., Rosa, C. A., 2008 Microbiological, physical-chemical and sensory evaluation of a traditional Brazilian cheese during the ripening process. *World J Microbiol Biotechnol.* 24, 2389-2395.

Lodder, W. J., Van den Berg, H. H., Rutjes, S. A., de Roda Husman, A. M. Presence of Enteric Viruses in Source Waters for Drinking Water Production in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76 (17), 5965–5971.

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

Lopman, B., Adak, G. K., Reacher, M., Brown, D. W. G. Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, 9, 71-77.

Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R., 2013. Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. *Food and Environmental Virology* 5, 162–168.

Malek, M., Barzilay, E., Kramer, A., Camp, B., Jaykus, L. A., Escudero-Abarca, B., Derrick, G., White, P., Gerba, C., Higgins, C., Vinje, J., Glass, R., Lynch, M., Widdowson, M. A. Outbreak of norovirus infection among river rafters associated with packaged delicatessen meat, Grand Canyon, 2005. *Clin Infect Dis.*, 2009, 48(1), 31-7.

Mathijs, E., Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Scipioni, A., Daube, G., Dierick, K., Herman, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., Thiry, E. A Review of Known and Hypothetical Transmission Routes for Noroviruses. *Food and Environmental Virology*, 2012, 4:131–152.

Mattison, K., Brassard, J., Gagne, M. J., Ward, P., Houde, A., Lessard, L., Simard, C., Shukla, A., Pagotto, F., Jones, T. H., Trottier, Y. L. The feline calicivirus as a sample process control for the detection of food and waterborne RNA viruses. *Int. J. Food. Microbiol*, 2009, 132, 73–77.

Maunula L., Kaupke A., Vasickova P., Söderberg K., Kozyra I., Lazic S., van der Poel W. H. M., Bouwknecht M., Rutjes S., Willems K. A., Moloney R., D'Agostino M., Husman A. M. R. H., von Bonsdorff C.-H., Pavlik A. R. I. P., Petrovic T., Cook N., 2013. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *International Journal of Food Microbiology* 167, 177–185.

Maunula, L., Roivainen, M., Keränen, M., Mäkela, S., Söderberg, K., Summa, M., von Bonsdorff, C. H., Lappalainen, M., Korhonen, T., Kuusi, M., Niskanen, T., 2009. Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Rapid communications, Eurosurveillance* 14(49), 19435.

Mena, K. D. & Gerba C. P. Waterborne Adenovirus. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2009. 198: 133-167.

McQuaig, S. M., Scott, T. M., Lukasik, J. O., Paul, J. H., Harwood, V. J. Quantification of Human Polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan Quantitative PCR and Comparison to Other Water Quality Indicators in Water and Fecal Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (11), 3379–3388.

Miagostovich, M. P., Guimarães, F. R., Vieira, C. B., Fumian, T. M., da Gama, N. P., Victoria, M., de Oliveira, J. M., Mendes, A. C., Gaspar, A. M., Leite, J. P. Assessment of water quality in a border region between the Atlantic forest and an urbanised area in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Environ Virol.*, 2014, 6(2), 110-5.

Ministério da Saúde, 2015. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Série histórica de surtos, doentes e óbitos por DTA. Brasil, 2000-2014.

Morales-Rayas, R., Wolffs, P.F.G., Griffiths, M.W., 2009. Anion-exchange filtration and real-time PCR for the detection of a norovirus surrogate in food. *Journal of Food Protection* 72, 2178–2183.

Morillo, S. G., Luchs, A., Cilli, A., Timenetsky, M. C. S. T., 2012. Rapid Detection of Norovirus in Naturally Contaminated Food: Foodborne Gastroenteritis Outbreak on a Cruise Ship in Brazil, 2010. *Food Environ. Virol.* 4, 124-129.

Nemerow, G. R., Pache, L., Redd, Y. V., Stewart, P. L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology*, 2009, 384(2):380-8.

Pan, L., Zhang, Q., Li, X., Tian, P., 2012. Detection of human norovirus in cherry tomatoes, blueberries and vegetable salad by using a receptor-binding capture and magnetic sequestration (RBCMS) method. *Food Microbiol.* 30, 420-426.

Park, Y., Cho, Y.H., Jee, Y., Ko, G., 2008. Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4226–4230.

Perrin, A., Loutreul, J., Boudaud, N., Bertrand, I., Gantzer, C. Rapid, simple and efficient method for detection of viral genomes on raspberries. *Journal of Virological Methods*, 2015, 224, 95–101.

Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., Girones, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viroses. *Appl Environ Microbiol.* 1998, 64(9), 3376-82.

Pinho, L., Almeida, A. C., Costa, C. A., Paes, M. C. D., Glória, M. B. A., Souza, R. M. 2011. Nutritional properties of cherry tomatoes harvested at different times and grown in an organic cropping. *Hortic. Bras.* 29, 205-211.

Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 1999, 286:287–290.

Predmore, A. & Li, J. Enhanced Removal of a Human Norovirus Surrogate from Fresh Vegetables and Fruits by a Combination of Surfactants and Sanitizers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (14): 4829–4838.

Robinson, C. M., Seto, D., Jones, M. S., Dyer, D. W., Chodosh, J. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(16), 1208-1217.

Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Calgua, B., Carratala, A., Maluquer de Motes, C., Rusiñol, M., Moresco, V., Ramos, A. P., Martínez-Marca, F., Calvo, M., Monte Barardi, C. R., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2013. Adenovirus and Norovirus Contaminants in Commercially Distributed Shellfish. *Food and Environmental Virology* 6(1), 31-41.

Rowe WP, Huebner RJ, Gailmore LK, Parrot RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1953, 84(3):570-3.

Russell, W. C. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, 2000. 81(11), 2573-604.

Russell, W. C. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 1), 1-20.

Rzezutka, A., Alotaibi, M., D'Agostino, M., Cook, N., 2005. A centrifugation-based method for extraction of norovirus from raspberries. *Journal of Food Protection* 68(9), 1923-5.

Saha B, Wong CM., Parks, R. J. The adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion. *Viruses*, 2014, 6(9), 3563-83.

Sarvikivi E., Roivainen M., Maunula L., Niskanen T., Korhonen T., Lappalainen M., Kuusi M. Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. *Epidemiol Infect.*, 140 (2), 260-7, 2012.

Serracca L., Rossini I., Battistini R., Gorla M., Sant S., De Montis G., Ercolini C. (2012). Potential Risk of Norovirus Infection Due to the Consumption of "Ready to Eat" Food. *Food and Environmental Virology*, 4, 89-92.

Sharps, C. P., Kotwal, G., Cannon, J. L. Human norovirus transfer to stainless steel and small fruits during handling. *J Food Prot*, 2012, 75, 437-1446.

Silva, I. M. M., Almeida, R. C. C., Alves, M. A. O., & Almeida, P. F., 2003. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *Int J Food Microbiol.* 81(3), 241–248.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011a. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. *Food Microbiol.* 28, 52-58.

Stals A., Baert L., Keuckelaere A. D., Van Coillie E., Uyttendaele M. Evaluation of a norovirus detection methodology for ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 145, p. 420–425, 2011b.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 1-9.

Stals, A., Uyttendaele, M., Baert, L., Van Coillie, E. Norovirus transfer between foods and food contact materials. *J Food Prot*, 2013, 76, 1202-1209.

Summa, M., von Bonsdorff, C. H., Maunula, L., 2012. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. *Journal of Virological Methods* 183, 154-160.

Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., de Bruin, E., Van der Veer, B., Dorresteyn, B. et al. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45: 1389-1394.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.

Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., Gerba, C. P. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl Environ Microbiol.* 2003, 69, 577–582.

Tong, H. & Lu, Y. Effective detection of human adenovirus in hawaiian waters using enhanced pcr methods. *Virology Journal*, 2011, 8, 57-62.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Drinking water standards and health advisories. Washington-DC: EPA, 2000 (EPA-822-B-00-001).

Vasconcelos, R. M., Almeida, A. E., Hofer, E., Silva, N. M., Marin, V. A., 2008. Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103(8):836-8.

Verhaelen, K., Bouwknecht, M., Lodder-Verschoor, F., Rutjes, S. A., de Roda Husman, A. M. Persistence of human norovirus GII.4 and GI.4, murine norovirus, and human adenovirus on soft berries as compared with PBS at commonly applied storage conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 160, 137–144.

Verhoef, L., Depoortere, E., Boxman, I., Duizer, E., van Duynhoven, Y., Harris, J., Johnsen, C., Kroneman, A., Le Guyader, S., Lim, W., Maunula, L., Meldal, H., Ratcliff, R., Reuter, G., Schreier, E., Siebenga, J., Vainio, K., Varela, C., Vennema, H., Koopmans, M. Emergence of New Norovirus Variants on Spring Cruise Ships and Prediction of Winter Epidemics. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14 (2), 238-243.

Verhoef L., Hewitt J., Barclay L., Ahmed S. M., Lake R., Hall A. J., Lopman B., Kroneman A., Vennema H., Vinjé J., Koopmans M. Norovirus Genotype Profiles Associated with Foodborne Transmission, 1999–2012. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21 (4), 592-599.

Victoria, M., Fumian, T. M., Rocha, M. S., Dalmao, F., Leite, J. P., Girones, R., Miagostovich, M. P. Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. *J Appl Microbiol*. 2014,117(4),1210-8.

Vinje, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of noroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53 (2), 373-381.

Vongpunsawad S, Venkataram Prasad BV, Estes MK. Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. *Journal of Virology*, 2013, 87:4818– 4825.

Xerry, J., Gallimore, C. I., Iturriza-Gómara, M., Gray, J. J. Tracking the transmission routes of genogroup II noroviruses in suspected food-borne or environmental outbreaks of gastroenteritis through sequence analysis of the P2 domain. *Journal of Medical Virology*, 2009, 81(7), 1298–1304.

Wang, X., Yong, W., Shi, L., Qiao, M., He, M., Zhang, H., Guo, B., Xie, G., Zhang, M., Jin, M., Ding, J. An outbreak of multiple norovirus strains on a cruise ship in China, 2014. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 120, 226-233.

Wikswa, M. E., Cortes, J., Hall, A. J., Vaughan, G., Howard, C., Gregoricus, N., Cramer, E. H. *Clinical Infectious Diseases*, 2011, 52(9), 1116–1122.

Wit M. A., Widdowson M. A., Vennema H., De Bruin E., Fernandes T., Koopmans M. Large outbreak of norovirus: The baker who should have known better. *Journal of Infection*, v. 55, p. 188-193, 2007.

Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K. O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G. Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biology*. 2004, 2 (12), 432.

Wobus, C. E., Thackray, L. B., Virgin IV, H. W., 2006. Murine Norovirus: a Model System To Study Norovirus Biology and Pathogenesis. *Journal of Virology*, 80(11), 5104-5112.

World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, Recommendations. – 3rd ed. Geneva, 2008. Disponível em http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/fulltext.pdf , acesso em 27 de abril de 2016.

Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Holler, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kozyra, I., Lopez-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M.S., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk, R., Wyer, M., 2011. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research* 45 (3), 1025–1038.

Ye, M., Li, X., Kingsley, D.H., Jiang, X., Chen, H., 2014. Inactivation of human norovirus in contaminated oysters and clams by high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2248–2253.

Yin, J.L., Shackel, N.A., Zekry, A., McGuinness, P.H., Richards, C., Putten, K.V., McCaughan, G. W., Eris, J. M., Bishop, G. A., 2001. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunology and cell biology*, 79 (3), 213-21.

Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., & Monroe, S. S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–323.

9 APÊNDICES E/OU ANEXOS

9.1 Artigo 1

Vírus recovering from strawberries: Evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination



Virus recovering from strawberries: Evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination



Fabiana Gil Melgaço^{a,*}, Matias Victoria^b, Adriana Abreu Corrêa^c, Ana Carolina Ganime^a, Fábio Correia Malta^d, Marcelo Luiz Lima Brandão^e, Valéria de Melo Medeiros^e, Carla de Oliveira Rosas^e, Sílvia Maria Lopes Bricio^e, Marize Pereira Miagostovich^a

^a Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro—RJ, Brazil

^b Laboratory of Molecular Virology, Regional Norte, CENUR Noroeste, Universidad de la República, Salto, Uruguay

^c Laboratory of Virology, Fluminense Federal University, Niterói, RJ, Brazil

^d Laboratory of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, Rio de Janeiro Federal University, Macaé, RJ, Brazil

^e Food Sector, Laboratory of Food and Sanitation, Department of Microbiology, National Institute of Quality Control in Health, Fiocruz, Rio de Janeiro—RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2015

Received in revised form 18 September 2015

Accepted 4 October 2015

Available online 9 October 2015

Keywords:

Foodborne

Skimmed milk flocculation method

Low cost

Strawberry

Enteric virus

ABSTRACT

Skimmed milk organic flocculation method was adapted, optimized and compared with polyethylene glycol (PEG) precipitation and filtration methods for recovering viruses from a strawberry matrix. Spiking experiments with norovirus genogroup II genotype 4 (NoV GI/4) and murine norovirus 1 (MNV-1) demonstrated that the organic flocculation method associated with a glycine elution buffer, filter bag and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) showed a recovery percentage of 2.5 and 32 times higher than PEG precipitation and filtration methodologies for NoV recovering. Furthermore, this method was used for investigating NoV and human adenoviruses (HAdVs) in 90 samples of fresh strawberries commercialized in Rio de Janeiro markets. NoV GI and GII were not detected in those samples and MNV-1, used as internal process control (IPC), was recovered in 95.5% (86) of them. HAdVs were detected in 18 (20.0%) samples and characterized by nucleotide sequencing as Human Mastadenovirus specie F and as type specie HAdV-2. Bacterial analysis did not detect *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*, however, 3.3% of fecal coliforms were detected in those samples. These results indicate the organic flocculation method as an alternative for recovering enteric viruses from strawberries, emphasizing a need for virus surveillance in food matrices.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Foodborne illnesses cause a large number of hospitalizations worldwide and it is estimated that more than 67% of them are associated with viral infections due to contamination of fresh produce or processed foods by virus-containing fecal material (Atreya, 2004; Painter et al., 2013). Pre-harvest irrigation or failure in hygiene procedures during harvesting is suggested as possible sources of virus contamination (Richards, 2001). Enteric viruses such as noroviruses (NoVs) are related to acute gastroenteritis (AG) outbreaks worldwide by consumption of fresh foods such as vegetables, shellfish and fruits, especially red

fruits, strawberries and raspberries. Other viruses such as human adenoviruses (HAdVs) are also implicated (Maunula et al., 2009; Mide et al., 2013; Rodríguez-Manzano et al., 2013).

