

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DA QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Lúcia Maria Corrêa Werneck

**DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE
ALFACES ORGÂNICOS NA REGIÃO SERRANA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

Rio de Janeiro

2018

Lúcia Maria Corrêa Werneck

DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE ALFACES
ORGÂNICOS NA REGIÃO SERRANA DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Dr. Edson Elias da Silva e

Dra. Marize Pereira Miagostovich

Rio de Janeiro

2018

Catologação na Fonte

Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde

Biblioteca

Werneck, Lúcia Maria Corrêa

Disseminação de vírus entéricos na cadeia de produção de alfaces orgânicos na região serrana do Rio de Janeiro, Brasil / Lúcia Maria Corrêa Werneck. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2018.

97 f., il., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2018.

Orientadores: Dr. Edson Elias da Silva e Dra. Marize Pereira Miagostovich.

1. Alface. 2. Vírus. 3. Vigilância Sanitária. 4. Irrigação Agrícola. I. Título

Dissemination of enteric viruses in the organic lettuce production chain in the mountain region of Rio de Janeiro

Lúcia Maria Corrêa Werneck

DISSEMINAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS NA CADEIA DE PRODUÇÃO DE ALFACES
ORGÂNICOS NA REGIÃO SERRANADO RIO DE JANEIRO, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

BANCA EXAMINADORA

Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ

Adriana de Abreu Corrêa

Universidade Federal Fluminense

Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ

José Nelson dos Santos Silva Couceiro

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Marize Pereira Miagostovich (Orientadora)

Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Dr. Edson Elias da Silva (Orientador)

Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Aos meus maiores amores Adenauer, Paula, Marina,
Daniel, Raquel, Leandro e Lucas gratidão pela força,
paciência, energias positivas e encontros.

Vocês são a minha vitória e a minha vida!

AGRADECIMENTOS

Para vencer este grande desafio, o mais importante foi ter fé e grandes amigos...

À pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS e sua equipe Kátia Leandro, Ivano de Filippis, Gisele Huf, Sergio Silva e todos os professores e colegas de turma pelo aprendizado caloroso! Às meninas da secretaria acadêmica, Giselle Custódio, Jéssica de Sá, Maria Goretti Tavares, Sâmela Barbosa, pela paciência e carinho.

À melhor orientadora Marize Pereira Miagostovich pela dedicação, perseverança, carinho e por dividir comigo seu potencial científico ao longo destes anos. Você foi demais!!!

Ao meu orientador Edson Elias da Silva por me acolher calorosamente no Laboratório de Enterovírus, por acreditar na minha capacidade e pelos ensinamentos científicos.

Às pessoas incríveis do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental pelo acolhimento científico e pessoal. Adriana Corrêa, Fabiana Melgaço, Mônica Rocha, entre outros, pelos ensinamentos! Me senti parte desta família unida e forte!

Ao Dr José Paulo Leite, Dr^a Ana Maria Gaspar, e à equipe do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia por contribuir no tema da Tese.

Aos meus anjos Carmen Baur, Túlio Machado e Marcelle Figueira pelos ensinamentos científicos, por estarem sempre presentes nas horas mais difíceis desta jornada! Muito obrigada pela dedicação e carinho!

Ao grupo do Laboratório de Enterovírus do IOC, Sergio Verley, Silas Oliveira e em especial à Marcia *Milk* Leite pela disposição, competência e atitudes brilhantes na realização deste trabalho científico!

Ao José Nelson Couceiro por todas as revisões dos projetos! Foi tão importante...

A todos do Departamento de Imunologia pela torcida e carinho. Em especial à Cida Boller, Fábio Lima, Wildeberg Moreira e Wlamir de Moura por terem compartilhado suas experiências profissionais, amizade e apoio científico durante este longo caminho!

À Marisa Adati e toda sua equipe pela troca de experiências, por confiarem e pela grande amizade de muitas décadas!

A meu amigo Alexandre Dias pelo suporte científico, amizade, carinho e por tornar este sonho possível!

À amiga Regina Lameirão pelo carinho, amor, dedicação, cumplicidade e apoio nas horas mais difíceis!

Ao Jarbas Emílio dos Santos, Thalles Caetano e Fabiano pela alegria e alicerce científico dado nas viagens das coletas!

Aos colegas Joana Angélica, Marcelo Brandão, Silvia Lopes, Carla Rosas e Valéria Medeiros, Departamento de Microbiologia do INCQS, por me apoiarem com conhecimentos bacteriológicos.

À Cátia Chaia, Jandira dos Santos e Helenilce de Carvalho pelo apoio e amizade!

Aos amigos Maysa Mandetta, Ivano de Filippis e Célia Romão por confiarem, acreditarem, compartilharem suas capacidades científicas e pelo carinho de uma vida!

Ao revisor desta Tese, Antônio Eugênio de Almeida, meu amigo, irmão, um exemplo para mim. Pelos conhecimentos científicos, confiança, dedicação, carinho e aprendizado de vida!

Aos bibliotecários Janaina Leal e Alexandre Medeiros pela revisão bibliográfica e incentivo durante a realização deste trabalho. Vinícius muito obrigada por todo seu apoio!

A todos amigos e colegas do INCQS que pelos corredores e em curtas conversas me deram sorrisos, carinho e força para vencer!

Ao Nelson Buarque Cavalcanti Junior da EMATER-Rio, por me apresentar o proprietário do sítio no Brejal, que permitiu a realização desta pesquisa!

À Deus, aos Santos e Anjos pela proteção divina sempre presente!

Aos meus irmãos Sônia, Pedro, Elisa, Virgínia, Flavio e Renata por emanarem energias positivas durante esta jornada.

À TODA minha família, minha mãe Solange, pelo seu amor e força, meu pai Gilberto (*in memoriam*), Yolanda, sobrinhos, afilhadas Camila e Stela.

Meus amados filhos Paula, Marina, Danny, Raquel e Leandro e meu neto Lucas por todo o amor compartilhado entre nós! Obrigada por toda a ajuda durante a realização desta Tese Paula e Danny! Marina nossos encontros nos Congressos internacionais foram excepcionais e marcantes! Vocês são a LUZ do meu caminho, minha VIDA!

Ao Adenauer, meu tudo!

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Este estudo, pioneiro na investigação da disseminação de vírus entéricos na cadeia produtiva de alfaces orgânicos no Estado do Rio de Janeiro, tem como principal objetivo demonstrar estes patógenos como importantes contaminantes ambientais, assim como sua utilização como marcadores de contaminação fecal humana. A pesquisa de norovírus (NoV), rotavírus A (RVA), adenovírus humano (HAdV) e enterovírus (EV) foi realizada na região do Brejal, município de Petrópolis, uma das maiores áreas de produção agrícola do Estado. Nos anos de 2010 e 2011 foram realizadas doze campanhas de coleta, onde foram obtidas um total de 60 amostras de água nas diferentes etapas de produção (nascente, irrigação, lavagem) e 36 de alfaces, incluindo mudas e alfaces adultas. Para avaliar a qualidade da água, parâmetros físico-químicos e indicadores bacteriológicos, como coliformes totais e *Escherichia coli*, também foram quantificados. Para detecção e quantificação viral todas as amostras foram concentradas pelo método de adsorção-eluição, com membrana carregada negativamente, com volumes iniciais de dois litros (2 L) e 25 gramas (g) de água e alface, respectivamente e analisadas pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), utilizando sistema TaqMan™. Vírus foram detectados em 48,4% das amostras de água (29/60) e em 44,5% (16/36) de amostras de alface, com concentrações variando de $7,29 \times 10^1$ a $4,72 \times 10^6$ cg/L e de $4,29 \times 10^1$ a $5,56 \times 10^4$ cg/25 g, respectivamente. HAdV foram detectados em todos os pontos de coleta de água e alface (11,5% - 11/96), embora os RVA tenham sido os mais prevalentes com 14,6% (14/96) de detecção, seguidos dos EV ([12,5%] 12/96) e dos NoV ([8,3%] 8/96). Amostras positivas para HAdV foram processadas para isolamento viral em cultura de células A549, HEK 293 e HEp-2 e as positivas para EV em cultivos celulares RD, MRC-5 e HEp-2c. Embora não se tenha demonstrado a infecciosidade dos vírus detectados, níveis de concentração na ordem de 10^4 em alfaces prontas para comercialização, a presença de pelo menos dois vírus diferentes em todos os pontos estudados, assim como a detecção em águas caracterizadas como adequadas pelos parâmetros bacteriológicos demonstram a importância da utilização dos vírus como marcadores de contaminação ambiental em cadeias produtivas de hortaliças, afim de assegurar a qualidade destes alimentos. Valores de *Escherichia coli* superiores ao estabelecido pela legislação corroboraram para a má qualidade da água utilizada na irrigação das mudas.

Palavras-chave: Água de Irrigação. Alimentos. Vírus entéricos. Alface.

ABSTRACT

This study, a pioneer in the investigation of the dissemination of enteric viruses in the organic lettuce production chain in the state of Rio de Janeiro, has as main objective to demonstrate these pathogens as important environmental contaminants, as well as their use as markers of human fecal contamination. The study of norovirus (NoV), rotavirus A (RVA), human adenovirus (HAdV) and enterovirus (EV) was carried out in the region of Brejal, Petropolis municipality, one of the largest agricultural production areas in the State. In the years 2010 and 2011, twelve collection campaigns were carried out, where 60 water samples were obtained in the different stages of production (spring, irrigation, washing) and 36 of lettuces, including adult seedlings and lettuces. To evaluate the water quality, physical-chemical parameters and bacteriological indicators such as total coliforms and *Escherichia coli* were also quantified. For viral detection and quantification, all samples were concentrated by the negatively charged membrane adsorption-elution method with initial volumes of two liters (2 L) and 25 grams (g) of water and lettuce respectively and analyzed by the polymerase chain reaction quantitative (qPCR) using TaqMan™ system. Viruses were detected in 48.4% of the water samples (29/60) and in 44.5% (16/36) of lettuce samples, with concentrations varying from 7.29×10^1 to 4.72×10^6 gc L⁻¹ and from 4.29×10^1 to 5.56×10^4 gc 25 g⁻¹, respectively. HAdV were detected at all water and lettuce collection points (11.5% - 11/96), although RVA were the most prevalent with 14.6% (14/96) of detection, followed by EV ([12.5%] 12/96) and NoV ([8.3%] 8/96). Positive samples for HAdV were processed for virus isolation in culture of A549, HEK 293 and HEp-2 cells and those positive for EV in RD, MRC-5 and HEp-2c cells. Although the infectivity of viruses detected has not been demonstrated, levels of concentration in the order of 10⁴ in lettuces ready for commercialization, the presence of at least two different viruses in all the points studied, as well as the detection in waters characterized as adequate by the bacteriological parameters, demonstrate the importance of the use of viruses as markers of environmental contamination in productive chains of vegetables, in order to ensure the quality of these foods. *Escherichia coli* values higher than those established by legislation corroborated the poor water quality used for irrigation of seedlings.

Key words: Irrigation water. Food. Enteric viruses. Lettuce.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Notificações de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil no período de 2007-2016 | 21 |
| Figura 2 – Número de surtos de gastroenterite de origem alimentar identificados no Brasil no período de 2007-2016 de acordo com o agente etiológico envolvido | 21 |
| Figura 3 – Rotas de transmissão de vírus entéricos..... | 23 |
| Figura 4 – Partícula de norovírus – 27 a 30 nm de diâmetro..... | 25 |
| Figura 5 – Partícula de rotavírus - aproximadamente 100nm de diâmetro, capsídeo externo (VP7 e VP4), capsídeo interno (VP6) e core (VP1 a VP3)..... | 27 |
| Figura 6 – Partículas de adenovírus - aproximadamente de 70 a 100 nm de diâmetro..... | 28 |
| Figura 7 – Partícula de enterovírus – 25 a 30 nm de diâmetro. Vírion consiste de capsídeo com subunidades constituídas, cada uma, de quatro proteínas (VP1-VP4). Genoma formado por uma única fita de RNA | 29 |
| Figura 8 – Mapa geográfico do Brejal, município de Petrópolis, RJ - produção orgânica..... | 32 |
| Figura 9 – Fluxograma da produção de alface orgânica | 40 |
| Figura 10 – Sistema de Filtração Millipore®: bomba de vácuo, recipiente de pressão e suporte para as membranas..... | 42 |
| Figura 11 – Diagrama de fluxo para recuperação, concentração e detecção de vírus em amostras de água..... | 44 |
| Figura 12 – Diagrama de fluxo para recuperação, concentração e detecção de vírus em amostras de alface..... | 45 |
| Figura 13 – Gráfico da percentagem de disseminação dos NoV GII, RVA, HAdV e EV em matrizes de água e alface..... | 51 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Vírus entéricos humanos de transmissão hídrica e alimentar.....22
- Tabela 2** – Vírus analisados, sequências dos iniciadores e sondas, regiões do genoma e referências das reações de cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).....48
- Tabela 3** – Detecção e quantificação de rotavírus A (RVA), norovírus genogrupo II (NoV GII), adenovírus humano (HAdV) e enterovírus (EV) em amostras de água de acordo com locais de coleta (n = 12 por local)52
- Tabela 4** – Detecção de rotavírus espécie A (RVA), norovírus genogrupo II (NoV GII), adenovírus humano (HAdV) e enterovírus (EV) em amostras de alfaces (n=12)53
- Tabela 5** – Valores médios microbiológicos e físico-químicos de 12 amostras de água por ponto de coleta55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| A.C. | Antes de Cristo |
| ACMSF | Comitê Consultivo para a Segurança Microbiológica dos Alimentos (do inglês <i>Advisory Committee on Microbiological Food Safety</i>) |
| AFP | Paralisia Flácida Aguda (do inglês <i>Acute Flaccid Paralysis</i>) |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| BPA | Boas Práticas Agrícolas |
| BPF | Boas Práticas de Fabricação |
| CDC | Centro para Controle e Prevenção de Doenças (do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>) |
| cDNA | DNA complementar (do inglês <i>complementary DNA</i>) |
| CEN | Comitê Europeu para a Normalização |
| cg | Cópia genômica |
| CI | Controle interno |
| CIP | Controle interno de processo |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| cPCR | PCR convencional (do inglês <i>conventional PCR</i>) |
| cPVDV | Poliovírus circulante derivado da vacina (do inglês <i>circulating vaccine-derived polioviruses (cVDPVs)</i>) |
| Ct | Limiar do ciclo (do inglês <i>Cycle Threshold</i>) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| DNAfd | DNA fita dupla |
| DTA | Doenças transmitidas por alimentos |
| EFSA | Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (do inglês <i>European Food Safety Authority</i>) |
| EPA | Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>) |
| EUA | Estados Unidos da América |
| EV | Enterovírus |

| | |
|----------------|--|
| FAO | Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (do inglês <i>Food and Agriculture Organization</i>) |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| GA | Gastroenterite |
| GPEI | Plano Estratégico de Iniciativa Global de Erradicação da Poliomielite (do inglês <i>Global Polio Eradication Initiative</i>) |
| HACCP | Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (do inglês <i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>) |
| HAdV | Adenovírus humano (do inglês <i>human adenovirus</i>) |
| HAV | Vírus da hepatite A (do inglês <i>Hepatitis A virus</i>) |
| IID | Doença intestinal infecciosa (do inglês <i>Infectious Intestinal Disease</i>) |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| ISO | Organização Internacional para Padronização (do inglês <i>International Organization for Standardization</i>) |
| ISO/TS | ISO/Especificação técnica (do inglês <i>ISO/Technical Specification</i>) |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MS | Ministério da Saúde |
| Na Cl | Cloreto de sódio |
| NCBI | Centro Nacional de Informação sobre Biotecnologia (do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>) |
| NMP | Número mais provável |
| NoV | Norovírus |
| NSP | Proteínas não estruturais (do inglês <i>non-structural proteins</i>) |
| OECD | Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>) |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ONU | Organização das Nações Unidas |

| | |
|---------------|--|
| OPAS | Organização Pan-Americana da Saúde |
| ORF | Sequência da região aberta de leitura (do inglês <i>Open Read Frame</i>) |
| PCR | Reação em cadeia pela polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PEG | Polietileno glicol |
| PNI | Programa Nacional de Imunização |
| PV | Poliovírus |
| PVS | Poliovírus selvagem |
| qPCR | PCR quantitativo (do inglês <i>quantitative PCR</i>) |
| RCWG | Grupo de Trabalho de Classificação de Rotavírus (do inglês <i>Rotavirus Classification Working Group</i>) |
| RDC | Resolução da diretoria colegiada |
| RIMSA | Reunião Interamericana de Saúde Ambiental de Nível Ministerial |
| RNA | Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>) |
| RNAfd | RNA de fita dupla |
| RPRD | RNA polimerase RNA dependente |
| RT-PCR | Reação em cadeia pela polimerase precedida por transcriptase reversa (do inglês <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>) |
| RV | Rotavírus |
| RVA | Rotavírus A |
| SINAN | Sistema de Informação de Agravos de Notificação |
| UNICEF | Fundo das Nações Unidas para a Infância (do inglês <i>United Nations Children's Fund</i>) |
| UTR | Região não traduzida (do inglês <i>untranslated region</i>) |
| UV | Ultravioleta |
| VE-DTA | Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos |
| VIP | Vacina Inativada de Poliovírus |
| VOP | Vacina Oral de Poliovírus |
| VP | Proteínas estruturais (do inglês <i>viral protein</i>) |

WHO

Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

WPV

Poliovírus Selvagem (do inglês *Wild Poliovirus*)

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 177 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 18 |
| 2.1 Água de irrigação e alimentos | 18 |
| 2.2 Doenças transmitidas por alimentos | 19 |
| 2.3 Vírus transmitidos por água e alimentos | 21 |
| 2.3.1 Norovírus | 244 |
| 2.3.2 Rotavírus (RV) | 255 |
| 2.3.3 Adenovírus humanos | 277 |
| 2.3.4 Enterovírus | 29 |
| 2.4 Indicadores de contaminação e legislação | 311 |
| 2.4.1 Metodologia para recuperação viral a partir de água e alimentos | 344 |
| 3 RELEVÂNCIA | 366 |
| 4 OBJETIVOS | 38 |
| 4.1 Objetivo geral | 38 |
| 4.2 Objetivos específicos | 38 |
| 5 ASPECTOS ÉTICOS | 39 |
| 6 METODOLOGIA | 400 |
| 6.1 Local do estudo e coleta das amostras | 400 |
| 6.2 Vírus | 433 |
| 6.3 Método de concentração viral | 433 |
| 6.3.1 Água | 433 |
| 6.3.2 Alfaces | 444 |
| 6.4 Extração de ácido nucleico | 455 |
| 6.5 Preparo de dna complementar (cDNA) | 455 |
| 6.6 Detecção e quantificação de vírus por PCR quantitativo | 4646 |
| 6.6.1 Estabelecimento de curvas padrão para Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa (qPCR) | 46 |
| 6.6.2 Qpcr | 46 |
| 6.7 Isolamento viral | 49 |
| 6.7.1 HAdV | 49 |
| 6.7.2 EV | 49 |
| 6.8 Parâmetros microbiológicos e físico-químicos | 500 |

| | |
|--|------------|
| 7 RESULTADOS | 511 |
| 8 DISCUSSÃO | 57 |
| 9 CONCLUSÕES | 622 |
| 10 PERSPECTIVAS | 633 |
| REFERÊNCIAS | 644 |
| ANEXOS | 855 |
| ANEXOS 1 Dissemination of gastroenteric viruses in the production of lettuce in developing countries: a public health concern | 855 |
| ANEXOS 2 Dissemination of enteroviruses in the production chain of organic lettuce in Rio de Janeiro, Brazil | 922 |