NoVs are RNA viruses belonging to genus *Norovirus*, *Caliciviridae* family. They are classified in seven different genogroups (G) and more than 35 genotypes are described (Vinje, 2015; Zheng et al., 2006). NoV GI, GII and GIV are related to infect humans, being NoV GII the most prevalent in foodborne infections (Koopmans et al., 2002).

HAdVs are DNA viruses belonging to the *Adenoviridae* family and genus *Mastadenovirus*, presenting 57 types, being the enteric type species HAdV-40 and HAdV-41 mostly associated with foodborne diseases (Greening, 2006). HAdVs are found at consistently high levels in sewage all year round (Wyn-Jones et al., 2011) and are used as indicator viruses for human fecal contamination in water (Hewitt et al., 2013).

Virus detection in food requires appropriate elution and concentration techniques which need to be adapted for different food matrices as well as for the use of internal process controls (IPC), mainly to monitor the presence of enzymatic reaction inhibitors in those matrices (Stals et al., 2012). In the last few years, many methods and IPCs for

* Corresponding author at: Av. Brasil, 4365, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Pw. Hillside Peggy Ferreira, CEP: 21040-360, Mangueiras, Rio de Janeiro—RJ, Brazil.

E-mail addresses: fabianagil@fiocruz.br (F.G. Melgaço), matiasvictoria@yahoo.com (M. Victoria), adrianaacorreia@id.uff.br (A.A. Corrêa), aganimel@ioc.fiocruz.br (A.C. Ganime), fabio.malta@macae.uff.br (F.C. Malta), marcelolb@gmail.com (M.L.L. Brandão), valeria.medeiros@iocq.fiocruz.br (V. de Melo Medeiros), carla.rosas@iocq.fiocruz.br (C. de Oliveira Rosas), silvia.bricio@iocq.fiocruz.br (S.M.L. Bricio), marizepm@ioc.fiocruz.br (M.P. Miagostovich).

recovering viruses using distinct elution buffers associated to polyethylene glycol precipitation (PEG), ultracentrifugation or positively charged filters for virus concentration have been evaluated (Baert et al., 2008a; Bissard et al., 2012; Comelli et al., 2008; Mäde et al., 2013; Morales-Rayas et al., 2009; Park et al., 2008; Rzesutka et al., 2005; Stals et al., 2011; Wobus et al., 2006).

This study aimed to adapt, optimize and compare a skimmed milk organic flocculation method for virus recovering with other methods described previously such as PEG and filtration using negatively charged membranes. The organic flocculation method was first described for virus detection in seawater (Calgua et al., 2008) and some modifications were made for virus detection in fruits in order to be applied in laboratories of food microbiology. Investigation of NoV G1, G2, HAdV and bacterial analyses were carried out to assess microbiological contamination of fresh strawberries commercialized in Rio de Janeiro, Brazil. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and fecal coliforms, previously associated with strawberries consumption and cultivation were also investigated (Laidler et al., 2013; Szymczak et al., 2014).

2. Material and methods

2.1. Viruses and food samples

A NoV G14 stool sample (GenBank accession number JX975591) was obtained from the Regional Reference Gastroenteritis Laboratory collection, at the Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro—RJ, Brazil. Murine norovirus-1 (MNV-1) kindly provided by Dr. Herbert W. Virgin from Washington University School of Medicine, was propagated in RAW 264.7 cells (a macrophage-like Abelson leukemia virus-transformed cell line derived from BALB/c mice), according to de Abreu Corrêa and Miagostovich (2013). Real time PCR TaqMan system was used to quantify the absolute number of genome copies (gc)/mL (Yin et al., 2001) used for the spiking experiments.

Samples of fresh strawberries (*Fragaria vesca* var.) were obtained from local commercial sources in three different municipalities (Petropolis, Niterói and Rio de Janeiro), all located in the state of Rio de Janeiro, Brazil.

2.2. Quantitative amplification method (qPCR) detection limit

Viral stocks and their 10-fold dilutions (10^0 – 10^6) were used in triplicate to evaluate the detection limit of each virus. The amount of virus inoculated in strawberry samples in spiking experiments was determined according to qPCR detection limit.

In the artificial contamination experiments the possible loss of viral load during steps of concentration and recovery was evaluated. NoV G1 and MNV-1 were seeded on to the food surface by direct application of ten-fold dilutions (10^6 , 10^5 and 10^4 gc/mL) of 250 μ L and 100 μ L, respectively.

2.3. Experimental design of the study

Primarily, a skimmed milk organic flocculation method was adapted and optimized for a food matrix by experimental evaluation using different variables such as elution buffers, containers and final treatment with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). After standardization, this method (1) was compared with other two viral concentration methods as PEG precipitation (method 2), and filtration using negatively charged membranes combined with ultra-filtration (method 3). The final concentrate sample (2 mL) obtained from each method was used for RNA extraction and quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using TaqMan assays. Afterwards, the most efficient recovering method was applied to assess the viral contamination of fresh strawberries commercialized in Rio de Janeiro. NoV G1, NoV G2 and HAdV were investigated in a total of 90 samples randomly obtained during June–September 2013 (six samples/week) from distinct markets.

For these experiments, MNV-1 was used as IPC. Additionally, the presence of *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and fecal coliform was also investigated.

2.4. Spiking experiments

2.4.1. Method 1

In order to optimize the flocculation method (Calgua et al., 2008), artificial contamination experiments were performed. Briefly, fresh strawberry samples (25 g) were spiked by direct application of 250 μ L of NoV G14 and 100 μ L of MNV-1 onto food surfaces for 2 h at room temperature. For each variable: a) containers (beaker and filter bag), b) elution buffers (PBS and Glycine 0.05 M/Tris–HCl 0.1 M) and, c) final treatment (CTAB), the samples were assayed in triplicate, using one sample as negative control (seeded with 350 μ L of PBS 1 \times) and processed at the same time as the others (Fig. 1). When a beaker was used as a container, the elution step was performed for 1 h, using 400 mL of each buffer (PBS and glycine 0.05 M/Tris–HCl 0.1 M). For the filter bag (Nasco®, Fort Atkinson, Wisconsin, USA), the elution was performed for 30 min, using 225 mL of a buffer.

Before the flocculation step, the eluates were transferred to sterile beakers; the pH was adjusted to 3.5 using HCl 6 N and then skimmed milk at a final concentration of 1% was added. The organic flocculation process was performed for 3 h with constant stirring. After this step, the flocculated samples were centrifuged (8000 \times g for 30 min) and the pellet was re-suspended in 1 mL of a phosphate buffer (pH 7.5; Na_2HPO_4 0.2 M/ NaH_2PO_4 0.2 M; 1:2 v/v). Before the RNA extraction step, the final concentrated samples were incubated (or not) at 56 °C with a final concentration of 1.2% CTAB and 0.45 M NaCl for 30 min (Baert et al., 2008b).

2.4.2. Methods 2 and 3

Spiking experiment procedures for both viruses were also performed in triplicate for assessing a virus recovery rate using the PEG precipitation method (Stals et al., 2011), and filtration using negatively charged membranes combined with ultra-filtration, first described by Fumian et al. (2009) and adapted by de Abreu Corrêa and Miagostovich (2013). Fig. 1 presents an outline of the methods used for the experiments.

2.5. Virus detection and molecular characterization

Viral RNA/DNA was extracted from 140 μ L of the concentrated samples, using the QIAamp viral RNA mini kit® (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Synthesis of complementary DNA (cDNA) was performed using random primers (Invitrogen®, USA) for RNA virus detection.

MNV-1, NoV (G1 and G2) and HAdV qPCR using a TaqMan® system (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), were performed using a set of specific primers and probes as presented in Table 1. For all genomic quantification a standard curve was performed with eight points of serial plasmid dilutions (10^1 – 10^8 genomic copies (gc)/reaction) that yields a slope of -3.59 and a reaction efficiency of 0.90.

qPCR reactions consisted of 5 μ L of cDNA/DNA sample, 12.5 μ L universal master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), corresponding primers and hydrolysis probe. The following conditions were used for the amplification step: activation of the uracil N-glycosylase for 2 min at 50 °C, and activation of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for 10 min at 95 °C followed by 45 cycles of amplification (15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C). An ABI PRISM 7500™ real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used in all assays. All samples were tested in duplicate using both undiluted and 1:10 diluted RNA/DNA, totalizing four qPCR reactions per sample. Samples were considered positive when at least one replica was detected at the cycle threshold (Ct) 38 or lower.

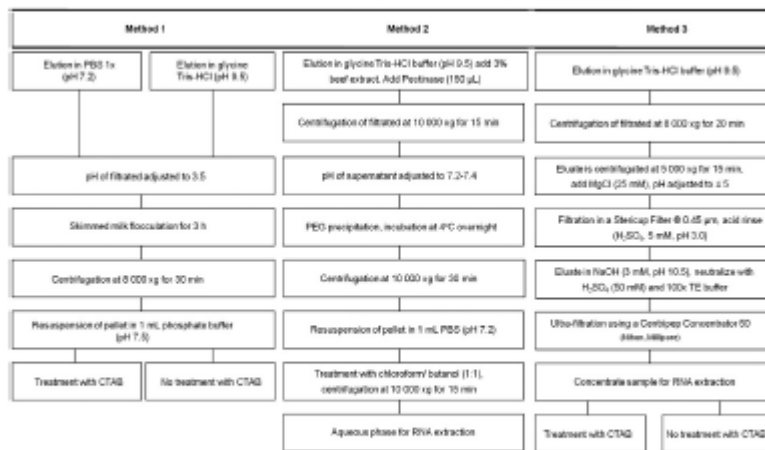


Fig. 1. Overview of viral elution concentration methods used for recovering viruses from strawberries.

For HAIV molecular characterization, nucleotide sequencing was performed using amplicon obtained from conventional nested PCR using primers as described by Allard et al. (2001). The amplicons were purified with a QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's recommendations and later quantified with a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific®, USA) or by a 1% agarose gel electrophoresis using the Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) as a molecular marker. The set of primers used to obtain the PCR amplicon was used individually for gene sequencing. DNA sequencing was performed by the dideoxynucleotide chain termination method, using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1, v. 3.1 and the ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (both from Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) from the Genomic DNA sequencing Platform of PDUS/Horruz.

Table 1

Primers and probe sets used to detect murine norovirus (MNV-1), human norovirus (NoV GI and GII) and human adenovirus (HAIV) by qPCR.

Primers and Probe	Sequence (5'–3')	Reference
MNV-1		Baron et al. (2008a)
Fw-ORF1/ORF2	CAC GGC ACC GAT CTC TTC TC	
Rv-ORF1/ORF2	GGC CTC CCE CAT CAC TC	
MCB-ORF1/ORF2	GFAM-CCG TTT CGA ACA ATC-MGBNFQ	
NoV GI		Kageyama et al. (2003)
CDG 1F (+)	CCYGGAGCGGNTTYCATGA	
CDG 1R (-)	CTTAGCGCCATCATCATYAC	
Ring 1(a)-TP	FAM-AGATYCGCATCYC CTGTCCA-TAMBA	
Ring 1(b)-TP	FAM-AGATCGCCGTCCTCTCTCA-TAMBA	
NoV GII		
CDG 2F (+)	CAR GARB CN ATG TTY AGR TGE ATG AG	
CDG 2R (-)	TGC ACC CCA TCT TCA TTC ACA	
Ring 2-TP	FAM- TGG CAG GCG GAT CCG AAT CT-TAMBA	
HAIV		Herrnlich et al. (2002)
AdF	C(AT)T ACA TGC ACA TCGT) CC(C)G G	
AdR	C(AC)C GGG C(GA)A A(CT)T GCA CCA G	
AdP1	GFAM-CCG GCGTCA GGT ACT CCG AAG CCT CCT-TAMBA	

Phylogenetic analysis, sequence editing and multiple alignments were performed with the BioEdit Sequence Editor 7.0 software (Hall, 1998). Phylogenetic trees were assembled by the neighbor joining method (Saitou and Nei, 1987) based on the Tamura-3-parameter model (Tamura, 1992) using the MEGA v. 6.0 software package (Tamura et al., 2013). Confidence values of the internal nodes were calculated by bootstrap analyses using 1000 replicates (Felsenstein, 1985).

2.6. Bacterial analysis

Salmonella spp. analyses were performed using the semi-automated VIDAS® system (bioMérieux, France) kit using VIDAS® *Salmonella* (SIM). For *L. monocytogenes*, the culture method by selective enrichment technique was carried out according to the standardized methodology (Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual online (BAM-FDA) (Hitchins and Jinneman, 2011). Fecal coliform was investigated by plate count, using a Petrifilm™ Coliform CountPlate (3M, USA), or by the multiple-tube fermentation technique (Most Probable Number–MPN) described by BAM-FDA (Rehg et al., 2002).

2.7. Data analysis

Recovery of MNV-1 and NoV GI/4 from strawberry samples was qualitatively and quantitatively analyzed according to the methods of Stak et al. (2011). Qualitative analysis of viral recovery from samples was performed to determine the "recovery success rate", which was calculated as "the number of qPCR reactions showing successful NoV GI/4 or MNV-1 recovery" per "number of qPCR reactions performed." Quantitative recovery analyses from samples yielded "recovery efficiency" (%), which was calculated per individual sample as "the mean recovered number of viral genomic copies" per "mean inoculated number of NoV GI/4 or MNV-1 genomic copies."

Moreover, statistical analyses of MNV-1 recovery rates were performed using the nonparametric tests: Kruskal–Wallis (KW-test) and Mann–Whitney (MW-test), followed by a Kolmogorov–Smirnov (KS-test) test. For NoV GI/4 parametric test one-way analysis of variance (ANOVA) and nonparametric Wilcoxon test (*t* test) were applied,

followed by a RS-test. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Significance levels were set at 0.05.

3. Results

3.1. Detection limit of qPCR

The qPCR detection limits for the NoV GI.4 were of $1.8E + 03$ to $1.5E + 04$ gc/ml with an average cycle threshold value (Ct) of 37.59; for the MNV-1, qPCR detection limits were of $4.3E + 02$ to $1.8E + 03$ gc/ml with an average value of 36.08 Ct.

With the loss of two logs at the concentration and recovering stages and with a detection limit of 10^5 gc/ml for MNV-1 and 10^3 gc/ml for NoV GI.4, the optimal amount of inoculum used for the artificial contamination experiments was 10^6 cg/ml and 10^6 cg/ml, respectively.