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), cerca de 2,4 bilhões de indivíduos carecem de instalações sanitárias adequadas, e quase um bilhão não têm acesso à água potável segura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015a). Neste contexto, doenças transmitidas por patógenos presentes na água acometem 250 milhões de indivíduos a cada ano, resultando em 10 a 20 milhões de óbitos em todo o mundo (WILKES et al, 2009; LIN; GANESH, 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a mortalidade infantil ocorre principalmente nos países em desenvolvimento por estar associada à falta de acesso à água potável, saneamento e higiene, assim como às más condições de saúde e nutrição sendo a diarreia a segunda maior causa entre crianças menores de cinco anos (LIU et al, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009, 2015a).

A Meta de Desenvolvimento do Milênio proposta pela Organização das Nações Unidas (ONU) previa a redução da mortalidade infantil em dois terços entre 1990 e 2015 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015a; LIU et al, 2016). Globalmente, esta taxa em menores de cinco anos, caiu de 91 mortes por mil nascidos vivos em 1990 para 43 em 2015 (queda de 53%). No Brasil esta queda foi 20% maior que a média mundial, conforme dados da OMS (ROSER, 2016), com redução de 60,8 óbitos por mil nascidos vivos em 1990 para 16,4 em 2015 (queda de 73%). No país, esta redução significativa, ocorreu principalmente devido à expansão da rede primária de saúde, ao uso generalizado da terapia de reidratação oral, a redução da desnutrição infantil e a condições mais favoráveis de saneamento associadas ao melhor acesso à água potável (ESCOBAR et al, 2015).

A presença de microrganismos em ecossistemas aquáticos se deve, principalmente, a descarga de esgotos domésticos sem tratamento, com conseqüente disseminação em matrizes utilizadas para consumo, recreação e irrigação de produtos alimentares, sendo o risco de transmissão de doenças influenciado pelo nível de contaminação, pela persistência dos agentes no ambiente e pela via de exposição (OKOH et al, 2010; PANDEY et al, 2014). Bactérias e protozoários em águas superficiais não contaminadas com esgoto humano devem ter vida relativamente curta, enquanto que vírus e os helmintos podem permanecer infecciosos por períodos mais longos variando de 20 dias a alguns meses no ambiente (STEELE; ODUMERU, 2004).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Água de irrigação e alimentos

Por mais de 100 anos, a irrigação e a fertilização de culturas alimentares, utilizando água contaminada com fezes, têm desempenhado um papel importante na transmissão de microrganismos entéricos, devido a transferência destes microrganismos para a superfície de alimentos que, em geral, são consumidos crus (GERBA; CHOI, 2006; BRITZ; SIGGE, 2012). Entretanto, a má higiene em todas as etapas da cadeia de produção destes alimentos; a falta de controles preventivos nas operações de transformação e preparação e a armazenagem inadequada, são fatores que também oferecem risco de contaminação em práticas agrícolas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008a).

Com foco na saúde pública e proteção ao consumidor, manuais como Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) descrevem procedimentos a serem aplicados, para evitar a contaminação de vegetais com patógenos microbianos (CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, 2014).

Em países desenvolvidos, a produção agrícola tem especial cuidado com a inocuidade e qualidade dos alimentos, bem como, a conscientização dos consumidores sobre questões de segurança alimentar (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2017). No entanto, em muitas partes do mundo, a agricultura ainda não atende a essas normas e, quando se trata de agricultura orgânica, é necessário maior atenção, especialmente em relação aos procedimentos de higiene na área de produção (CHANDER et al, 2011).

A agricultura orgânica, caracterizada pela não utilização de produtos químicos (agrotóxicos e pesticidas) na cadeia produtiva, é um sistema de manejo sustentável voltado à preservação ambiental, agrobiodiversidade e qualidade de vida humana (AKTAR et al, 2009; SEUFERT et al, 2012), no entanto, alguns autores mencionam o alto risco de contaminação por vírus, bactérias e fungos (REMBIALKOWSKA, 2007; MATTISON et al, 2010; DE QUADROS et al, 2014; MARTI; BARARDI, 2016). O ambiente úmido associado com adubos orgânicos, muitas vezes constituídos de fezes provenientes de diversos animais, favorece as contaminações, assim como a utilização, pelos produtores de hortaliças, de águas de irrigação provenientes de rios, córregos e lagos adjacentes às hortas, bombeadas ou levadas por meio de canais de irrigação sem nenhum tratamento prévio (SCHERER et al, 2016). Entre

os agentes patogênicos microbianos associados ao consumo de vegetais crus estão incluídos *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Shigella spp.* e vírus entéricos (CHEONG et al, 2009; HASSANAIN et al, 2013; BRASIL, 2016).

2.2 Doenças transmitidas por alimentos

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são geralmente caracterizadas por anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados contendo bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados (BRASIL, 2004).

As DTA são conhecidas desde épocas muito remotas. Em 2000 A.C., Moisés determinou algumas leis sobre os alimentos que se poderiam ingerir e outros que se deveriam rejeitar, bem como os métodos de preparação e a importância da limpeza das mãos antes da alimentação (BRASIL, 2005a). Desde esta época que os alimentos contaminados eram remetidos ao estado de putrefação. Hoje, sabe-se que os alimentos contendo microrganismos patogênicos podem ter aspecto, odor e sabor normais (BRASIL, 2005a).

Relatos da história antiga atribuíam às intoxicações alimentares, produtos químicos ou venenosos, às vezes incorporados deliberadamente. Somente no século XIX, quando Louis Pasteur estabeleceu uma base científica para a relação direta entre deterioração de alimentos e atividade microbiana, os microrganismos responsáveis pelas DTA foram reconhecidos. Desde então, o número de agentes microbianos envolvidos em DTA aumentou de forma constante (National Research Council, 1985), assim como a ocorrência de casos.

Na tentativa de minimizar danos à saúde, autoridades do mundo inteiro vêm intensificando esforços para melhorar a segurança dos alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015). Diversas medidas vêm sendo estimuladas por recomendações e acordos internacionais, dos quais se destacam os subscritos pelo Brasil na VII Reunião Interamericana de Saúde Ambiental de Nível Ministerial (RIMSA) e na XXXV Reunião do Conselho Diretor da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS).

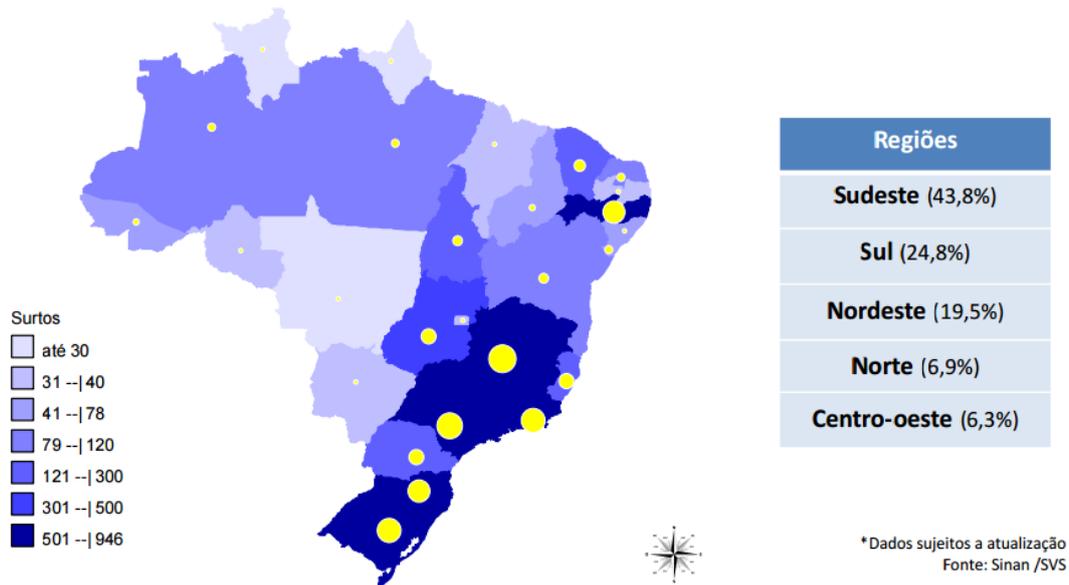
De acordo com dados do Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) cerca de 48 milhões de cidadãos (1 em cada 6 americanos) ficam doentes anualmente devido a DTA (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016) e segundo a *Food Drug Administration* aproximadamente 128 mil

peessoas são hospitalizadas e 3.000 morrem a cada ano (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015). O custo econômico anual estimado das DTA, considerando tratamento hospitalar, redução da produtividade, e despesas médicas, está na faixa de 10 a 83 bilhões de dólares americanos de acordo com o Departamento de Agricultura dos EUA (STOECKEL, 2009; NYACHUBA, 2010; MCLINDEN et al, 2014).