3.2. Establishment of a skimmed milk flocculation method

The association of filter bags and treatment of CTAB resulted in a 100% NoV recovery success rate using both glycine Tris-HCl and PBS elution buffers. For MNV-1 the rate ranged from 83.3% to 87.5% according to the elution buffer (Table 2). Concerning quantitative analysis, NoV GI.4 recovery efficiency was higher when using a glycine Tris-HCl buffer rather than a PBS buffer, using filter bags and CTAB (Table 2). When the ANOVA and *t* test analysis were applied, the use of a glycine Tris-HCl buffer in a filter bag with CTAB treatment was selected as the best performance method when compared to no CTAB treatment and to the use of a beaker without CTAB treatment ($p = 0.0313$). The MNV-1 recovery efficiency improved when a PBS buffer was used (Table 2).

3.3. Recovery success and recovery efficiency of the methods 1, 2 and 3

The comparison of the recovery success rates of all methods revealed that method 1 yielded 100% of NoV recovery, although the same could not be observed with MNV-1 (83.3%). With a smaller recovery success rate, method 3 also showed differences between NoV GI.4 and MNV-1. Although method 2 did not achieve 100% of recovery success rate, it showed an identical recovery rate for both viruses (Fig. 2).

Quantitative analysis of recovery efficiencies showed that the organic flocculation method for the samples processed using a glycine Tris-HCl buffer presented the best recovery for MNV-1 and NoV GI.4, when compared with method 2 and method 3 (Table 3) using a filter bag with CTAB treatment. Therefore, these results showed that method 3 was highly inefficient. MNV-1 recovery efficiency was statistically different when compared with a neutral buffer using a filter bag and CTAB treatment, or with an alkaline buffer using a beaker combined with CTAB treatment ($p = 0.0450$). MW-test showed that the glycine Tris-HCl buffer or PBS buffer using a filter bag and CTAB treatment presented a better performance than method 3 ($p = 0.0260$ and $p = 0.0022$,

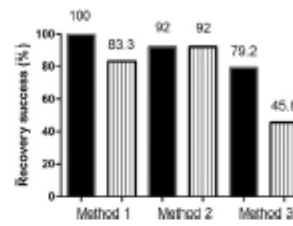


Fig. 2. Recovery success (%) for NoV GI.4 (black bars) and MNV-1 (vertical line bars) in three methods using glycine Tris-HCl buffer and filter bag.

respectively). No statistical differences were observed between method 1 and method 2. Method 2 showed a significant difference when compared to method 3 for NoV GI.4 ($p = 0.0313$) and MNV-1 ($p = 0.0022$).

3.4. Natural occurrence of virus and bacteria in fresh strawberry samples

By using skimmed milk flocculation NoV was not detected in any sample analyzed. On the other hand, HAuV was detected in 18 out of 90 (20.0%) samples tested by qPCR with a viral load of 10^2 – 10^6 gc/ml. Five samples were characterized as Human Mastadenovirus specie F (three samples) and HAuV-2 (two samples) by nucleotide sequencing. The sequences determined in this study were deposited in GenBank under the accession numbers KR052917 (2064), KR052918 (2068), KR052919 (2084), KR052920 (2162) and KR052921 (2238). HAuV positive samples were obtained from different locations. The MNV-1 (5×10^3 gc/ml) used as IPC was spiked onto food surfaces for 30 min at room temperature and was detected in 86 samples (95.5%).

Bacterial analyses showed fecal coliform contamination in three samples (3.3%) with concentrations ranging from 10 to 23 cells/g. No samples of fresh strawberries showed contamination by *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*.

4. Discussion

In order to provide a new protocol for recovering NoV from strawberries, the skimmed milk flocculation method was adapted, optimized and compared to other virus concentration methods as previously described and finally used for analysis of samples obtained in local markets of three municipalities from the Great Metropolitan Region of Rio de Janeiro State.

Skimmed milk flocculation consists in two main steps including elution with an alkaline buffer and protein precipitation caused by the decrease of pH, permitting virus adsorption and subsequent resuspension in a neutral buffer (Caigua et al., 2008). The method does not require sophisticated equipment and only a small amount of the main reagents

Table 2
Recovery success rate and recovery efficiency of NoV GI.4 and MNV-1 of method 1 and its variations.

Container	Treatment	Glycine 0.05 M/Tris-HCl 0.1 M, pH 9.5		PBS 1x, pH 7.2					
		NoV GI.4	MNV-1	NoV GI.4	MNV-1				
		Positive qPCR reaction (% of positive samples)		Positive qPCR reaction (% of positive samples)					
Filter bag	CTAB	24/24 (100.0)	20/24 (83.3)	24/24 (100.0)	21/24 (87.5)				
	No CTAB	23/24 (95.8)	19/24 (79.2)	23/24 (95.8)	18/24 (75.0)				
Beaker	CTAB	21/24 (87.5)	15/24 (62.5)	23/24 (95.8)	16/24 (66.6)				
	No CTAB	20/24 (83.3)	10/24 (42.0)	21/24 (87.5)	15/24 (62.5)				
		Mean (X)	Range (X)	Mean (X)	Range (X)				
Filter bag	CTAB	15.93	1.29–41.37	1.83	0.98–35.06	6.03	0.71–12.97	17.02	1.7–30.71
	No CTAB	3.06	0.92–9.14	7.73	1.05–22.92	2.38	0.73–4.78	18.32	2.34–8.753
Beaker	CTAB	2.68	0.57–5.10	4.35	0.00–20.97	2.64	0.47–6.83	10.94	2.06–25.17
	No CTAB	2.27	1.06–5.07	5.04	0.67–12.91	1.21	0.47–2.25	14.74	3.85–50.49

Table 3
Recovery efficiency of NoV GI4 and MNV-1 of the different methods evaluated using glycerol Tris-HCl as an elution buffer and filter bag as a container.

Methods	Treatment	NoV GI4		MNV-1	
		Mean (X)	Range (X)	Mean (X)	Range (X)
Method 1	CTAB	15.93	1.29–41.37	1.83	0.58–35.08
Method 2	Chloroform/butanol	6.44	3.51–10.96	1.03	3.12–28.2
Method 3	CTAB	0.50	0.10–1.28	1.08	0.00–2.55

(less than 0.5 g of skimmed milk to process 10 samples) resulting in a low cost technique, being 13 and 24 times cheaper than PEG precipitation and filtration methods using negatively charged membranes, respectively.

The use of skimmed milk flocculation method with an alkaline buffer, a filter bag and CTAB variables revealed better virus recovery efficiency when compared to enzyme pectinase and treatment with chloroform/butanol used in the PEG method. The use of the filter results in an eluate with a lower amount of particulate material, different from the eluate obtained in the beaker. Furthermore, CTAB removes smaller particles and substances that may still be present in the filtered material eliminating possible inhibitors. Substances released from food matrices such as organic compounds, pigments and sugars, which inhibit PCR reaction, are known to cause difficulties in detecting NoV in foods (Demele and Jenkins, 2010). Similar results were obtained in previous studies with raspberries using alkaline buffers, filter bags and CTAB treatment (Baert et al., 2008b; Stals et al., 2011).

The results obtained here demonstrated that skimmed milk flocculation could be an alternative to the PEG precipitation method, used in several countries for recovering and detecting NoV in soft fruits (Máde et al., 2013; Stals et al., 2011; Summa et al., 2012). The use of MNV-1 as IPC was satisfactory to control all concentration procedures and viral detection, avoiding false negative results as pointed previously (Baert et al., 2008a; Wobus et al., 2006). The failure to detect NoV in strawberries could be related to the method detection limit, associated with a low viral load as well as to virus instability in the environment (Kramer et al., 2006) or to the absence of NoV shedding by the specific population. In Brazil, despite the large number of cases and the circulation of many genotypes (Fioretti et al., 2011), several studies performed in different environmental matrices showed low prevalence of such viruses when compared with other enteric viruses (Pumian et al., 2013; Magostovich et al., 2008; Victoria et al., 2014). Studies carried out in developed countries could detect NoV in berries obtained before and after irrigation (Brassard et al., 2012) frequently associated with gastroenteric outbreaks (Máde et al., 2013; Maunula et al., 2009).

Despite the failure to detect NoV in field samples, the method reported in this study was able to detect HAdV in 20.0% of strawberry samples contaminated naturally. Several viruses have been found in the environment and many studies indicate the use of DNA viruses, human adenovirus (HAdV), as possible indicators of human fecal contamination. Factors such as high prevalence, stability in the environment, the association frames of persistent infection and excretion throughout the year in different geographic regions have contributed for this choice (Bofill-Mas et al., 2013; Hewitt et al., 2013; Pina et al., 1998).

In Brazil there are no studies reporting NoV contamination in strawberry samples. NoV has been investigated only in lettuce samples with no virus detected (Brandão et al., 2014). Despite the lack of studies investigating viral food contamination in Brazil, NoV has been associated with 38 foodborne outbreaks (0.5%) from a total of 5719 cases reported by the Ministry of Health from 2000 to 2014 (Anvisa, 2014). Fruits and similar products were implicated as contamination vehicles in 33 (0.3%) of foodborne outbreaks. This association is usually established by the analysis of clinical samples from gastroenteric cases involved in outbreaks. Since Brazilian Standards for microbiological control of foods do not include viruses as parameters for any kind of food products,

there is no available method in microbiology laboratories used for recovering NoV from food matrices (Anvisa, 2001).

According to Brazilian Standards (Anvisa, 2001) all samples presented satisfactory hygiene condition by bacteriological analysis (maximum of 2×10^5 /g for fecal coliforms). *Salmonella* spp. is the most common pathogen isolated in those foodborne outbreaks in Brazil, and was identified in 1564 (38.2%) of cases (Anvisa, 2014), although not detected in the evaluated samples. As observed, the absence of a bacterial indicator does not implicate the lack of viral contamination. HAdV detection in strawberry samples demonstrated that the fruit supply chain could be performed under inadequate hygienic conditions such as demonstrated by a research group in Europe when 27 HAdV-positive samples were detected in berries (Maunula et al., 2013).

The overall results of this study revealed viral contamination in the production chain of strawberries cultivated in the mountainous region of Rio de Janeiro State. It is important to note that the whole strawberry production in the state of Rio de Janeiro comes from this region, where it is cultivated and distributed to the different municipalities where they are purchased. Then, possible sources of contamination could be related to the poor quality of water used for irrigation or even to the inadequate food handling of those products during transportation or at the markets.

Currently, water quality is a concern, especially due to policies of sustainable development. Since the reuse of water for irrigation as well the use of animal waste for fertilizing could contaminate the food supply chain, mainly fresh produce (Maunula et al., 2013). It is important to stress the need to monitor the microbiological quality of food, including a viral indicator of fecal contamination such as HAdV.

Concluding the adaptation of the skimmed milk flocculation method was successfully used for recovering virus from berries, and should be considered as an alternative method, especially in developing countries that still need to establish laboratory methodologies for investigating viral food contamination. Furthermore, it could be adapted and evaluated for different food matrices.

Acknowledgments

This study was funded by MCT/CNPq/ANVISA (grant number 403264/2012-0). We would like to thank Claudia P. Kamel for the English review. Thanks and regards to the Oswaldo Cruz Foundation for offering laboratory facilities and technical support. This research study is under the scope of the activities of Fiocruz as a Collaborating Center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

References

- Allard, A., Albimont, B., Widell, G., 2001. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* 39 (2), 498–505.
- Anvisa, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde e Resolução RDC n.º 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos e para águas e o Regulamento Técnico de Padões Executivos. Brasília-DF, Brasil, p. 45 (n.º 7-E, 10 jan. 2001, Seção 1).
- Anvisa, 2014. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasil. Unidade Técnica de Doenças de Vigilância Microbiana e Alimentar – UDMA, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis – CGDT, Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2014 (Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar.tjsp?vinculo=jornal_cdm_ano=1530, Accessed 2014 September 1).
- Araya, C.D., 2004. Major foodborne illness-causing viruses and current status of vaccines against the diseases. *Foodborne Pathog. Dis.* 1 (2), 89–95.
- Baert, L., Wobus, C.E., Collie, P.V., Thudary, L.B., Deboever, J., Uyttendaele, M., 2008a. Detection of marine norovirus 1 by using plaque assay, transcription assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2), 542–546.
- Baert, L., Uyttendaele, M., Deboever, J., 2008b. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of ready-to-eat foods with conventional and real-time RT-PCR for norovirus GI4 detection. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 101–108.
- Bofill-Mas, S., Braña, M., Remírez-Cost, X., Carratalá, A., Hernández, A., Gómez, R., 2013. Quantification of human and animal viruses to determine the origin of the fecal contaminants present in environmental samples. *BioMed Res. Int.* (2013), Article ID 182089.

Brandis, M.L., Almeida, D.O., Ripa, F.C.P., Brito, S.M.L., Marin, V.A., Magagnoli, M.P., 2014. Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready-to-eat lettuce (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *J. Food Sci.* 79 (5), M961–M966.

Brandis, J., Gajek, M.J., Gilchrist, M., Chik, C., 2012. Detection of human food-borne and zoonotic viruses on imported, field-grown strawberries. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (10), 3763–3769.

Calgua, B., Mergerevin, A., Gonzalez, A., Boffi-Max, S., Clemente-Guzon, P., Handoua, A., Wijn-Jones, A.P., Lopez-Pila, J.M., Gimeno, R., 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J. Virol. Methods* 153 (2), 79–83.

Carroll, M.L., Bernal, E., Larson, S., Myrland, M., 2011. Detection of norovirus genotype GI by RT-PCR in bioaccumulated blue mussels using different virus recovery methods. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 53–59.

de Abreu Correia, A., Magagnoli, M.P., 2013. Optimization of an adsorption–elution method with a negatively charged membrane to recover norovirus from lettuce. *Food Environ. Virol.* 5 (3), 144–149.

Demeola, T., Jenkins, G.R., 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (6), 1977–1990.

Dobson, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

Dong, P., Wikgren, S.D., Grant, M.A., Burdick, W., 2002. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *Bacteriology & Analytical Manual Online* (Chapter 4 [51]). IDA. [Accessed 2014 July 26]. Available from: <http://www.ida.gov/food/laboratorymethods/LaboratoryMethods/across04948.htm>.

Flavel, J.M., Ferreira, M.S., Victoria, M., Vieira, C.B., Xavier, M.P., Leite, J.P., Magagnoli, M.P., 2011. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106 (8), 942–947.

Flavel, J.M., Leite, J.P., Marin, V.A., Magagnoli, M.P., 2009. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *J. Virol. Methods* 151 (1), 39–43.

Iranian, T.M., Vieira, C.B., Leite, J.P., Magagnoli, M.P., 2013. Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Water Health* 11 (1), 110–119.

Greening, G.H., 2006. Human and Animal Viruses in Food (Including Taxonomy of Enteric Viruses). In: Gayle, S., Henckes, (Eds.), *Viruses in Foods*, p. 345 (Chapter 2).

HAI, T.A., 1999. *Bitfield: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT*. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.