No Brasil, medidas sanitárias para a prevenção e controle das DTA apoiam-se em legislações específicas do Ministério da Saúde (MS), da Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que podem ser complementadas com os códigos sanitários de níveis estadual e municipal, no que concerne à vigilância sanitária do ambiente, produção de bens e prestação de serviços de interesse da saúde pública (SINAN, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

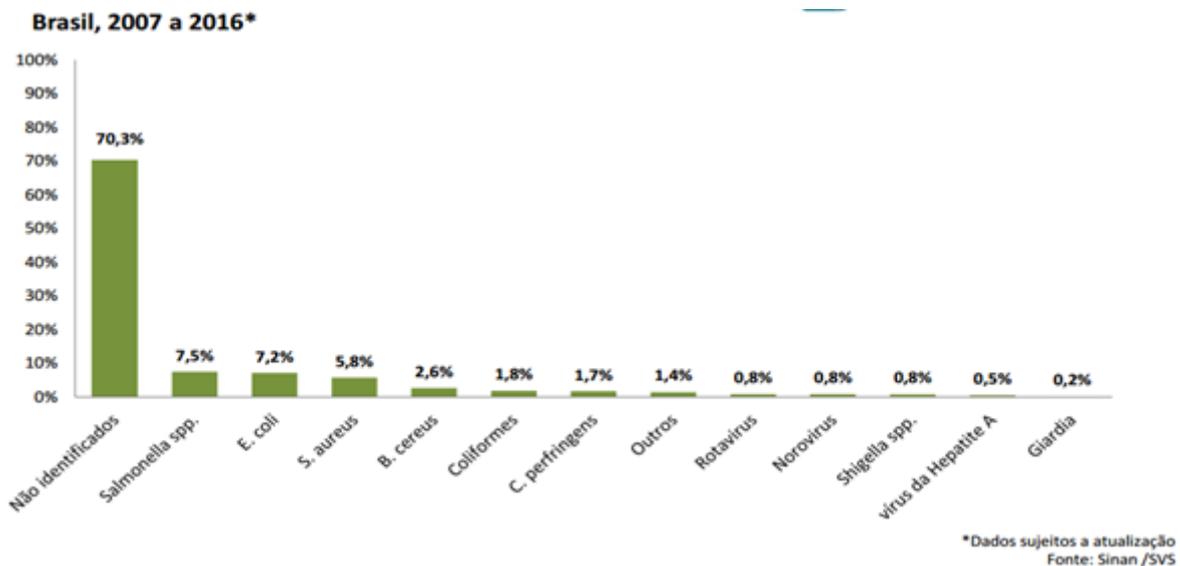
O Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (VE) das DTA, presente no Brasil desde 1999, tem por objetivo reduzir a incidência das DTA e subsidiar as medidas de prevenção e controle contribuindo para melhoria da qualidade de vida da população. Até 2010, pouco se conhecia da real magnitude do problema, pois os casos e surtos de DTA não eram notificados (BRASIL, 2010). Atualmente, a VE-DTA é responsável por receber as notificações, principalmente dos profissionais da área da saúde. No período de 2007-2016, foram notificados 6.632 surtos de DTA ao Ministério da Saúde (MS), com 118.104 doentes e 109 óbitos. O sudeste foi a região que notificou maior número de surtos (43,8%), seguida das regiões sul (24,8%) e nordeste (19,5%) (Figura 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Entretanto, chama a atenção o grande percentual de surtos (70,3%) sem definição do agente etiológico e o pequeno percentual de surtos associados a vírus (Figura 2), sendo os alimentos, incluindo a água, importantes fontes de transmissão viral em humanos (KOOPMANS et al, 2002; KOOPMANS; DUIZER, 2004). Os vírus são contaminantes que não alteram as características sensoriais dos produtos (RODRIGUES et al, 2004; DA SILVA; LAVINAS, 2010), sendo responsáveis por surtos associados a uma grande variedade de alimentos que são relatados em todo o mundo, a cada ano (VERHOEF et al, 2008, 2011; KOOPMANS, 2012).

Figura 1 - Notificações de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil no período de 2007-2016



Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Figura 2 - Percentual de surtos de origem alimentar identificados no Brasil no período de 2007-2016 de acordo com o agente etiológico envolvido



Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

2.3 Vírus transmitidos por água e alimentos

Uma grande variedade de vírus entéricos humanos pode causar doenças gastrointestinais, hepáticas e do sistema nervoso central (DE MORAES et al, 2007) (Tabela1).

Tabela 1 - Vírus entéricos humanos de transmissão hídrica e alimentar

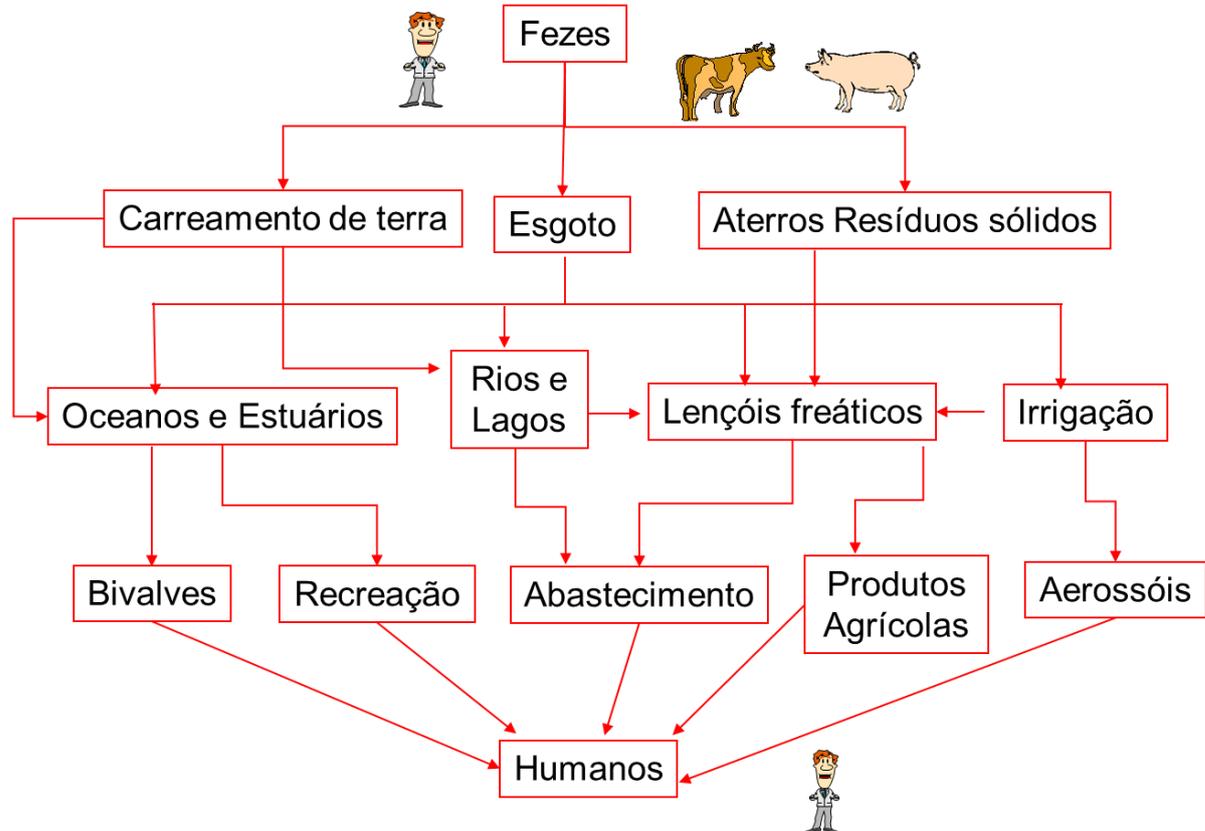
| Gênero (genoma) | Nome | Doença associada |
|--|------------------------|---|
| <i>Enterovírus</i> (ssRNA) | Poliovírus | Paralisia, meningite, febre |
| | Coxsackie A, B vírus | Meningite, febre, doença respiratória, doença da mão-pé-boca, miocardite, anomalias cardíacas, diabetes |
| | Echovírus | Meningite, febre, doença respiratória, gastroenterite |
| <i>Hepatovírus</i> (ssRNA) | Hepatite A vírus | Hepatite |
| <i>Reovírus</i> (segmentado dsRNA) | Reovírus humano | Desconhecido |
| <i>Rotavírus</i> (segmentado dsRNA) | Rotavírus humano | Gastroenterite |
| <i>Norovírus</i> (ssRNA) | Norovírus | Gastroenterite |
| <i>Sapovírus</i> (ssRNA) | Sapovírus | Gastroenterite |
| <i>Hepevírus</i> (ssRNA) | Hepatite E vírus | Hepatite |
| <i>Mamastrovírus</i> (ssRNA) | Astrovírus humano | Gastroenterite |
| <i>Coronavírus</i> (ssRNA) | Coronavírus humano | Gastroenterite, doença respiratória, SARS |
| <i>Orthomyxovírus</i> (segmentado ssRNA) | Influenza vírus | Influenza, doença respiratória |
| <i>Parvovírus</i> (ssDNA) | Parvovírus | Gastroenterite |
| <i>Mastadenovírus</i> (dsDNA) | Adenovírus Humano | Gastroenterite, doença respiratória, conjuntivite |
| <i>Poliomavírus</i> (dsDNA) | Poliomavírus | Leucoencefalopatia progressiva multifocal, doença de trato urinário |
| <i>Circovírus</i> (ssDNA) | TT (Torque Teno) vírus | Hepatite, desconhecido |

Fonte: (BOSCH et al, 2008).