Hemrich, B.E., Gordon-Hansson, A.C., Rehnström-Holm, A.S., Gimeno, R., Allard, A.K., 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scan dravian report. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4523–4531.

Hewitt, J., Greening, G.H., Levin, M., Lewis, G.D., 2013. Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 177–185.

Hitchin, A.D., Jureman, K., 2011. Detection and Enumeration of Enteric Monocytogenes in Foods. *Bacteriological Analytical Manual Online*, Chapter 10 [51]. FDA. [Accessed 2014 July 26]. Available from: <http://www.ida.gov/food/laboratorymethods/across071400.htm>.

Kajiyama, T., Kojima, S., Shirokura, M., Uchida, K., Fukuchi, S., Hoshino, F.B., Taketa, N., Nakayama, K., 2003. Broadly sensitive and highly sensitive assay for Norwalk-like virus based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548–1557.

Koopmans, M., Von Bonsdorff, C.-H., Vinjé, J., De Melker, D., Morris, S., 2002. Foodborne viruses. *JEM5 Microbiol. Rev.* 23, 167–205.

Kramer, A., Schwebke, I., Kempf, G., 2006. How long do successful pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BioMed Cent Infect. Dis.* 6, 130.

Laidler, M.R., Townsend, M., Bauer, G.L., Hovviller, T., Repp, K.K., Leman, R., Sarsalpour, M., Koenig, W.Z., 2013. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer. *Clin. Infect. Dis.* 57 (8), 1129–1134.

Müller, D., Toth, K., Neubert, E., Hiller, M., Jahn, R., 2013. Detection and typing of norovirus from frozen strawberries involved in a large-scale gastroenteritis outbreak in Germany. *Food Environ. Virol.* 5, 162–168.

Maurula, L., Rovainen, M., Keränen, M., Mäkelä, S., Söderberg, K., Sarrama, M., von Bonsdorff, C.H., Lappalainen, M., Korhonen, T., Kuusi, M., Hakanen, T., 2009. Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Rapport Commun. Eur. Soc. Virol.* 14 (46), 19435.

Maurula, L., Kumpul, A., Vuolteenaho, P., Söderberg, K., Korhonen, T., Laitinen, S., von der Pöhl, W.H.M., Bouwknegt, M., Rutjé, S., Williams, K.A., Molenberg, R., D’Agostino, M., Hamman, A.M.R.H., von Bonsdorff, C.-H., Paakk, A.R.U.P., Pietroniro, T., Cook, N., 2013. Tracking enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 177–185.

Magagnoli, M.P., Bernal, E.F., Gutierrez, F.R., Fariñas, T.M., Díaz-Méndez, L., Luz, S., Silva, E.A., Leite, J.P., 2008. Molecular detection and characterization of gastroenteritis virus occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2), 375–382.

Miranda-Raya, R., Wolf, P.F.G., Griffiths, M.W., 2009. Anion-exchange filtration and real-time PCR for the detection of a non-viral surrogate in food. *J. Food Prot.* 72, 2176–2183.

Painter, J.A., Howlata, R.M., Ayres, T., Tazoo, R.V., Braden, C.R., Angulo, T.J., Griffin, P.M., 2013. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 19 (3), 407–415.

Rek, Y., Cho, Y.H., Joo, Y., Ko, C., 2008. Immuno-magnetic separation combined with real-time reverse transcription-PCR assays for detection of norovirus in contaminated food. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4256–4260.

Ryu, S., Paik, M., Luoma, E., Joo, J., Gimeno, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (9), 3376–3382.

Richards, G.P., 2001. Enteric virus contamination of foods through industrial practices: a primer on intervention strategies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27 (2), 117–123.

Rodriguez-Manzano, J., Hernandez, A., Galpin, B., Carralosa, A., Malvarde de Motos, C., Rueda, M., Moreno, V., Ramos, A.P., Martínez-Mateo, E., Calvo, M., Monte Barazán, C.R., Gimeno, R., Boffi-Max, S., 2013. Adenovirus and norovirus contaminants in commercially distributed shellfish. *Food Environ. Virol.* 6 (1), 31–41.

Rozalska, A., Alkhatib, M., D’Agostino, M., Cook, N., 2009. A sensitive qPCR-based method for detection of norovirus from raspberries. *J. Food Prot.* 82 (9), 1923–1925.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 14 (4), 406–425.

Sab, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011. Evaluation of a norovirus detection methodology for real-time PCR. *Food Microbiol.* 28, 52–61.

Sab, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 1–6.

Sarrama, M., von Bonsdorff, C.H., Maurula, L., 2012. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. *J. Virol. Methods* 183, 154–160.

Szymczak, B., Szymczak, M., Sawicki, W., Dabrowski, W., 2014. Anthropogenic impact on the presence of L. monocytogenes in soil, fruits, and vegetables. *Polish Microbiol.* 59, 23–28.

Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the case of strong transition-transversion and G + C content biases. *Mol. Biol. Evol.* 14, 678–687.

Tomasa, K., Stecher, G., Petros, D., Flügge, A., Krumm, S., 2013. MEAG: molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.

Victoria, M., Iranian, T.M., Rocha, M.S., Dalmas, E., Leite, J.P., Gimeno, R., Magagnoli, M.P., 2014. Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 117 (4), 1210–1218.

Vinje, J., 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 53 (2), 373–381.

Webster, C.E., Thackray, L.B., Virgin IV, H.W., 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J. Virol.* 80 (11), 5104–5112.

Wijn-Jones, A.P., Cambazis, A., Cook, N., D’Agostino, M., Divita, M., Flischer, J., Gonzalez, C., Gawler, A., Gimeno, R., Holzer, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kumpul, I., Lopez-Pila, J., Mouton, M., Nunez-Garcia, M.S., Papageorgiou, C., Rajow, S., Sellwood, J., Sawayk, R., Wijn, M., 2011. Surveillance of adenovirus and norovirus in European recreational waters. *Water Res.* 45 (3), 1025–1038.

Yin, J.L., Shukla, N.A., Zekoy, A., McCutcheon, P.H., Richards, C., Patten, K.V., McCaughan, G.W., Erb, J.M., Baber, G.A., 2001. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression in vivo using specific probes or SYBR green I. *Immuno. Cell Biol.* 79 (2), 213–221.

Zhang, D.P., Ando, T., Fan, X., Wang, R.L., Beard, R.S., Gao, R.J., Monroe, S.S., 2006. Norovirus detection and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–321.

9.2 Artigo 2

Assessment of microbiological contamination of tomatoes using a skimmed milk organic flocculation for adenovirus recovery, Rio de Janeiro State, Brazil

Submissions Being Processed for Author Fabiana Gil Melgaço, MSc

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	FAEV-D-16-00021	ASSESSMENT OF MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF TOMATOES USING A SKIMMED MILK ORGANIC FLOCCULATION FOR ADENOVIRUS RECOVERY, RIO DE JANEIRO STATE, BRAZIL.	Apr 07, 2016	Apr 11, 2016	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

ASSESSMENT OF MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION OF TOMATOES USING A
SKIMMED MILK ORGANIC FLOCCULATION FOR ADENOVÍRUS RECOVERY, RIO DE JANEIRO
STATE, BRAZIL

Fabiana Gil Melgaço^a, Adriana Abreu Corrêa^b, Ana Carolina Ganime^a, Marcelo Luiz Lima Brandão^c,
Valéria de Mello Medeiros^c, Carla de Oliveira Rosas^c, Silvia Maria Lopes Bricio^c and Marize Pereira
Miagostovich^a

^aLaboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de
Janeiro-RJ, Brazil; ^bLaboratory of Virology, Fluminense Federal University, Niterói-RJ, Brazil; ^cFood Sector,
Laboratory of Food and Sanitizing, Department of Microbiology, National Institute of Quality Control in
Health, Fiocruz, Rio de Janeiro- RJ, Brazil.

E-mail address: fabianagilmelgaco@gmail.com; adrianacorrea@id.uff.br; acganime@ioc.fiocruz.br;
marcelollb8@gmail.com; valeria.medeiros@incqs.fiocruz.br; carla.rosas@incqs.fiocruz.br;
silvia.bricio@incqs.fiocruz.br; marizepm@ioc.fiocruz.br

Corresponding author: telephone number: +55 021 2562-1923

E-mail address: fabianagilmelgaco@gmail.com

Postal address: Av. Brasil, 4365, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Pavilhão Hélio & Peggy Pereira,
CEP:21040-360, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

Abstract

The microbiological quality of different types of wild tomatoes was assessed and human adenovirus was detected in 4.5% (4) of 90 samples, which met bacterial parameters such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and fecal coliform. This finding emphasizes the use of viruses as indicators that can improve food safety.

Keywords: foodborne, tomato, organic flocculation, adenovirus

Human adenoviruses (HAdVs) are DNA viruses belonging to the *Adenoviridae* family and genus *Mastadenovirus*; there are 57 types, with the enteric type species HAdV-40 and HAdV-41 being mostly associated with foodborne diseases (Greening, 2006). HAdVs have been found at consistently high levels in sewage year round and have been used as indicator viruses for human fecal contamination in water (Wyn-Jones et al., 2011; Hewitt et al., 2013). This study aimed to evaluate the microbiological quality of tomatoes obtained from a commercial market of the great metropolitan Region of Rio de Janeiro. *Tomato is one of the most consumed* foodstuffs in the world and Brazil has great importance in vegetable crop cultivation, with higher tomato production in the Central-West region followed by the Southeast region (IBGE, 2012; FAO, 2015).

Ninety tomatoes samples [45 fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and 45 cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme*) and/or hybrids (grape tomatoes)] randomly obtained during March-September, 2014 (three-five samples/week) from distinct markets were investigated for HAdV presence and *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and fecal coliform levels.

For sample process control virus (SPCV), 100 µL of MNV-1 (5x10⁵ gc/mL) was spiked onto food surfaces for 2 hours at room temperature. The SPCV inoculum amount (based on qPCR detection limit) as well

as the skimmed milk flocculation used followed the procedures described previously for strawberry samples (Melgaço et al., 2016). A triplicate experiment by spiking 200 µL of HAdVs (1×10^6 gc/mL) was also conducted as a positive control to determine the efficiency of skimmed milked flocculation method for HAdV recovery from tomatoes.

Viral RNA/DNA was extracted from 140 µL of the concentrated samples, using the QIAamp viral RNA mini kit® (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. For HAdV and MNV-1 investigation, a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using the TaqMan® system (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was carried out using a set of specific primers and probes, as previously described (Hernroth et al., 2002 ; Baert et al., 2008).

Salmonella spp. analysis was performed by using a semi-automated VIDAS® system (BioMérieux, France) kit using VIDAS® *Salmonella* (SLM). For *Listeria monocytogenes*, the culture method by selective enrichment technique was carried out according to the standard methodology (Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual online (BAM- FDA) (Hitchins & Jinneman, 2011). Fecal coliform was investigated by a plate count, using a Petrifilm™ Coliform Count Plate (3M, USA).

HAdV was detected in four tomato samples (4.5%) with concentrations ranging from 10^2 to 10^3 gc/mL. MNV-1 was detected in 97.7% of samples, being considered an efficient SPCV for the organic flocculation method. HAdV showed a 60.7% (9.8-92.7%) rate of recovery for fresh tomatoes and 27.4% (2.8-53.2%) for cherry/grape tomatoes. No samples of tomatoes showed contamination by *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* (absence in 25 g) and fecal coliform levels were <10 CFU/g. The absence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in tomatoes concurs with results of previous studies carried out in Brazil (Ferreira et al., 2011) and in others countries (Cárdenas et al., 2013). However, HAdV were detected in samples showed that meet the Brazilian Standards (Anvisa, 2001) that advocates a maximum of 10^2 /g for fecal coliforms and absence of *Salmonella* spp./25 g. In a previous study performed with strawberries, HAdVs were detected in samples, which also presented no correlation between virological and bacteriological results (Melgaço et al., 2016). The low levels of fecal coliforms found in this study can be attributed to the good agriculture practice applied by the producers or the large use of pesticides in the cultivation of these fruits (Anvisa, 2014). Pesticides inhibit the adhesion of particles in foods; it is not possible in this study to determine the exact source of the contamination of the samples evaluated. Although Brazil offers better conditions of water sources and sanitation facilities (97.50% and 81.30%, respectively) (FAO, 2015) when compared to world data (89.40% and 63.70%, respectively), our data suggested that viral indicators could also be used for food safety in agriculture. In addition, the enteric virus research on tomatoes previously performed by Serraca et al. (2012), which demonstrated NoV GII contamination in tomatoes commercially obtained on the Italian markets, and by Chi et al. (2014), which demonstrated a case of fulminant hepatitis by dried tomato consumption contaminated with hepatitis A, reveals the risk that this contamination represents and suggests the need to improve food safety programs considering enteric viruses as indicators of fecal contamination of food samples.

Acknowledgements

This study was funded by MCTI/CNPq/ANVISA (grant number 403264/2012-0). This research study is under the scope of the activities of Fiocruz as a Collaborating Center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

References

Allard, A., Albinsson, B., Wadell G. (2001). Rapid Typing of Human Adenoviruses by a General PCR Combined with Restriction Endonuclease Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (2), 498-505.

Baert, L., Wobus, C. E., Coillie, E. V., Thackray, L. B., Debevere, J., Uyttendaele, M. (2008). Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Applied Environmental Microbiology*, 74 (2), 543-546.

Anvisa (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília-DF, Brasil, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção1, pag 45.

Anvisa (2014). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. *Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), Relatório Complementar, 2012*. Brasília-DF, Brasil, outubro 2014. In: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>> Accessed 2015 July 14.

Cárdenas, C., Molina, K., Heredia, N., García, S. (2013). Evaluation of microbial contamination of tomatoes and peppers at retail markets in Monterrey, Mexico. *Journal of Food Protection*, 76(8), 1475-1479.

Chi, H., Haagsma E. B., Riezebos-Brilman A., van den Berg A. P., Metselaar H. J., Knegt R. J. (2014). Hepatitis A related acute liver failure by consumption of contaminated food, case report. *Journal of Clinical Virology*, 61, 456-458.

FAO (2015). [Accessed 2015 July 09]. Available from: <http://faostat3.fao.org>

Ferreira, S. M. R., Freitas, R. J. S., Silva, C. A., Karkle, E. N. L., Maia, C. B. (2011). Microbiological quality of organic and conventional tomatoes. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 70(4), 647-650.

Greening, G.H. (2006). Human and Animal Viruses in food (Including Taxonomy of Enteric Viruses). *Viruses in Foods*. In: Ed. S. Goyal, Hardcover (Ed.), Chapter 2, pp. 345.

Hewitt, J., Greening, G. E., Leonard, M., Lewis, G. D. (2013). Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 177–185.