Os vírus entéricos representam todos os vírus que infectam o trato digestivo, que são excretados nas fezes e transmitidos pela via fecal-oral (BOSCH et al, 2008). São vírus de simetria icosaédrica, não envelopados, patogênicos e resistentes às condições desfavoráveis do meio ambiente onde são disseminados (Figura 3). Atualmente, são descritos como importantes contaminantes ambientais, sendo identificados em diversas matrizes aquáticas, incluindo águas superficiais utilizadas para irrigação (METCALF et al, 1995;

GELDERBLOM, 1996; KOOPMANS et al, 2002; FONG; LIPP, 2005; DE GIGLIO et al, 2017).

Figura 3 - Rotas de transmissão de vírus entéricos



Fonte: (Modificado de Metcalf et al, 1995).

Os vírus mais frequentemente envolvidos em infecções originadas por alimentos contaminados são os norovirus (NoV) e os vírus da hepatite A (HAV) que resultam em surtos maiores e prolongados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008a, b). As estimativas da proporção de doenças virais atribuídas aos alimentos estão na faixa de cerca de 5% para HAV a 12 - 47% para NoV. Isso se traduz em números estimados de casos de DTA virais em países desenvolvidos, variando de aproximadamente de 13.000 a 30.000 por milhão de pessoas. Nestes dados não estão compilados os países em desenvolvimento, mas relatos da literatura demonstram que as DTA de origem viral ocorrem em todo o mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008; RODRIGUEZ-LAZARO et al, 2012).

As DTA continuam a ser uma causa significativa de doenças, sendo difícil estimar o verdadeiro ônus. O desafio das DTA depende de uma combinação de diagnóstico laboratorial, investigação epidemiológica, tipagem de patógenos e investigações de rastreamento de

alimentos. Todas essas atividades precisam ser alinhadas para a detecção, e os desafios específicos diferem para os diferentes vírus. A epidemiologia desses vírus é destacada pela circulação global de patógenos, com poucas evidências de diferenças geográficas (KOOPMANS; DUIZER, 2004; FONG; LIPP, 2005; SCALLAN et al, 2011; JAHAN, 2012; KOOPMANS, 2012; KIRK et al, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015b; ITURRIZA-GOMARA; O'BRIEN, 2016).

No Brasil, a primeira detecção de NoV em alimentos naturalmente contaminados aconteceu em 2010, quando ocorreu um surto de gastroenterite aguda em um navio de cruzeiro (*Vision of the Seas* da *Royal Caribbean International*). Dois genogrupos de NoV, GII e GI, foram identificados em matrizes de alimentos distintas (queijo azul, molho indiano, manteiga, sopa e molho branco), sugerindo que não era uma fonte comum de contaminação por NoV. Muitos surtos resultam da contaminação por NoV presentes nas fezes, durante a preparação ou pelas mãos dos manipuladores de alimentos. Isso geralmente resulta em contaminação de mais de um item alimentar (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011; MORILLO et al, 2012).

Em 2014, a bordo do *Anthem of the Seas* de *Royal Caribbean*, também no Brasil, duas amostras fecais e uma amostra de mousse de laranja foram genotipadas com sucesso como NoV GII.Pe (ORF 1), revelando 98,0-98,8% de identidade entre elas e compartilhando filogeneticamente distintos grupos (MORILLO et al, 2017).

Apesar da importância dos NoV e HAV em surtos alimentares, vários estudos têm demonstrado a contaminação por outros vírus em alimentos, como os pesquisados neste trabalho, embora a informação sistemática sobre o papel dos alimentos na transmissão desses vírus seja limitada (SHUKLA et al, 2018). Os NoV, RVA, HAdV e EV serão objeto deste estudo.

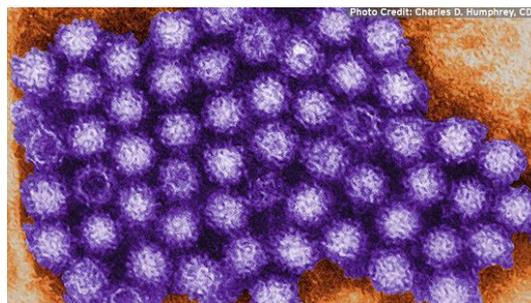
2.3.1 Norovírus

Os norovírus (NoV) pertencem à família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*. Possuem genoma composto de um RNA fita simples (RNAs) com polaridade positiva de aproximadamente 7.700 nucleotídeos (nt). Medem entre 27 e 30 nm de diâmetro e apresentam 32 depressões em forma de taça na sua superfície (PATEL et al, 2009). O genoma é organizado em três fases abertas de leitura (ORFs), região não traduzida (UTR) nas extremidades 5' e 3' e cauda poli(A) na extremidade 3'. A ORF1 codifica uma poliproteína que, após a clivagem proteolítica, dá origem às proteínas não estruturais, incluindo a RNA

polimerase RNA dependente (RpRd). As ORFs 2 e 3, localizadas na extremidade 3' do genoma codificam para as proteínas estruturais do capsídeo denominadas de VP1 (proteína principal) e VP2, respectivamente. Na extremidade 5' do RNA genômico e subgenômico se encontra a proteína VPg unida covalentemente (HARDY, 2005) (Figura 4).

Os NoV podem ser classificados em sete diferentes genogrupos (GI a GVII), dos quais GI, GII e GIV são detectados em humanos (ZHENG et al, 2006; VINJÉ, 2015). O GII.4 têm sido o genoma mais prevalente em todo o mundo, com grande impacto causado pelo aparecimento de novas variantes (PATEL et al, 2009; SIEBENGA et al, 2009; DE ANDRADE et al, 2014). Diversos estudos mostram uma correlação entre o aparecimento de variantes (GII.4) e o aumento do número de surtos (PANG et al, 2010; MARSHALL; BRUGGINK, 2011; DEBBINK et al, 2012; VAN BEEK et al, 2013). Desde meados da década de 90, as novas variantes de GII.4 foram responsáveis por 62% a 80% dos surtos provocados por vírus entéricos, em nível mundial (EDEN et al, 2013). Novas cepas de norovírus GII.4 emergem a cada dois a quatro anos. Mais recentemente, durante o inverno de 2014-2015, uma nova variante do norovírus, o genótipo 17, conhecida como Kawasaki 308-like 2014 (GII.17 Kawasaki), surgiu e se tornou o genótipo predominante em Hong Kong e na China (CHAN et al, 2015, 2017). Esta variante também foi detectada esporadicamente fora da Ásia em países como Itália, Romênia e Estados Unidos (MEDICI et al, 2015; DINU et al, 2016; PARRA; GREEN, 2015).

Figura 4 - Partícula de norovírus – 27 a 30 nm de diâmetro



Fonte: (adaptado de Morillo; Tavares Timenetsky, 2011).

2.3.2 Rotavírus (RV)

Descritos pela primeira vez em 1973, em Melbourne, Austrália, os RV pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavírus* (BISHOP et al, 1973; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2017). Medem aproximadamente 100 nm

de diâmetro e são compostos por 11 segmentos de RNA fita dupla (RNAfd). Os segmentos genômicos variam em tamanho de 667 a 3.302 pares de bases (pb) e o genoma total contém 18.522 pb. O vírion possui três camadas proteicas: capsídeo externo, capsídeo interno e core, onde se situa o RNAfd (ESTES; KAPIKIAN, 2007; ESTES; GREENBERG, 2013) (Figura 5).

Os RV são classificados em sete grupos de A-G. Os do grupo A (RVA), são os mais importantes epidemiologicamente e os casos de gastroenterite resultam em até 500.000 óbitos anualmente, principalmente em países em desenvolvimento (PARASHAR et al, 2009; CHEN et al, 2012; GLASS et al, 2012). A faixa etária de até 24 meses é a mais vulnerável e associada aos episódios diarreicos graves (DESSELBERGER; GRAY, 2011; TATE et al, 2016). Em 2008, o vírus foi associado com a morte de 453.000 crianças com menos de 5 anos de idade em todo o mundo, com a maioria dos casos relatados na África e Ásia (DULGHEROFF et al, 2016).

O genoma viral codifica seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1-NSP6). As proteínas de capsídeo externas, VP7 e VP4 estão envolvidas na replicação viral em células hospedeiras, e cada uma pode independentemente induzir a produção de anticorpos neutralizantes. O capsídeo interno é formado pela proteína VP6, que é a mais abundante e corresponde a 51% da porção proteica da partícula viral (ESTES; KAPIKIAN, 2007; ESTES; GREENBERG, 2013). Os sorotipos definidos por VP7 e VP4, assim como seus genes codificadores, são utilizados para classificar os rotavírus em genótipos e ou sorotipos G e P, respectivamente. Como VP7 é uma glicoproteína, a especificidade por ela conferida é denominada sorotipo G e, de maneira análoga, o fato de VP4 ser uma proteína sensível a uma protease faz com que a especificidade por ela determinada seja denominada sorotipo P. Sorotipos ou genótipos G e P são designados por algarismos arábicos. A denominação de sorotipo/genótipo obedece, portanto, a um sistema binário do tipo GxP[y], podendo haver diversas combinações entre as especificidades G e P. Um sistema de classificação padrão para RV está sendo proposto. À medida que mais genomas de RV humanos e animais sejam completamente sequenciados, novos genótipos para cada um dos onze segmentos de genes podem ser identificados como: Grupo RV / espécie de origem / país de identificação / nome comum / ano de identificação / tipo G e P (MATTHIJNSSENS et al, 2008, 2011).

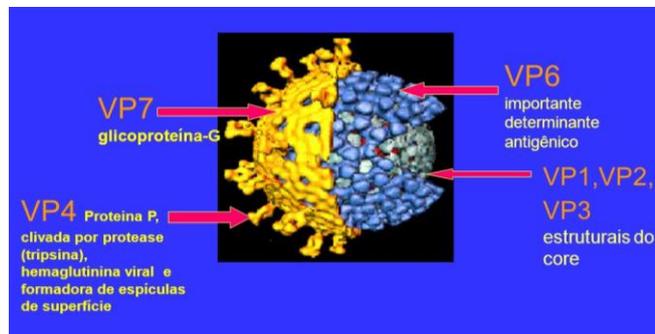
Os RVA pertencentes aos genótipos G1, G2, G3, G4, G9 e G12, combinados com os genótipos P [4] ou P [8], são mais prevalentes entre as cepas que causam a infecção em humanos (DULGHEROFF et al, 2016).

Até 2014, mais de 70 países já tinham introduzido a vacina contra o RV em seus programas de imunização de rotina para crianças (TATE et al, 2016).

Uma análise do impacto das vacinas contra RV em países elegíveis pela Aliança Global para Vacinas e Imunização (GAVI), considerou que a vacinação evitaria 2,46 milhões de mortes entre crianças entre 2011 e 2030, com reduções anuais de 180.000 mortes entre crianças na cobertura máxima da vacina (BUSTREO et al, 2015).

Em março 2006, por recomendação da OMS, o Ministério da Saúde (MS) do Brasil incluiu a vacina atenuada de rotavírus G1P[8] (RotarixTM, GlaxoSmithKline, Rixensart, Bélgica) no calendário oficial de vacinações do MS, pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) (CARVALHO-COSTA et al, 2011). No Brasil, em 2016, foram aplicadas 2.709.804 doses de vacina contra rotavírus com cobertura vacinal de 91,0% (primeira dose) e 95,3% (segunda dose) em crianças até quatro meses de idade (BRASIL, 2017). Brasil, México e Panamá, documentaram reduções substanciais de 22% a 50% na mortalidade por diarreia em crianças com idade <5 anos, após a introdução da vacina (TATE et al, 2016).

Figura 5 - Partícula de rotavírus - aproximadamente 100nm de diâmetro, capsídeo externo (VP7 e VP4), capsídeo interno (VP6) e core (VP1 a VP3).



Fonte: (ESTES et al, 2001).

2.3.3 Adenovírus humanos

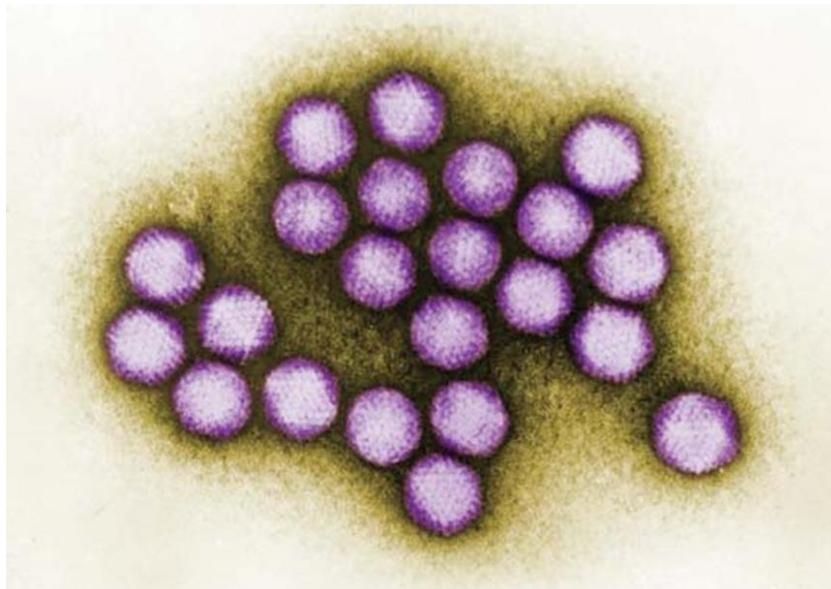
Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem à família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*. Atualmente são descritos 57 sorotipos de HAdV (HAdV1-57), subdivididos em 7 espécies (A – G) de acordo com suas propriedades físico-químicas, imunológicas e bioquímicas. Adenovirus F, sorotipos 40 e 41 e adenovírus G, sorotipo 52 causam gastroenterite aguda, principalmente em crianças (DE JONG; OSTERHAUS, 2008; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2017).

Os HAdV apresentam um DNA fita dupla (DNAfd) como material genético. Esses vírus possuem aproximadamente 70-100nm de diâmetro e seu capsídeo é composto por 252 capsômeros: 240 hexons e 12 pentons – e estruturas chamadas fibras que se projetam de cada penton para o exterior (BERK, 2007). Os hexons são formados por proteínas que participam da montagem e conferem estabilidade à partícula viral (Figura 6). As proteínas do penton têm a função de penetração celular e as fibras são as responsáveis pela ligação das partículas virais ao receptor celular. O core viral é formado por pelo menos oito proteínas, tendo a função de manter a integridade do genoma e participar de atividades enzimáticas (BERK, 2007).

A importância dos HAdV, seu desempenho na epidemiologia, assim como, o risco da presença destes patógenos na água são reconhecidos em todo o mundo. Sua investigação tem sido relevante na avaliação da qualidade da água por apresentarem maior estabilidade em vários tipos de ambientes (água de esgoto, de mar e de abastecimento), do que outros vírus entéricos (GERBA et al, 2002; VIEIRA et al, 2012).

Os HAdV são, atualmente, os vírus DNA mais bem caracterizados (HARAMOTO et al, 2010). Diversos estudos realizados em diferentes regiões do mundo têm utilizado técnicas moleculares para detecção do genoma dos HAdV, em amostras ambientais incluindo: água de piscina, águas superficiais, águas residuárias, águas de rio e moluscos bivalves (PINA et al, 1998; CHAPRON et al, 2000; JIANG et al, 2001; BOFILL-MAS et al, 2006; CALGUA et al, 2008; KATAYAMA et al, 2008; ALBINANA-GIMENEZ et al, 2009; HAMZA et al, 2009; FONG et al, 2010; HARAMOTO et al, 2010; SCHLINDWEIN et al, 2010).

Figura 6 - Partículas do Adenovírus – aproximadamente de 70 a 100 nm de diâmetro.



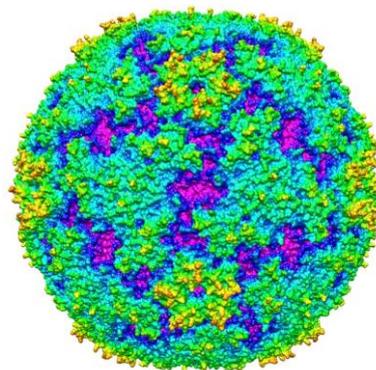
Fonte: (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

2.3.4 Enterovírus

Os enterovírus (EV) estão associados a várias patologias em humanos e animais mamíferos. Com base em sua patogênese, os EV foram originalmente classificados em quatro grupos: o poliovírus (PV), o vírus coxsackie A (CA), o vírus coxsackie B (CB) e o vírus entérico citopático órfão humano (echovírus), mas posteriormente foram observadas sobreposições significativas nas propriedades biológicas dos vírus nos diferentes grupos. Atualmente, o gênero *Enterovirus*, classificado na família *Picornaviridae*, é composto por 15 espécies, incluindo *Enterovirus A-J* e *Rhinovirus A-C*, das quais, *Enterovirus A, B, C, D* e *Rhinovirus A, B, C* infectam seres humanos (Disponível em: <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>. Acessado em 24 mar. 2018; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2017).

São vírus RNA de fita simples (RNAfs) e possuem de 25 a 30 nm de diâmetro (Figura 7). O vírion consiste de capsídeo com subunidades, constituídas, cada uma, de quatro proteínas (VP1–VP4) (CIFUENTE et al, 2013).

Figura 7 - Partícula de enterovírus – aproximadamente de 25 a 30 nm de diâmetro.



Fonte: (CIFUENTE et al, 2013).

Os EV infectam milhões de pessoas em todo o mundo a cada ano, e muitas vezes são encontrados nas secreções respiratórias e fezes de uma pessoa infectada. A infecção pode resultar em uma grande variedade de sintomas que vão desde uma doença leve respiratória, doença da mão, pé e boca, conjuntivite hemorrágica aguda, meningite asséptica, miocardite e paralisia flácida aguda (poliomielite). A poliomielite pode ser causada pelos três sorotipos de poliovírus (PVs) (PV1, PV2 e PV3) (Disponível em: <http://virology-online.com/viruses/Enteroviruses.htm>. Acessado em 18 jul 2017; PALLANSCH et al, 2013).

A poliomielite é uma doença em processo de erradicação e globalmente têm sido empreendidos esforços para alcançar a meta de um mundo livre da doença (GLOBAL POLIO ERADICATION INICIATIVE, 2016).