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. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4523–4533.

Hitchins, A. D. & Jinneman, K. (2011). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: Bacteriological analytical manual Online, Chapter 10. [S.I]; FDA. [Accessed 2014 July 26]. Available from: [<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071400.htm>].

IBGE (2012). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*, ISSN 0103-443X, Rio de Janeiro v.25 n.02, p.1-88.

Melgaço, F. G., Victoria, M., Corrêa, A. A., Ganime, A. C., Malta, F. C., Brandão, M. L. L., Medeiros V. M., Rosas, C. O., Bricio, S. M. L., Miagostovich, M. P. (2016). Vírus recovering from strawberries: Evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 14–19.

Serracca L., Rossini I., Battistini R., Gorla M., Sant S., De Montis G., Ercolini C. (2012). Potential Risk of Norovirus Infection Due to the Consumption of “Ready to Eat” Food. *Food and Environmental Virology*, 4, 89-92.

Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Holler, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kozyra, I., Lopez-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M.S., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk, R., Wyer, M. (2011). Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research*, 45 (3), 1025–1038.

9.3 Artigo 3

Evaluation of a skimmed milk flocculation method for norovirus recovery from tomato samples.



My Author Tasks

[Start New Submission](#)

Click [here](#) to view your submissions with a final decision

My Submissions with Journal (1)

EVALUATION OF A SKIMMED MILK FLOCCULATION METHOD FOR NOROVIRUS RECOVERY FROM TOMATO SAMPLES

Current status: With Editor (16/Apr/2016)

VIRMET_2016_203

Associate Editor: Maja Ravnikar

Article Type: Research Paper

Revision: Original | Version: V0

Initial submission : 12/Apr/2016

EVALUATION OF A SKIMMED MILK FLOCCULATION METHOD FOR NOROVÍRUS RECOVERY FROM TOMATO SAMPLES

Fabiana Gil Melgaço^a, Adriana Abreu Corrêa^b, Marcelo Luiz Lima Brandão^c, Valéria de Mello Medeiros^c, Carla de Oliveira Rosas^c, Silvia Maria dos Reis Lopes^c and Marize Pereira Miagostovich^a

Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil; ^b*Laboratory of Virology, Fluminense Federal University, Niterói-RJ, Brazil;* ^c*Food Sector, Laboratory of Food and Sanitizing, Department of Microbiology, National Institute of Quality Control in Health, Fiocruz, Rio de Janeiro- RJ, Brazil.*

E-mail address: fabianagilmelgaco@gmail.com; adriana.correa@id.uff.br; marcelollb8@gmail.com; valeria.medeiros@incqs.fiocruz.br; carla.rosas@incqs.fiocruz.br; silvia.bricio@incqs.fiocruz.br; marizepm@ioc.fiocruz.br

Corresponding author: telephone number: +55 021 2562-1923

E-mail address: fabianagilmelgaco@gmail.com

Postal address: Av. Brasil, 4365, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Pavilhão Hélio & Peggy Pereira, CEP: 21040-360, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

Abstract

The aim of this study is to assess norovirus (NoV) contamination on tomatoes and compare the skimmed milk flocculation method used for virus recovery with the polyethylene glycol (PEG) precipitation method described by the International Organization for Standardization (ISO/TS 15216-1:2013). NoV was investigated in 90 concentrated samples of three different types of fresh tomatoes as *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme* (cherry) and hybrid cocktail type (grape tomato) using skimmed milk method but not detected. Spiking experiments with NoV GII.4 and murine norovirus 1 (MNV-1) were evaluated by using the same varieties of tomatoes samples and both methods. For NoV GII.4 the organic flocculation method presented great efficiency and recovery success rate. However, for the MNV-1, the best results were achieved with the PEG method. According to the types of tomatoes, the analysis of the recovery success rates and efficiency showed lower efficiency for the cherry tomatoes, regardless of the method or virus analyzed. The results obtained suggest that the skimmed milk flocculation method associated to a treatment of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) could be an alternative method for recovering

NoV from tomato samples representing a new tool for investigating fruits as a vehicle for viral transmission in acute gastroenteritis outbreaks.

Keywords: foodborne, norovirus, skimmed milk flocculation method, ISO/TS 15216-1:2013, tomato.

1. Introduction

Foodborne illnesses lead a large number of hospitalizations worldwide and it is estimated that more than 67% of them are associated with viral infections due to the contamination of fresh produces or processed foods (Atreya, 2004; Painter et al., 2013).

Enteric viruses such as noroviruses (NoV) are the main cause for acute gastroenteritis (AG) outbreaks associated with consumption of fresh foods such as vegetables, shellfish and fruits worldwide (Ethelberg et al., 2010; Loury et al., 2014; Maunula et al., 2009; Mäde et al., 2013; Rodriguez-Manzano et al., 2013). During 2009-2012, 14.5% of NoV outbreaks reported worldwide were attributed to food as transmission route (Verhoef et al., 2015).

NoV are RNA viruses belonging to genus *Norovirus*, *Caliciviridae* family and classified in seven different genogroups (G) and more than 35 genotypes (Vinjé, 2015; Zheng et al., 2006). NoV GI, GII and GIV are related to infect humans, being NoV GII.4 the most prevalent in foodborne infections (Verhoef et al., 2015).

In Brazil, several studies showed the role of NoV in outbreaks and in sporadic cases of AG (Amaral et al., 2015; de Andrade et al., 2014; Ferreira et al., 2010; 2012a; 2012b; Fioretti et al., 2011). Nevertheless, there is only one confirmed NoV foodborne case (NoV was detected in blue cheese and white sauce samples in a cruise ship) in a context where 10,509 foodborne outbreaks were reported (2000-2014) and 58.2% did not present the etiologic agent identified (Morillo et al., 2012; SINAN, 2015).

The difficulty for obtaining viruses from food sample is well known and in the last years, several elution and concentration methodologies have been adapted to different food matrices as well as the use of sample process control virus (SPCV) to assess inhibitors of enzymatic reaction in those matrices (Stals et al., 2012).

In this context, this study aims to investigate NoV in tomatoes by using samples previously concentrated by skimmed milk flocculation method as previously described (Melgaço et al., submitted). Furthermore, this methodology was compared with polyethylene glycol (PEG) precipitation method standardized and validated by the International Organization for Standardization. In 2013 (ISO)/TS 15216-1 establishes protocols for recovering and detecting NoV from four classes of foods, including water for consumption, vegetables and fruits, surfaces and bivalve mollusks.

2. Material and methods

2.1 Viruses and food samples

A NoV GII.4 stool sample (GenBank accession number JX975591) was obtained from the Regional Reference Gastroenteritis Laboratory collection, at the Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro—RJ, Brazil. Murine norovirus-1 (MNV-1) kindly provided by Dr. Herbert W. Virgin from Washington University School of Medicine, was propagated in RAW 264.7 cells (a macrophage-like Abelson leukemia virus transformed cell line derived from BALB/c mice), according to de Abreu Corrêa and Miagostovich (2013). Real time PCR TaqMan system was used to quantify the absolute number of genome copies (GC)/mL (Yin et al., 2001) used for the spiking experiments.

Ninety concentrated samples of three varieties of tomatoes, [45 fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and 45 cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* var *cerasiforme*) and/or hybrid type (grape tomatoes)] previously obtained from local commercial sources in Rio de Janeiro and analyzed for microbiological contamination (Melgaço et al., submitted) were used for NoV GI and GII investigation. Samples of those three varieties of tomatoes were also used for comparative analysis of the methodologies cited.

2.2. Comparison of viral concentration methodologies

The two methods were compared by performing triplicate spiking experiments. The inoculum amount was determined according to a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) detection limit of each virus as previously determined (Melgaço et al., 2016).

For artificial contamination, all tomatoes variations (25 g) were spiked by direct application of 250 µL of NoV GII.4 (1×10^6 genomic copy(GC)/mL) and 100 µL of MNV-1 (5×10^5 GC/mL) onto food surfaces for 2 hours at room temperature. The grape tomato was also evaluated sliced. For each method, it was used one sample as negative control (seeded with 350 µL of PBS 1X) and processed at the same time as the others. The final concentrate sample (2 mL) obtained from each method was used for RNA extraction and quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using TaqMan® assays.

2.3 Viral concentration methods

Skimmed milk flocculation method was performed as described by Melgaço et al. (2016), including the use of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The precipitation by the PEG method was carried out according to the ISO 15216-1/2013 standard. The steps of these two methodologies were shown in Figure 1.

2.4 RNA extraction and viral detection

Viral RNA was extracted from 140 μ L of the concentrated samples, using QIAamp viral RNA mini kit® (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Synthesis of complementary DNA (cDNA) was performed using random primers (Invitrogen®, USA) for RNA virus detection.

For NoV and MNV-1 investigation a qPCR using TaqMan® system (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was carried out using a set of specific primers and probes previously described (Baert et al. 2008; Kageyama et al., 2003). For all genomic quantification, a standard curve was performed with eight points of serial plasmid dilutions (10^7 – 10^0 GC/reaction) that yields a slope of -3.59 and a reaction efficiency of 0.90.

qPCR reactions consisted of 5 μ L of cDNA sample, 12.5 μ L universal master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the corresponding primers and hydrolysis probe. The following conditions were used for the amplification step: activation of the uracil N-glycosylase for 2 min at 50 °C, and activation of AmpliTaq Gold (Applied biosystems, Foster City, CA, USA) for 10 min at 95 °C and 45 cycles of amplification (15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C). An ABI PRISM 7500™ real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used in all assays. All samples were tested in duplicate using both undiluted and 1:10 diluted RNA, totalizing four qPCR reactions per sample. The samples were considered positive when at least one replica was detected at the cycle threshold (Ct) 38 or lower.

2.5 Data Analysis

Recovery of MNV-1 and NoV GII.4 from tomatoes samples was qualitative and quantitatively analyzed according to the methods of Stals et al. (2011). Qualitative analysis of the viral recovery from samples was performed to determine the “recovery success rate”, calculated as “the number of qPCR reactions showing successful NoV GII.4 or MNV-1 recovery” per “number of qPCR reactions performed.” Quantitative recovery analyses from samples yielded “recovery efficiency” (%), calculated per individual sample as “the mean recovered number of viral genomic copies” per “mean inoculated number of NoV GII.4 or MNV-1 genomic copies”.

Moreover, statistical analysis of MNV-1 and NoV GII.4 recovery rates was performed using the nonparametric tests: Mann–Whitney (MW-test) and Wilcoxon test (*t* test), followed by a Kolmogorov–Smirnov (KS-test) test. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Significance levels were set at 0.05.

3. Results

The analysis using qPCR showed NoV negative results for the 90 tomatoes samples tested. On the other hand, the comparative analysis for NoV GII.4 recovering demonstrated that the skimmed flocculation method showed better results when compared with PEG, considering both success rates and efficiency recovery (t test; $p = 0.0313$) (Table 1). For MNV-1 recovering there is no statistical significance ($p = 0.4375$) between each method tested.

The analysis regarding tomatoes varieties reveals that, independent of the method used, the recovery efficiency for cherry tomatoes presented low rates when compared to other types of tomatoes (Table 1). Analysis by t test showed that the NoV GII.4 recovery in the organic flocculation method showed significant difference from the precipitation method for PEG ($p = 0.0313$) in samples of cherry tomatoes, independent of the CTAB use.

When evaluating grape tomatoes, the use of the cationic detergent in the organic flocculation method was effective in recovering NoV GII.4 and MNV-1 in samples of sliced tomatoes, as well as in the whole tomatoes. In the whole grape tomato samples, the use of CTAB did not affect the improvement of viral detection (Table 1). The use of CTAB seems to have not influenced the results, showing significant results only for NoV GII.4 recovery in sliced grape tomatoes ($p = 0.0313$).

Comparing the NoV GII.4 recovery efficiency in the two methods applied in cherry tomatoes with the other types of tomatoes, the MW test analysis showed a significant difference between whether or not the detergent in organic flocculation method for samples of sliced grape tomatoes ($p = 0.0022$) and fresh tomatoes ($p = 0.0043$). There was no significant difference observed in the MNV-1 recovery for all tomatoes samples.

4. Discussion

The failure to detect NoV in 90 samples previously concentrated by the skimmed milk method lead to the second analysis performed in this study, when this virus concentration method was compared to the PEG method described in ISO 15216-1; 2013. Previous results from those samples demonstrated that MNV-1, used as a SPCV, were detected in 97% of the samples and human adenovirus contamination were observed in 4.5% of them (4) (Melgaço et al., submitted). The fact that the organic flocculation method showed better results for recovering NoV GII.4 than PEG strengthens and corroborated the negative results obtained. NoV have been investigated in lettuce and strawberries from markets of Rio de Janeiro with no viruses detection (Brandão et al., 2014b; Melgaço et al., 2016)

Additionally, although the MNV-1 show better recovery efficiency in the PEG method (ISO 15216-1), they showed no significant statistical differences as to its use as SPCV in tomatoes analyzed by the organic flocculation method. MNV-1 has been used as SPCV in

other studies evaluating different matrices showing a good recovery percentage ranging from 7.78% to 75.65% (Stals et al., 2011) and 8.4% to 66.4 % (de Abreu Corrêa & Miagostovich, 2013).

In the last decade, many methods such as the PEG precipitation, ultracentrifugation or charged filters for virus concentration have been evaluated for recovering viruses from matrix food associated to distinct buffers elutions (Stals et al., 2012). The PEG method standardized by ISO 15216-1 describes the use of alkaline buffer adding 3% of beef extract and the mengo virus as SPCV, but allows the use of other agents that fulfill the described characteristics. The organic flocculation method associated with alkaline buffer for elution in a filter bag using CTAB treatment achieved a higher viruses recovering rate as reported in strawberry samples (Melgaço et al., 2016). Brandão et al. (2014a) also reached good results using Glycine buffer (alkaline buffer) when compared to PBS for NoV GII recovery in lettuce matrices. This method showed better results for NoV GII recovery efficiency possibly because it removes PCR inhibitors and performs viral detection. The organic flocculation is a low cost technique that can be used for recovering virus in different foods matrices.

Considering the results from the three varieties of tomatoes, it was notable that both methods showed no satisfactory recovery for NoV and MNV-1 recovery from cherry tomatoes. The low virus recovery efficiency of cherry tomatoes in the samples was similar to the results reported by Pan et al. (2012). Probably, the difficulty for detecting may be related to the use of pesticides in the cultivation, inhibiting the adsorption of the viruses on the surface of these fruits (Pinho et al., 2011).

Concluding, the skimmed milk flocculation protocol should be considered as an important method of virus recovery from fruits, mainly when the standardized method described by ISO 15216-1 could not be performed. The skimmed milk flocculation method is considered a low cost method for viruses recovering from different matrices and in Brazil, as well as in developing countries it could be an alternative method for ISO standardization helping elucidation of viral agents during foodborne outbreaks.

Acknowledgments

This study was funded by MCTI/CNPq/ANVISA (grant number 403264/2012-0). This research study is under the scope of the activities of Fiocruz as a Collaborating Center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

4. References

- Amaral, M. S., Estevam, G. K., Penatti, M., Lafontaine, R., Lima, I. C., Spada, P. K., Gabbay, Y. B., Matos, N. B., 2015. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 110 (2), 215-21.
- Atreya, C. D., 2004. Major foodborne illness causing viruses and current status of vaccines against the diseases. *Foodborne Pathog. Dis.* 1(2), 89-96.
- Baert, L., Wobus, C. E., Coillie, E. V., Thackray, L. B., Debevere, J., Uyttendaele, M., 2008. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2), 543-546.
- Brandão, M. L. L., Almeida, D. O., Marin, V. A., Miagostovich, M. P., 2014a. Recovery of Norovirus from lettuce (*Lactuca sativa*) using an adsorption-elution method with a negatively charged membrane: comparison of two elution buffers. *Visa em Debate* 2(3), 58-63.
- Brandão, M.L.L., Almeida, D.O., Bispo, F.C.P., Bricio, S.M.L., Marin, V.A., Miagostovich, M.P., 2014b. Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready-to-eat lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *J. Food Sci.* 79 (5), M961–M966.
- de Abreu Corrêa, A. & Miagostovich, M. P., 2013. Optimization of an Adsorption–Elution Method with a Negatively Charged Membrane to Recover Norovirus from Lettuce. *Food Environ. Virol.* 5(3), 144-149.
- de Andrade, J. da S., Rocha, M. S., Carvalho-Costa, F. A., Fioretti, J. M., Xavier, M. da P., Nunes, Z. M., Cardoso, J., Fialho, A. M., Leite, J. P., Miagostovich, M. P., 2014. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J. Clin. Virol.* 61(3), 345-52.
- Ethelberg S, Lisby M, Böttiger B, Schultz AC, Villif A, Jensen T, Olsen KE, Scheutz F, Kjelsø C, Müller L, 2010. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010, Rapid communications. *Euro Surveill.*, 15(6), pii=19484.
- Ferreira M. S., Victoria, M., Carvalho-Costa, F. A., Vieira, C. B., Xavier, M. P., Fioretti, J. M., Andrade, J., Volotão, E. M., Rocha, M., Leite, J. P., Miagostovich, M. P., 2010. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio De Janeiro, Brazil 2005-2008. *J. Med. Virol.*, 82 (8),1442-8.
- Ferreira, M. S., Cubel Garcia, R. de C., Xavier, M. da P., Ribeiro, R. L., Assis, R. M., Mota, M. do C., Leite, J. P., Miagostovich, M. P., de Oliveira, S. A., 2012a. Genotyping of gastroenteric viruses in hospitalised children: first report of norovirus GII.21 in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 107(8), 1064-7.
- Ferreira, M. S., Xavier, M. da P., Tinga, A. C., Rose, T. L., Fumian, T. M., Fialho, A. M., de Assis, R. M., Carvalho-Costa, F. A., de Oliveira, S. A., Leite, J. P., Miagostovich MP., 2012b. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *Plos One*, 7(3), e33754.
- Fioretti, J. M., Ferreira, M. S. R., Victoria, M., Vieira, C. B., Xavier, M. P. T. P., Leite, J. P. G., Miagostovich, M. P., 2011. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106 (8), 942-947.
- 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, 1548-1557.
- Loury P., Le Guyader F. S., Le Saux J.C., Ambert-Balay K., Parrot P., Hubert B., 2014. A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January 2012. *Epidemiol. Infect.*, 1-8.

Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R., 2013. Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. *Food Environ. Virol.* 5,162–168.

Maunula, L., Roivainen, M., Keränen, M., Mäkela, S., Söderberg, K., Summa, M., von Bonsdorff, C. H., Lappalainen, M., Korhonen, T., Kuusi, M., Niskanen, T., 2009. Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Rapid communications, Euro Surveill.* 14(49), 19435.

Melgaço, F. G., Victoria, M., Corrêa, A. A., Ganime, A. C., Malta, F. C., Brandão, M. L. L., Medeiros V. M., Rosas, C. O., Bricio, S. M. L., Miagostovich, M. P., 2016. Vírus recovering from strawberries: Evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 14–19.

Melgaço, F. G., Corrêa, A. A., Ganime, A. C., Brandão, M. L. L., Medeiros V. M., Rosas, C. O., Bricio, S. M. L., Miagostovich, M. P. (Unpublished results). Assessment of microbiological contamination of tomatoes using a skimmed milk organic flocculation for adenovirus recovery, Rio de Janeiro State, Brazil.

Morillo, S. G., Luchs, A., Cilli, A., Timenetsky, M. C. S. T., 2012. Rapid Detection of Norovirus in Naturally Contaminated Food: Foodborne Gastroenteritis Outbreak on a Cruise Ship in Brazil, 2010. *Food Environ. Virol.* 4, 124-129.

Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J., Griffin, P. M., 2013. Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 19(3), 407-415.

Pan, L., Zhang, Q., Li, X., Tian, P., 2012. Detection of human norovirus in cherry tomatoes, blueberries and vegetable salad by using a receptor-binding capture and magnetic sequestration (RBCMS) method. *Food Microbiol.* 30, 420-426.

Pinho, L., Almeida, A. C., Costa, C. A., Paes, M. C. D., Glória, M. B. A., Souza, R. M. 2011. Nutritional properties of cherry tomatoes harvested at different times and grown in an organic cropping. *Hortic. Bras.* 29, 205-211.

Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Calgua, B., Carratala, A., Maluquer de Motes, C., Rusiñol, M., Moresco, V., Ramos, A. P., Martínez-Marca, F., Calvo, M., Monte Barardi, C. R., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2013. Adenovirus and Norovirus Contaminants in Commercially Distributed Shellfish. *Food Environ. Virol.* 6(1), 31-41.

SINAN, 2015. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Ministério da Saúde. Série histórica de surtos, doentes e óbitos por DTA. Brasil, 2000-2014.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. *Food Microbiol.* 28, 52-58.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 1-9.

Verhoef L., Hewitt J., Barclay L., Ahmed S. M., Lake R., Hall A. J., Lopman B., Kroneman A., Vennema H., Vinjé J., Koopmans M., 2015. Norovirus Genotype Profiles Associated with Foodborne Transmission, 1999–2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21 (4), 592-599.

Vinjé, J. 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of noroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 53 (2), 373-381.

Yin, J.L., Shackel, N.A., Zekry, A., McGuinness, P.H., Richards, C., Putten, K.V., McCaughan, G. W., Eris, J. M., Bishop, G. A., 2001. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol. Cell Biol.* 79 (3), 213-21.

Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., & Monroe, S. S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–323.

6. Appendices

Figure 1. Flow charts of viral elution-concentration methods.

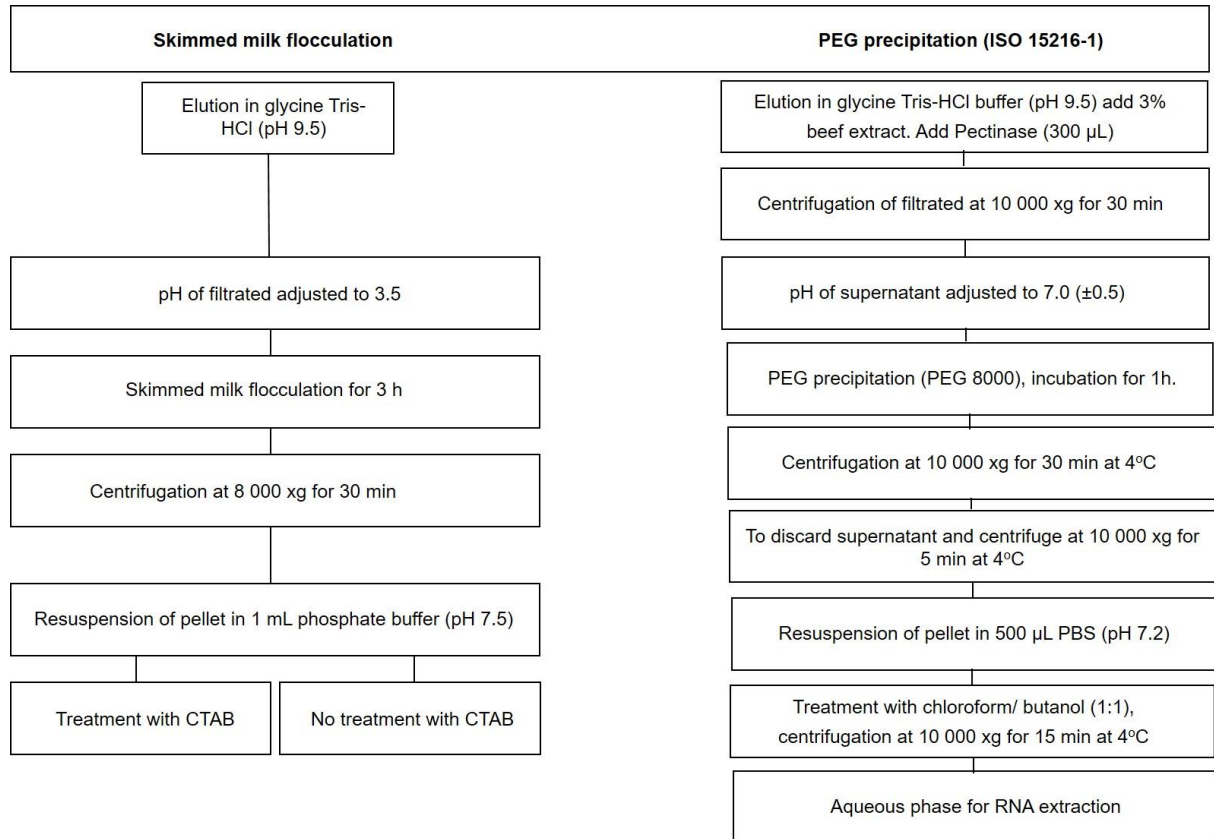


Table 1. Recovery success rate (%) and recovery efficiency (%) of skimmed flocculation and polyethylene glycol (PEG) precipitation methods analyzed in 24 qPCR reactions for norovirus genogroup II (NoV GII) and murine norovirus 1 (MNV-1).

Methods	Types of tomatoes	Treatment	NoV GII.4			MNV-1		
			Positive samples (% recovery success)	Recovery efficiency (%) Mean range		Positive samples (% recovery success)	Recovery efficiency (%) Mean range	
Skimmed milk flocculation	Tomato	CTAB ¹	24 (100.0)	33.4	7.9-66.3	18 (75.0)	4.1	1.7-9.5
		No CTAB	22 (91.6)	18.1	5.8-31.6	21 (87.5)	4.1	1.6-5.2
	Cherry tomato	CTAB	20 (83.3)	5.2	0.4-12.9	11 (45.8)	0.6	0.0-1.2
		No CTAB	21 (87.5)	9.8	0.5-27.0	11 (45.8)	1.9	0.0-5.7
	Grape tomato	CTAB	24 (100.0)	16.9	0.3-52.7	18 (75.0)	2.3	0.05-5.2
		No CTAB	24 (100.0)	29.6	2.5-110.9	19 (79.2)	4.2	0.2-11.1
	Grape tomato sliced	CTAB	24 (100.0)	47.7	26.0-68.0	23 (95.8)	4.6	2.1-9.5
		No CTAB	23 (95.8)	29.8	18.4-43.7	22 (91.6)	4.3	1.0-7.1
PEG precipitation (ISO 15216-1)	Tomato	Chloroform/butanol	21 (87.5)	5.5	0.3-18.5	22 (91.6)	8.5	0.9-30.4
	Cherry tomato		07 (29.2)	0.1	0.01-0.1	18 (75.0)	2.1	0.3-5.8
	Grape tomato		18 (75.0)	4.7	0.02-10.3	24 (100.0)	15.0	0.9-56.9
	Grape tomato sliced		22 (91.6)	8.5	0.5-29.5	24 (100.0)	12.5	0.9-45.2

1- Cetyltrimethylammonium bromide

9.4 Artigo 4

Microbiological evaluation in cheese samples and different methods for viruses recovering

MICROBIOLOGICAL EVALUATION INCHEESESAMPLES AND DIFFERENT METHODS FOR VÍRUSES RECOVERING

Fabiana Gil Melgaço^{1,3}; Isabelle da Silva Luz¹, Matheus Ribeiro da Silva Assis¹,
Mariana Seglia Caldas¹, Débora Alves Ferreira da Silva², Marcelo Luiz Lima Brandão²,
Valéria de Mello Medeiros², Carla de Oliveira Rosas², Silvia Maria Lopes Reis²and Marize
Pereira Miagostovich.¹

¹Laboratory of Comparative and Environmental Virology, Oswaldo Cruz Institute,
Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, Brazil;²Food Sector, Laboratory of Food and Sanitizing,
Department of Microbiology, National Institute of Quality Control in Health, Fiocruz, Rio de
Janeiro- RJ, Brazil; ³Multidisciplinary Laboratory of Biology, Federal Institute of Education,
Science and Technology of Rio de Janeiro, Duque de Caxias-RJ, Brazil

E-mail address: fabianagilmelgaco@gmail.com; belleluz@gmail.com;
matheursassis@gmail.com; marianaseglia93@gmail.com; debora.silva@incqs.fiocruz.br;
marcelollb8@gmail.com; valeria.medeiros@incqs.fiocruz.br; carla.rosas@incqs.fiocruz.br;
silvia.bricio@incqs.fiocruz.br; marizepm@ioc.fiocruz.br

Corresponding author: telephone number: +55 021 2562-1923

E-mail address: fabianagilmelgaco@gmail.com

Postal address: Av. Brasil, 4365, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Pavilhão Hélio &
Peggy Pereira, CEP: 21040-360, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

Abstract

Norovirus (NoV) is the most important agent of foodborne outbreaks of acute gastroenteritis and molecular detection of ready-to-eat foods is more difficult due to low levels of virus particles and the presence of inhibiting substances. Distinct methods of extraction and concentration based on elution and concentration virus have been reported or the use direct extraction of RNA in food samples. This study evaluated the efficiency of two variations of organic flocculation (skimmed milk) method and direct extraction by TRIzol® reagent in cheese, for Human NoVGII.4 (NoV GII.4) and Murine Norovirus (MNV-1) recovery. Two different types of Brazilian cheese ("Minas" and yellow cheese) from local commercial sources were spiked with NoV GII.4 and MNV-1 for 2 hours. For organic flocculation, Glycine 0.05M/Tris-HCl 0.1M buffer was used as elution buffer, flocculation with 1% skimmed milk was performed stirring for three hours and final pellet was resuspended with chloroform/butanol (1:1) or with TRIzol® reagent for "Minas" cheese. For yellow cheese, the pellet was treated only with Trizol. The direct extraction was performed with food homogenization with 6 ml of TRIzol® reagent allowing a contact time of 20 min

(shaking).The viral RNA was extracted by QIAamp viral RNA mini kit® (Qiagen) and the cDNA produced, using random primers. The viral quantification was performed by real time PCR using primers and probes previously described. The flocculation method using chloroform/butanol for final treatment had low recovery for NoV GII and MNV-1 and using TRIzol® reagent had a good result. However, the best result for “Minas” cheese samples was the direct extraction by TRIzol® reagent.For yellow cheese the results were similar, when processed the samples by organic flocculation method using Trizol the result had been low efficiency recovery when compared with direct extraction of TRIzol® reagent. For field study, we evaluated bacteriological and virological naturally contamination in the cheese samples (“Minas” and yellow cheese).All samples analysed, one (1.1%) was positive for NoV GI, one (1.1%) was positive for NoV GII and nine (10.0%) were positive for HAdV.And in bacteriological analysis, five samples (5,56%) were positive for *Listeria monocytogenes*, 27 (30%) presented faecal coliforms contamination and 10 (11,12%) contaminated with *Staphylococcus aureus*.The establishment of methods for viral concentration from food matrices, especially ready-to-eat foods, will assist epidemiologic investigations of outbreaks associated with NoV.