O Plano Estratégico de Iniciativa Global de Erradicação da Poliomielite (GPEI) e o Plano Estratégico *Endgame* (Plano *Endgame*) visam que a poliomielite seja a segunda doença humana a ser erradicada do mundo. Na época da fundação do GPEI em 1988, a poliomielite era endêmica em mais de 125 países e acometiam 350 mil crianças a cada ano. Desde então, o GPEI supervisionou uma redução de 99% em casos anuais de poliomielite, com apenas 22 casos de poliovírus selvagem (WPV) relatados em 2017, em apenas dois países (Paquistão e Afeganistão) (www.polioeradication.org; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Na Síria, 15 novos casos de circulação de poliovírus derivado da vacina tipo 2 (cPVDV2) foram relatados na segunda quinzena de junho de 2017, elevando o número total de casos cPVDV2 no país para 17. Todos os casos tiveram início da paralisia entre 3 de março e 23 de maio (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

No Brasil, o bem-sucedido Programa Nacional de Imunizações (PNI), em 1973, criou condições para uma drástica redução da morbimortalidade por doenças passíveis de prevenção por vacinação, destacando-se a eliminação da poliomielite em 1989 (BRASIL, 2013; WALDMAN; SATO, 2016).

Devido a ampla circulação do vírus vacinal na comunidade e a eliminação da poliomielite selvagem em mais de 99% dos países do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015c), há uma grande preocupação com o controle e monitoramento do meio ambiente.

A vigilância ambiental dos poliovírus tem sido utilizada como uma ferramenta suplementar no monitoramento da circulação de PVs selvagens e / ou de poliovírus derivados da vacina (PVDV), em amostras ambientais supostamente contaminadas por fezes humanas, mesmo na ausência de casos relatados de paralisia flácida aguda (AFP) (HOVI, 2006; HOVI et al, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003, 2016).

Embora o Brasil tenha mantido altas taxas de cobertura da VOP (>95%) (BRASIL, 2013), a não ocorrência de poliomielite causada por poliovírus selvagens não é suficiente para rejeitar o risco de reintrodução de poliovírus de regiões endêmicas. Portanto, a vigilância ambiental dos PVs é essencial para detectar e monitorar a circulação de PVs selvagens e / ou PVDVs, mesmo na ausência de casos notificados de AFP (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003, 2016).

2.4 Indicadores de contaminação de águas e alimentos e legislação

A segurança alimentar é reconhecida como uma função essencial de saúde pública pelos estados membros da OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015b).

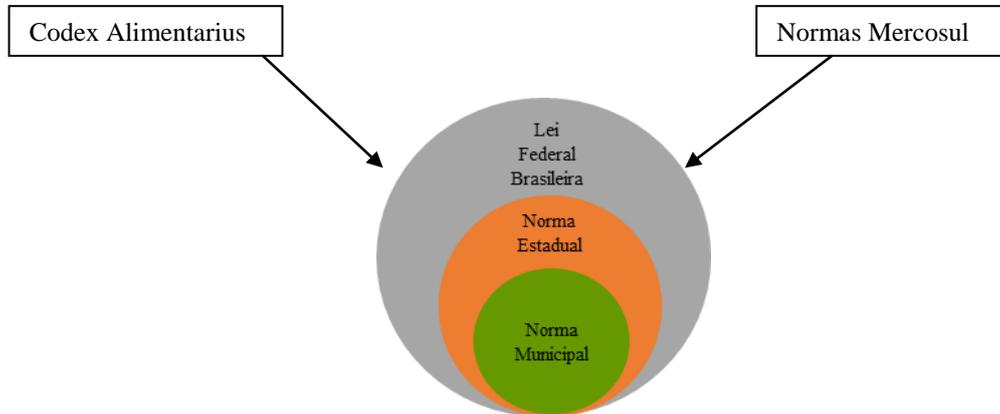
A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) é uma agência internacional, especializada no Sistema ONU, que trabalha no combate à fome e à pobreza por meio da melhoria da segurança alimentar e do desenvolvimento agrícola. Desde a sua fundação, 16 de outubro de 1945, a FAO tem dado atenção especial ao desenvolvimento das áreas rurais, onde vivem 70% das populações de baixa renda. Entre diversas ações no Brasil, a FAO apoia o Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar – PRONAF, em parceria com o Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2016a. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/agencia/fao/>. Acessado em 11 maio 2018).

O Programa Conjunto de Padrões Alimentares da FAO/OMS, estabelecido em 1963, tem a Comissão do *Codex Alimentarius* como seu principal órgão. Essa comissão é responsável pelo estabelecimento de normas, diretrizes e códigos de práticas internacionais sobre alimentos, que devem ser usados como referência para a qualidade e segurança dos alimentos, assegurando um comércio justo entre os países (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2016b).

A legislação mundial para o controle microbiológico em alimentos é estabelecida pelo *Codex Alimentarius* que trata de padrões e regulamentos diferenciados para cada alimento, principalmente em relação ao nível de contaminação microbiológica permitido (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O Brasil, como membro da Comissão do *Codex Alimentarius*, implementou regulamentações federais e regionais que incluem programas de Boas Práticas de Fabricação (GMP), procedimentos operacionais padrão (SOP) e sistema de gestão de segurança alimentar dos pontos críticos de controle de análise de perigos (HACCP do inglês *Hazard Analysis Critical Control Points*) para atender às diretrizes do Códex e diretrizes da OMS (BAS et al, 2006; SANTANA et al, 2009; TONDO et al, 2015; CAMINO FELTES et al, 2017). As regulamentações no país também estão de acordo com as diretrizes do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) (Figura 8). O principal bloco comercial da América do Sul tem como objetivo integrar a América Latina com base em uma abordagem política e estratégica (BRASIL, 2014).

Figura 8 - Principais diretrizes aplicadas no Brasil para o estabelecimento de regulamentação de alimentos destinados ao mercado interno e / ou internacional



Fonte: (CAMINO FELTES et al, 2017).

No Brasil, existe um sistema estabelecido de controle e regulamentação de segurança alimentar, que ocorre em nível federal e que pode ocorrer também em nível estadual e municipal. Os órgãos federais responsáveis pelo controle da qualidade e segurança alimentar no Brasil incluem o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Ministério da Saúde, por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (CAMINO FELTES et al, 2017).

Segundo a ONU, o Brasil pode se tornar o principal exportador de alimentos do mundo na próxima década, com destaque para o papel fundamental da agricultura familiar na produção de alimentos no país (Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/07/agricultura-familiar-produz-70-dos-alimentos-consumidos-por-brasileiro/>. Acessado em 18 jul 2017) (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2015). Com esta responsabilidade, o Brasil segue legislação similar a outros países que determinam padrões de qualidade da água para consumo e produção de alimentos, assim como dos alimentos prontos para consumo (por exemplo hortaliças), baseados em parâmetros físico-químicos e microbiológicos (BRASIL, 2001; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

No Brasil, a qualidade sanitária da água de irrigação é determinada pela concentração de indicadores microbiológicos clássicos como coliformes fecais (*Escherichia coli* e enterococos) utilizados para avaliar o nível de contaminação fecal (BRASIL, 2005b; FOX et

al, 2012). Em 2005, a resolução do Ministério da Saúde, CONAMA nº 357, classifica os corpos d'água e as diretrizes ambientais e estabelece as medidas básicas de prevenção de doenças. O art. 4, classe 1d, classifica as águas doces destinadas à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas, que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas. Esta legislação institui que não deverá ser excedido um limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais, de pelo menos seis amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. A contagem de *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro de coliformes termotolerantes, de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2005b).

As diferenças entre diretrizes de diversos países refletem a incerteza sobre o risco real de transmissão de doenças pela água. A água agrícola tem sido definida como um importante fator de risco na contaminação de cultivos folhosos comidos crus como saladas (ALLENDE; MONAGHAN, 2015). Dados sobre o risco de ocorrência de patógenos em águas de irrigação estão estabelecidos em diversas normas (EUROPEAN COMMISSION, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1989, 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), não havendo uma legislação global (ALLENDE; MONAGHAN, 2015). As diretrizes da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) para as águas superficiais recomendam menos de 1.000 coliformes fecais por 100 mL, incluindo água fluvial e para irrigação de hortaliças (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1986; TAMARU et al, 2012).

Atualmente, as legislações vigentes no mundo não incluem detecção viral tanto para água como para alimentos, apesar da variedade de pesquisas e discussões globais a respeito (KOOPMANS et al, 2002; FONG; LIPP, 2005; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Contudo, diversos estudos têm demonstrado que não existe correlação entre os indicadores bacterianos utilizados e os vírus entéricos, uma vez que estes últimos podem estar presentes quando os padrões bacterianos se encontram em níveis aceitáveis (TREE et al, 2003; VIEIRA et al, 2012; LIN; GANESH, 2013; MIAGOSTOVICH et al, 2014; DE GIGLIO et al, 2017). Alguns grupos de pesquisadores propõem bacteriófagos como indicadores de contaminação viral (LOVE; SOBSEY, 2007; HODGSON et al, 2017). Enquanto outros sugerem que HAdV seja eleito como indicador de contaminação viral por ser muito estável, abundante, resistente a tratamentos de água e prevalente no ambiente

(THOMPSON et al, 2003; MENA; GERBA, 2008; RODRIGUEZ-LAZARO et al, 2012; BOFILL-MAS et al, 2013; RAMES et al, 2016).

A detecção direta de vírus em alimentos sempre representou um desafio, uma vez que, em geral, estão presentes em água e alimentos em baixas concentrações, e necessitam uma concentração/eluição prévia. A extração viral da matriz e a remoção de substâncias tóxicas e/ou inibidoras são uma etapa crítica, principalmente porque estão associadas a metodologias de detecção molecular destes vírus. Deste modo, o desenvolvimento de metodologias mais sensíveis para detecção viral direta destas matrizes, a crescente exigência de controles microbiológicos e a utilização de indicadores microbiológicos foram responsáveis por avanços nesta área.