Keywords: cheese, food, norovirus, organic flocculation, trizol.

1. Introduction

Enteric viruses such as noroviruses (NoV) has been the main cause for acute gastroenteritis (AG) outbreaks due to the consumption of fresh and ready-to-eat foodssuch as vegetables, shellfish, sandwiches, deli meat and dairy (Loury et al., 2014; Maunula et al., 2009; Mäde et al., 2013; Morillo et al., 2012; Wit et al., 2007; Boxman et al., 2007).Foodborne illnesses leads a large number of hospitalizations worldwide and it is estimated that more than 67% of them are associated with viral infections due to the contamination of fresh produces or processed foods, dairy foods was associated with 12% of cases viral agent (Atreya, 2004; Painter et al., 2013). Sandwiches usually are prepared with dairy products, including cheese and ham, it foods eaten lightly cookedand are very manipulated. Food handlers contact with ready-to-eat food were identified the main factor to contribute to norovirus contamination in most of the outbreaks (Hall et al., 2012).

NoV are RNA viruses belonging to genus *Norovirus* and *Caliciviridae* family, classified in seven different genogroups (G) with more than 35 genotypes (Vinjé, 2015; Zheng et al., 2006). NoV GI, GII and GIV are related to infect humans, being the foodborne transmission mainly associated with a 10% of all genotype GII.4 outbreaks, 27% caused by

all other genotypes and 37% of outbreaks caused by mixtures of GII.4 and other noroviruses (Verhoef et al., 2015).

Other enteric viruses could be related food contamination, human adenovirus (HAdV) are DNA viruses belonging to the *Adenoviridae* family and genus *Mastadenovirus*, with 57 types, being the enteric type species HAdV-40 and HAdV-41 mostly associated with foodborne diseases (Greening, 2006). HAdV presented consistently high levels in sewage all year round (Wyn-Jones et al., 2011) and used as indicator viruses for human faecal contamination in water (Hewitt et al., 2013).

The difficulty in obtaining viruses from food sample, mostly ready-to-eat food, because had fatty compounds (lipids and polysaccharides) requires clarification step in elution and concentration techniques, which need to be adapted for different food matrices (Demeke& Jenkins, 2010; Brandao et al, 2014). Another requirement is the use of sample process control virus (SPCV), mainly to assess negative results by demonstrating that there was no inhibitors of enzymatic reaction in those matrices (Stals et al., 2012).

The consumption of cheese around the world increases continually due to its versatility and adaptability to recipes, greater availability of various types of cheese, and the increased interest in cheese-containing dishes. In Brazil, it is a common habit to consume cheese in at least one daily meal. Typical Brazilian cheeses such as “Minas Frescal” cheese and “Prato” cheese are preferred by the majority of the consumers (Planzaer et al, 2009). However, the possibility of the transmission of diseases by the consumption of cheese is common, mainly if they are produced with raw milk and/or were not inspected by the Brazilian authorities (Planzaer et al, 2009). According to Ministry of Health of Brazil, from 2000 to 2014 milk and dairy products were implicated as contamination vehicles in 356 outbreaks (3.7%) from a total of 9,719 (Anvisa, 2014).

This study aims to evaluate viral recovery methodologies in samples of “Minas” cheese and “Prato” cheese; and to assess viruses and bacteriological contamination by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*; and fecal coliform and coagulase-positive staphylococcus (CPS) levels in samples of “Minas” cheese and “prato” cheese commercialized in State of Rio de Janeiro, Brazil.

2. Material and Methods

2.1 Viruses and food samples

A NoV GII.4 stool sample (GenBank accession number JX975591) was obtained from the Regional Reference Gastroenteritis Laboratory collection, at the Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. Murine norovirus-1 (MNV-1) kindly provided by Dr. Herbert W.

Virgin from Washington University School of Medicine, was propagated in RAW 264.7 cells (a macrophage-like Abelson leukemia virus transformed cell line derived from BALB/c mice), according to de Abreu Corrêa and Miagostovich (2013). Real time PCR TaqMan system was used to quantify the absolute number of genome copies (gc)/mL (Yin et al., 2001) used for the spiking experiments.

Two types of cheeses, “Minas” cheese and “Prato” cheese, were obtained in different commercial establishments in the municipalities of Niterói and Rio de Janeiro in the State of Rio de Janeiro for artificial contamination. The samples were transported at ambient temperature to the laboratory and then frozen until processing step. For the investigation of viral presence, 90 samples were collected: 30 samples of “Minas” cheese (MC1-30), 30 samples of “Prato” cheese (PC1-30) and 30 “Prato” cheese sliced (PS1-30); in the period from May to November 2015. The samples were collected randomly and acquired in primary packaging under the full or divided in different commercial establishments (supermarkets, bakeries, grocery stores.) in the municipalities of Niterói and Rio de Janeiro in the State of Rio de Janeiro. The choice of the marks was according to the availability on the market during the period of analysis. These samples were evaluated for bacterial contamination according to Brazilian Standards (2001).

2.2. Spiking experiments

The two methods were compared by performing a triplicate spiking experiments. The inoculum amount was determined according to a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) detection limit of each virus as previously determined (Melgaço et al., 2016).

For artificial contamination, cheese samples (10 g) were spiked by direct application of 250 µL of NoV GII.4 (1×10^6 gc /mL) and 100 µL of MNV-1 (5×10^5 gc/mL) onto food surfaces for 2 hours at room temperature.

For each method, it was used one sample as negative control (seeded with 350 µL of PBS 1X) and processed at the same time as the others. The final concentrate obtained from each method was used for RNA extraction and quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using TaqMan® assays.

2.2 Experimental Design of the study

Two different treatments were performed in organic flocculation method (Methods 1 and 2) for the assessment of recovery in “Minas” cheese samples, compared to direct extraction by TRIzol® reagent (Method 3) described by Stals et al. (2011). For the analysis of “Prato” cheese samples, two methods were compared: Method 2 and 3. Then, the better method was used for to investigate samples naturally contaminated.

2.3 Viral concentration methods

Method 1

In order to optimize the flocculation method (Calgua et al., 2008), artificial contamination experiments were performed. Briefly, fresh “Minas” cheese (10 g) were spiked by direct application of 250 μL of NoV GII.4 (1×10^6 genomic copies (gc) /mL) and 100 μL of MNV-1 (5×10^5 gc/mL) onto food surface for 2 hours at room temperature. The elution was performed with 90 mL Glycine 0.05M/Tris-HCl 0.1M buffer for 30 min in a filter bag (Nasco®, Fort Atkinson, Wisconsin, USA). Then, the eluates were transferred to sterile beakers and treated with chloroform/butanol (1:1) for 5 min. The samples were centrifuged (10,000 $\times g$ for 30 min, 4 °C), the supernatant was collected and the pH were adjusted to 3.5 using HCl 6 N. Skimmed milk at a final concentration of 1% were added. The organic flocculation process was performed for three hours with constant stirring. After this step, the flocculated samples were centrifuged (8,000 $\times g$ for 30 min) and the pellet was re-suspended in 1 mL of phosphate buffer (pH 7.5; Na_2HPO_4 0.2M/ NaH_2PO_4 0.2M; 1:2 v/v).

Method 2 and 3

Initial steps similar to method 1, but without treatment of the supernatant with chloroform / butanol (1: 1) e o pellet was resuspended in 1 mL de TRIzol® (Method 2). 10 g of food product was eluted with 6 ml of TRIzol® reagent for 20 min (shaking) in a filter bag. After, was performed centrifugation (8000 $\times g$, 20 min, 4 °C), the supernatant was taken and stored at -20 °C as described by Baert et al., (2008b) (Method 3).

2.4 *Virus detection*

Viral RNA/DNA was extracted from 140 μL of the concentrated samples, using QIAamp viral RNA mini kit® (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Synthesis of complementary DNA (cDNA) was performed using random primers (Invitrogen®, USA) for RNA virus detection.

MNV-1, NoV (GI and GII) and HAdV qPCR using TaqMan® system (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), were performed using a set of specific primers and probes presented in Table 1. For all genomic quantification a standard curve was performed with eight points of serial plasmid dilutions (10^7 – 10^0 gc/reaction) that yields a slope of -3.59 and a reaction efficiency of 0.90.

qPCR reactions consisted of 5 μL of cDNA/DNA sample, 12.5 μL universal master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and corresponding primers and hydrolysis probe. The following conditions were used for the amplification step: activation of the uracil N-glycosylase for 2 min at 50 °C, and activation of AmpliTaqGold (Applied biosystems, Foster City, CA, USA) for 10 min at 95 °C followed by 45 cycles of amplification (15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C). An ABI PRISM 7500™ real time PCR system (Applied Biosystems,

Foster City, CA, USA) was used in all assays. All samples were tested in duplicate using both undiluted and 1:10 diluted RNA/DNA, totalizing four qPCR reactions per sample. Samples were considered positive when at least one replica was detected at the cycle threshold (Ct) 38 or lower.

2.5 Bacterial Analysis

Salmonella spp. analyses were performed using semi-automated VIDAS® system (bioMérieux, France) kit using VIDAS® *Salmonella* (SLM), according to the fabricant specification. For *L. monocytogenes* the culture method by selective enrichment technique was carried out according to the standardized methodology (Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual online (BAM- FDA) (Hitchins et al, 2016). Fecal coliform was investigated by plate count, using Petrifilm™ Coliform Count Plate (3M, USA). The enumeration of CPS was performed by the multiple-tube technique (Most Probable Number-MPN) according to ISO 6888-3:2003.

2.6 Data Analysis

Recovery of MNV-1 and NoV GII.4 from cheese samples was qualitatively and quantitatively analyzed according to the methods (Melgaço et al., 2016; Stals et al., 2011).

Moreover, statistical analyses of NoV GII.4 recovery rates were performed using the nonparametric tests: Kruskal–Wallis (KW-test) and Wilcoxon test (*t* test), followed by a Kolmogorov–Smirnov (KS-test) test. For MNV-1 parametric test one-way analysis of variance (ANOVA) and nonparametric Wilcoxon test (*t* test) were applied, followed by a KS-test. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Significance levels were set at 0.05.

3. Results

3.1 Recovery success and recovery efficiency of the methods 1, 2 and 3

For “Minas” cheese samples, all methods (1, 2 and 3) were performed and in both qualitative and quantitative analysis, Method 3 had been satisfactory results. The recovery success rate was 100.0% in both viruses evaluated and showed better results of NoV GII.4 (51.0%) and the MNV-1 (42.9%) for recovery efficiency (Table 2).

For “Prato” cheese samples, only Methods 2 and 3 were performed, and the recovery success rate of NoV GII.4 and MNV-1 was considered satisfactory results (100.0%) in both methods. The Method 3 was presented the best result in quantitative analysis for NoV GII.4 (79.9%) and MNV-1 (42.9%) (Table 2).

The results of the analysis by *t* test for NoV GII.4 showed that Methods 1 and 3 had statistical significance ($p= 0.0313$) in the “Minas” cheese samples. For yellow cheese, *t* test

no showed statistical significance ($p=0.2188$). When the ANOVA and t test analysis were applied for MNV-1, the Method 3 presented a better performance than Method 1 in “Minas” cheese ($p= 0.0001$). Method 3 showed a significant difference when compared to Method 2 for the yellow cheese samples ($p= 0.0313$).

3.2 . *Detection of virus and bacteria in cheese samples*

NoV GI and NoV GII were detected in one (1.1%) sample, NoV GI in “Prato” cheese and NoV GII in “Minas” cheese (Table 3). HAdV was detected in nine (10.0%), six samples of “Prato” cheese and three samples of “Prato” cheese sliced by markets.

Salmonella spp. was not detected in any of the 90 commercialized cheese samples analyzed and *L. monocytogenes* was detected in five (5.5%) samples (Table 3). Enumeration of fecal coliforms and CPS in cheese samples were summarized in Table 4. Twenty-seven samples (30.0%) presented fecal coliforms and ten samples (11.1%) CPS.

4. *Discussion*

The Method 3 was the best method for NoV GII.4 and MNV-1 recovery in spiking experiments in both analysis (qualitative and quantitative) with significant differences after statistical analysis. Method 1 was not used in “Prato” cheese samples because were processed after evaluation of the “Minas” cheese, and the results were unsatisfactory for this method.

Fumian et al. (2009) reported NoV GII.4 recovery of 56.3% in “Minas” cheese using the negatively charged membranes method with Ozone-Safe solvent Vertrel XF[®] (Fluke, Steinheim, Switzerland) in clarification step. For the Method 1 chloroform/butanol (1:1) was used as clarifier to help in the elimination of fat/protein which are inhibiting substances in nucleic acid detection (Baert et al. 2008b). When Stals et al. (2011) assess methods of NoV recovery in the ready-to-eat samples using TRIzol[®] reagent, as clarifier, showing excellent results in this study.

The use of Method 3 in the evaluation of commercially samples, it was possible to detect NoV GI and GII in “Prato” cheese and “Minas” cheese, respectively, and also allowed the detection of HAdV, in indicator of fecal contamination in “Prato” cheese samples (Table 3). The same method (the direct extraction by TRIzol[®]) was used when NoV GII was detected in blue cheese samples in a foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil (Morillo et al., 2012). Furthermore HAdV has been detected in food handlers' hands on some farms (Maunula et al., 2013) and suggested as potential source dairy products contamination.

Concerning bacteriological results, the absence of *Salmonella* spp. in cheese concurs with results of previous studies carried out in Brazil (Carvalho et al, 2007; Lima et al, 2008;

Cardoso et al., 2013). The presence of *L. monocytogenes* in five (5.5%) samples is similar to reported by Carvalho et al. (2007), that detected *L. monocytogenes* in 3/93 (3.2%) samples of “Minas” Frescal cheese in the State of São Paulo, Brazil. “Minas” Frescal cheese has a low pH (4.9–5.3), high water activity and moisture levels (55-58%) that could favor the survival of *L. monocytogenes* (Silva et al, 2003). Since the analyzed cheese samples are considerate ready-to-eat foods, the presence of *L. monocytogenes* represents a great risk, especially for pregnant and immocompromised people. In 2008, a case of *L. monocytogenes* infection occurred in a newborn whose birth occurred at the 7th moth of gestation; and the newborn’s mother reported a fever and inertia after consuming gorgonzola cheese (Vasconcelos et al., 2008).

Fecal coliforms were detected in 20 samples (66.7%) of “Minas” cheese, two samples (6.7%) of “Prato” cheese and seven samples (23.3%) of “Prato” cheese sliced reflects unsatisfactory hygienic condition and did not meet the Brazilian Standards (Anivsa, 2001) (Table 4). Similar results to those were reported in other studies in Brazil (Araújo et al, 2002; Carvalho et al, 2007; Cardoso et al, 2013). Adequacy of protection against post pasteurization contamination is commonly evaluated by testing for coliform bacteria, which are destroyed by proper pasteurization. Despite this, our findings suggested the possibility of fecal contamination of pasteurized milk used for cheese production by an inefficient heat treatment applied or unsanitary conditions during cheese manufacturing (Araújo et al, 2002; Cardoso et al, 2013).

All samples presented CPS counts lower than the Brazilian Standards (Anivsa, 2001) (Table 4). These results were different than the reported by Araújo et al. (2002) that analyzed 45 samples of soft cheeses and detected CSP above $10^3/g$ in 8 (17.7%) samples. Staphylococcal food poisoning is one of the most common food-borne diseases and results from the ingestion of staphylococcal heat-stable enterotoxins preformed in food by enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* spp. that can cause nausea, vomiting and diarrhoea when ingested (Hennekinne et al, 2010). Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in “Minas” cheese have already been reported in Brazil (Carmo et al, 2002).

In summary, the incidence of fecal coliforms and *L. monocytogenes* in the cheese samples collated in the market indicate deficiencies in hygiene procedures applied during the production lineand or/ failures in the storage process of these products., and indeed represents a serious risk to consumer health, stressing the need for good manufacturing practices and rigorous quality control systems in the dairy industry.

Acknowledgements

MCTI/CNPq/ANVISA n°. 23/2012 .This research study is under the scope of the activities of Fiocruz as a collaborating center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health. The authors thanks to the Pos-graduation Program from INCQS/Fiocruz that D. Silva was matriculated as resident student.

5. References

Anvisa. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 26 January 2001. RDC no. 12.

Anvisa. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar – UHA, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis – CGDT, Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2014.

Araújo, V. S., Pagliares, V. A., Queiroz, M. L., Freitas-Almeida, A. C., 2002. Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Appl Microbiol.* 92(6):1172-7.

Atreya, C. D., 2004. Major foodborne illness causing viruses and current status of vaccines against the diseases. *Foodborne Pathogens Disease* 1(2), 89-96.

Baert, L., Wobus, C. E., Coillie, E. V., Thackray, L. B., Debevere, J., Uyttendaele, M., 2008a. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Applied Environmental Microbiology* 74 (2), 543-546.

Baert, L., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2008b. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *International Journal of Food Microbiology* 123, p. 101-108.

Boxman, I.L.A., Tilburg, J.J.H.C., Loeke, N.A.J.M., Vennema, H., de Boer, E., Koopmans, M., 2007. An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Food Protection* 70, 504–508

Brandão, M. L., Almeida, D. O., Bispo, F. C., Bricio, S. M., Marin, V. A., Miagostovich, M. P., 2014. Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready-to-eat lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *J Food Sci.* 79(5):M961-6.

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. *Journal of Virological Methods* 153(2), 79-83.

Cardoso, V. M., Dias, R. S., Soares, B. M., Clementino, L. A., Araújo, C. P., Rosa, C. A., 2013. The influence of ripening period length and season on the microbiological parameters of a traditional Brazilian cheese. *Braz J Microbiol.* 44(3): 743–749.

Carmo, L.S., Dias, R. S., Linardi, V. R., Sena, M. J., Santos, D. A., Faria, M. E., Pena, E. C., Jett, M., Heneine, L. G., 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of Staphylococcus present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* 19: 9–14.

Carvalho, J. D. G., Viotto, W. H., Kuaye, A. Y., 2007. The quality of Minas frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control.* 18(3):262-7.

de Abreu Corrêa, A. & Miagostovich, M. P., 2013. Optimization of an Adsorption–Elution Method with a Negatively Charged Membrane to Recover Norovirus from Lettuce. *Food and Environmental Virology* 5(3), 144-149.

Demeke, T. & Jenkins, G. R., 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and bioanalytical chemistry* 396(6), 1977-90.

Fumian, T. M., Leite, J. P., Marin, V. A., Miagostovich, M. P., 2009. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *J Virol Methods* 5(1), 39–43.

Greening, G.H. (2006). Human and Animal Viruses in food (Including Taxonomy of Enteric Viruses). *Viruses in Foods*. In: Ed. S. Goyal, Hardcover (Ed.), Chapter 2, pp. 345.

Lima, C. D.C., Cerqueira, M. M. O. P., Ferreira, E. G., Faria Jr, C. L. L., Nelson, D. L., Carmo, L. S., Rosa, C. A., 2008 Microbiological, physical-chemical and sensory evaluation of a traditional Brazilian cheese during the ripening process. *World J Microbiol Biotechnol.* 24:2389-2395.

International Organization for Standardization (ISO). ISO6888-3:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 3: Detection and MPN technique for low numbers.

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, 1548-1557.

Hennekinne, J. A., Ostyn, A., Guillier, F.; Herbin, S., Prufer, A. L., Dragacci, S., 2010 How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized?. *Toxinis.* 1(8):2106-16.

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. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4523–4533.

Hitchins, A. D., Jinneman, K., Chen, Y. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. 2016. In: *Bacteriological Analytical Manual*. Chap. 10; FDA. Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>. Accessed 2016 April 7.

Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R., 2013. Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. *Food and Environmental Virology* 5, 162–168.

Maunula, L., Roivainen, M., Keränen, M., Mäkela, S., Söderberg, K., Summa, M., von Bonsdorff, C. H., Lappalainen, M., Korhonen, T., Kuusi, M., Niskanen, T., 2009. Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Rapid communications, Eurosurveillance* 14(49), 19435.

Maunula L., Kaupke A., Vasickova P., Söderberg K., Kozyra I., Lazic S., van der Poel W. H. M., Bouwknegt M., Rutjes S., Willems K. A., Moloney R., D'Agostino M., Husman A. M. R. H., von Bonsdorff C.-H., Pavlik A. R. I. P., Petrovic T., Cook N., 2013. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *International Journal of Food Microbiology* 167, 177–185.

Melgaço, F. G., Victoria, M., Corrêa, A. A., Ganime, A. C., Malta, F. C., Brandão, M. L. L., Medeiros V. M., Rosas, C. O., Bricio, S. M. L., Miagostovich, M. P., 2016. Virus recovering from strawberries: Evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 14–19.

Morillo, S. G., Luchs, A., Cilli, A., Timenetsky, M. C. S. T., 2012. Rapid Detection of Norovirus in Naturally Contaminated Food: Foodborne Gastroenteritis Outbreak on a Cruise Ship in Brazil, 2010. *Food Environ. Virol.* 4, 124-129.

Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J., Griffin, P. M., 2013. Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases* 19(3), 407-415.

Silva, I. M. M., Almeida, R. C. C., Alves, M. A. O., & Almeida, P. F., 2003. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *Int J Food Microbiol.* 81(3), 241–248.

Stals A., Baert L., Keuckelaere A. D., Van Coillie E., Uyttendaele M. Evaluation of a norovirus detection methodology for ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 145, p. 420–425, 2011.

Vasconcelos, R. M., Almeida, A. E., Hofer, E., Silva, N. M., Marin, V. A., 2008. Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 103(8):836-8.

Verhoef L., Hewitt J., Barclay L., Ahmed S. M., Lake R., Hall A. J., Lopman B., Kroneman A., Vennema H., Vinjé J., Koopmans M., 2015. Norovirus Genotype Profiles Associated with Foodborne Transmission, 1999–2012. *Emerging Infectious Diseases* 21 (4), 592-599.

Vinjé, J. 2015. Advances in laboratory methods for detection and typing of noroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 53 (2), 373-381.

Yin, J.L., Shackel, N.A., Zekry, A., McGuinness, P.H., Richards, C., Putten, K.V., McCaughan, G. W., Eris, J. M., Bishop, G. A., 2001. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunology and cell biology*, 79 (3), 213-21.

Wit M. A., Widdowson M. A., Vennema H., De Bruin E., Fernandes T., Koopmans M. Large outbreak of norovirus: The baker who should have known better. *Journal of Infection*, v. 55, p. 188-193, 2007.

Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Holler, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kozyra, I., Lopez-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M.S., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk, R., Wyer, M., 2011. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Research* 45 (3), 1025–1038.

Zheng, D. P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I., & Monroe, S. S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312–323.

6. Appendices

Table 1. Primers and probe sets used to detect murine norovirus (MNV-1), human norovirus (NoV GI and GII) and human adenovirus (HAdV) by qPCR.

Primers and Probes	Sequence (5'–3')	Reference
MNV-1		Baert et al. (2008a)
Fw-ORF1/ORF2	CAC GCC ACC GAT CTG TTC TG	
Rv-ORF1/ORF2	GCG CTG CGC CAT CAC TC	
MGB-ORF1/ORF2	6FAM-CGC TTT GGA ACA ATG- MGBNFQ	
NoV GI		Kageyama et al. (2003)
COG 1F (+)	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	
COG 1R (-)	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	
Ring 1(a)-TP	FAM- AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA	
Ring1(b)-TP	FAM- AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA	
NoV GII		
COG 2F (+)	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	
COG 2R (-)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	
Ring 2-TP	FAM- TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	
HAdV		Hernroth et al. (2002)
AdF	C(AT)T ACA TGC ACA TC(GT) C(CG)G G	
AdR	C(AG)C GGG C(GA)A A(CT)T GCA CCA G	
AdP1	6FAM-CCG GGC TCA GGT ACT CCG AGG CGT CCT-TAMRA	

Table 2. Quantitatively and qualitatively analyzed of NoV GII.4 and MNV-1 recovery.

	Met	Food	Treatment	NoV GII.4		MNV-1	
				Mean (%)	Range(%)	Mean (%)	Range (%)
Recovery efficiency	Method 1	“Minas”cheese	Chloroform/butanol	0.2	0.01-0.10	1.0	0.4-4.5
	Method 2	“Minas”cheese	Trizol	22.0	1.6-82.9	2.5	0.1-8.2
		“Prato” cheese		25.1	2.1-77.0	5.56	1.0-15.0
	Method 3	“Minas”cheese	Trizol	51.0	1.6-147.6	57.1	7.5-159.3
		“Prato” cheese		79.9	5.2-313.9	42.9	10.8-92.5
	Recovery success rate	Method 1	“Minas”cheese	Chloroform/ butanol	04/24 (16.7)		09/24 (37.5)
Method 2		“Minas”cheese	Trizol	20/24 (83.3)		16/24 (66.7)	
		“Prato”		24/24 (100.0)		24/24 (100.0)	
Method 3		“Minas”cheese	Trizol	24/24 (100.0)		24/24 (100.0)	
		“Prato” cheese		24/24 (100.0)		24/24 (100.0)	

Table 3. Assessment of viruses and bacterial pathogens in cheese samples collected in the market.

Type of cheese sample	Microorganisms or virus / N.º of positive samples (identification)[%]				
	Human adenovirus (HAdV)	Norovirus (NoV)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	
“Minas” cheese (n=30)	0 [0]	1 (MCX)[3.3]	0 [0]	4 (MC17, MC22, MC23, MC30)[13.3]	
“Prato” cheese (n=30)	6 (PCX, PCX, PCX, PCX, PCX, PCX) [20.0]	1 (PCX)[3.3]	0 [0]	0 [0]	
“Prato” cheese sliced (n=30)	3 (PSX, PSX, PSX) [10.0]	0 [0]	0 [0]	1 (PS21) [3.3]	
Total (n=90)	9 [10.0]	2 [2.2]	0 [0]	5 [5.6%]	
Total of samples that did not meet Brazilian Standard ^a	No limit established by legislation	No limit established by legislation	0 [0]	5 [5.6%]	

a-Limit established by the Brazilian legislation for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* is absence in 25g.

Table 4. Enumeration of Fecal coliforms and coagulase-positive staphylococcus in cheese samples collected in the market.

Ranges of counts (MPN ^a /g or CFU ^b /g)	Fecal coliforms				Coagulase-positive staphylococcus				
	“Minas” cheese (n=30) no. (%)	“Prato” cheese (n=30) no. (%)	“Prato” sliced (n=30) no. (%)	Total (n=90) no. (%)	“Minas” cheese (n=30) no. (%)	“Prato” cheese (n=30) no. (%)	“Prato” sliced (n=30) no. (%)	Total (n=90) no. (%)	
<10	8 (26.7)	22 (73.3)	11 (36.7)	41 (45.6)	30 (100.0)	30 (100.0)	28 (93.3)	88 (97.8)	
10-499	2 (6.7)	6 (20)	12 (40.0)	20 (22.2)	0 (0)	0 (0)	2 (6.7)	2 (2.2)	
500-999	0 (0)	0 (0)	2 (6.7)	2 (2.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
≥1000	20 (66.7)	2 (6.7)	5 (16.7)	27 (30.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Total of samples above the limit ^c	20 (66.7)	2 (6.7)	7 (23.3)	29 (32.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

a- fecal coliforms counts were reported as Colony Former Unity/g; b- Coagulase-positive staphylococcus were reported as Most Probable Number/g; c-Limit established by the Brazilian legislation for fecal coliforms and Coagulase-positive staphylococcus is 5×10^2 /g for “Minas” cheese and 10^3 /g for “Prato” cheese.