2.4.1 Metodologia para recuperação viral a partir de água e alimentos

A associação de metodologias de concentração viral com técnicas moleculares de detecção representou, nos anos 80, um avanço nos estudos de virologia ambiental, principalmente na detecção de vírus fastidiosos como RVA e aqueles que até o momento não dispõem de cultivo celular para replicação viral, como os NoV (SIDHU; TOZE, 2009).

A estratégia para detecção de vírus entéricos em amostras de água e alimentos consiste em três etapas principais: concentração dos vírus, extração viral e detecção molecular (METCALF et al, 1995; FONG; LIPP, 2005; BUTOT et al, 2007; HENNECHART-COLLETTE et al, 2017). Durante a concentração viral e purificação dos ácidos nucleicos, moléculas tais como, polissacarídeos, proteínas e ácidos graxos são removidos para evitar que haja inibição na extração de RNA ou DNA e na detecção molecular dos vírus (HENNECHART-COLLETTE et al, 2017). A concentração dos vírus é uma etapa crítica, pois resulta na concentração também de diferentes substâncias presentes na água e alimentos. As técnicas de concentração podem estar baseadas no tamanho da partícula viral e na massa molecular dos vírus, o que possibilita concentrá-los por métodos de ultrafiltração ou ultracentrifugação, respectivamente (FONG; LIPP, 2005). Outras metodologias baseadas nas propriedades físico-químicas da partícula viral que conferem a capacidade de adsorção em matrizes carregadas positiva ou negativamente (membranas, lã e fibra de vidro) com posterior eluição, têm sido descritas (KATAYAMA et al, 2002; HARAMOTO et al, 2007; GIRONES et al, 2010; HAMZA et al, 2011; RODRIGUEZ-LAZARO et al, 2012; LEIFELS et al, 2016).

A utilização de um controle interno de processo (CIP), baseado na inoculação de bacteriófago, anteriormente à etapa de concentração viral, vem sendo considerada uma

importante ferramenta para excluir reações falso-negativas (RAJAL et al, 2007), assim como o norovírus murino (HENNECHART-COLLETTE et al, 2014).

Embora não permita diferenciar entre partículas infecciosas e não infecciosas, a detecção do genoma viral é considerada por muitos investigadores uma boa técnica para monitoramento, principalmente por permitir a detecção de vírus fastidiosos ou daqueles que não se propagam em cultura celular (GIRONES et al, 2010). A técnica molecular mais utilizada atualmente é a reação em cadeia pela polimerase (PCR), que quando comparada ao isolamento viral em cultura de células, apresenta diversas vantagens tais como: a) redução no tempo e facilidade de execução; b) sensibilidade; e c) baixo custo (ABBASZADEGAN, 2001; CARDUCCI et al, 2003). Além disso, a baixa estabilidade do ácido ribonucleico (RNA) livre no ambiente, sugere que este método detecte partículas virais intactas e não o genoma viral livre da partícula (CARDUCCI et al, 2003). Uma variante da PCR, a técnica quantitativa (qPCR), apresenta todas as características citadas anteriormente, com a vantagem de possuir maior sensibilidade e gerar resultados quantitativos que possibilitam a realização de estudos de avaliação de risco microbiológico (LEIFELS et al, 2016).

As metodologias vigentes para avaliação de vírus em alimentos estão descritas em vários organismos internacionais, como o Comitê Europeu para a Normalização (CEN), Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) e a Organização Internacional para Padronização e especificações técnicas, do inglês *International Organization for Standardization/ Technical Specification* (ISO/TS). Estas normas abordam e definem princípios e/ou padrões para a amostragem de alimentos e água. O método quantitativo para detecção de NoV em alimentos como frutas macias, vegetais folhosos, água engarrafada ou superfícies alimentares, utilizando RT-qPCR, está descrito na ISO/TS 15216-1:2017 e a metodologia qualitativa para detecção de NoV nestas matrizes, está descrita na ISO/TS 15216-2:2013 (em revisão).

3 RELEVÂNCIA

Segurança Alimentar e Nutricional consiste na realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras da saúde, que respeitem a diversidade cultural e que sejam ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis (CHMIELEWSKA; SOUZA, 2011; MALUF et al, 2015). Deste modo se traduz em um conjunto de normas de produção, transporte e armazenamento de alimentos que resultam na produção de alimentos livres de perigos biológicos, químicos ou físicos e portanto, adequados ao consumo. Neste sentido, organizações internacionais normatizam regras que atendam as necessidades comerciais e sanitárias, o que em alguns casos, podem gerar adoção de barreiras sanitárias a produtos alimentícios importados e/ou matérias-primas agropecuárias (NEWELL et al, 2010). Os microrganismos, tais como bactérias e fungos representam importantes causas de contaminação de alimentos, sendo causadores de toxi-infecções alimentares, embora, atualmente, os vírus têm tido maior destaque, principalmente devido a extensão dos surtos e o desenvolvimento de metodologias de recuperação viral em alimentos e mesmo detecção molecular (HAVELAAR et al, 2015).

De acordo com a OMS, os vegetais verdes folhosos são prioritários em termos de segurança de produtos frescos, que por serem consumidos crus apresentam associação aos surtos de DTA (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008a, b). A utilização de águas de irrigação proveniente de matrizes contaminadas podem resultar na contaminação destes alimentos (SCHERER et al, 2016). Outro aspecto a ser considerado, principalmente, na agricultura orgânica é a utilização de adubos orgânicos, muitas vezes constituídos de fezes provenientes de diversos animais, podendo apresentar maior risco de contaminação por estes microrganismos (REMBIALKOWSKA, 2007; MATTISON et al, 2010; DE QUADROS et al, 2014; MARTI; BARARDI, 2016).

A investigação de vírus em alimentos tem sido negligenciada, em comparação com as bactérias (DE GIGLIO et al, 2017), embora seja crescente o número de estudos que demonstram os vírus como importantes contaminantes de vegetais folhosos, seja pela detecção de amostras obtidas comercialmente ou associados a surtos (KOOPMANS et al, 2002; KOOPMANS, 2012; BRANDÃO et al, 2014; MARTI; BARADI, 2016). Outros estudos visando determinar a qualidade bacteriológica das águas subterrâneas utilizadas para irrigação demonstram também a ocorrência de vírus entéricos (NoV, EV, RVA e HAV) nestas águas e o potencial risco de contaminação ou sua utilização como indicadores de contaminação fecal

humana (GERBA; CHOI, 2006; CHEONG et al, 2009; HOLVOET et al, 2014; ALLENDE; MONAGHAN, 2015; De GIGLIO et al, 2017). No Brasil, os trabalhos em virologia de alimentos inicialmente estavam restritos a otimização de métodos para recuperação de vírus nestas matrizes e a pesquisa destes vírus em alimentos (alfaces, morangos, tomates e queijos) adquiridos comercialmente, em mercados da cidade do Rio de Janeiro, em particular NoV (FUMIAN et al, 2009; CORRÊA; MIAGOSTOVICH, 2013; BRANDÃO et al, 2014; MELGAÇO et al, 2016). Outra linha de investigação nesta área tem possibilitado o esclarecimento de surtos de DTA de origem viral em alimentos (KOOPMANS et al, 2002, KOOPMANS, 2012). Marti e Barardi (2016) pesquisaram HAdV em alfaces, cebolinhas e morangos frescos obtidos no comércio de Florianópolis (Santa Catarina, Brasil) e em amostras contaminadas artificialmente.

Neste contexto, este estudo é pioneiro na pesquisa de vírus entéricos no campo de cultivo de folhosos e água de irrigação e tem como objetivo a geração de dados referentes a contaminação viral em uma propriedade agrícola, contribuindo para alertar aos produtores sobre como as condições precárias nas áreas de cultivo de vegetais podem representar um risco a saúde dos consumidores, assim como apontar a utilização dos vírus como marcadores de contaminação fecal humana. Esta investigação foi realizada no Estado do Rio de Janeiro que é considerado o segundo maior mercado consumidor de hortaliças orgânicas do Brasil, com um alto consumo *per capita*, em comparação aos mercados consumidores de vegetais orgânicos, nas demais capitais do país. A região do Brejal, localizado na Posse, distrito de Petrópolis, RJ, possui 338 propriedades agrícolas com diversos tipos de plantação, mas tem como atividade principal o cultivo de hortaliças orgânicas (Disponível em: <http://planetaorganico.com.br/site/index.php/gr2014-agrifamiliar-2/>. Acesso em 18 jan. 2017).

Os resultados obtidos neste estudo serão encaminhados à EMATER a fim de fornecer embasamento científico para demonstrar o nível de contaminação viral nos produtos obtidos pela produção agrícola, em territórios que não obedecem a critérios de higiene e práticas conformes de saneamento básico. Adicionalmente, este estudo visa contribuir com dados que demonstrem os vírus como importantes marcadores de contaminação humana e que sua utilização poderá resultar em atividades sanitárias mais seguras.

4 OBEJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Demonstrar os vírus como contaminantes ambientais, avaliando sua disseminação nas diferentes etapas da cadeia de produção orgânica de alfaces, em propriedade agrícola localizada no município de Petrópolis, região serrana do Estado do Rio de Janeiro.

4.2 Objetivos específicos

- Detectar e quantificar, por amplificação gênica (qPCR), a presença de vírus entéricos, RVA, NoV, HAdV e EV em amostras de águas (nascente, irrigação e lavagem) e alfaces (mudas, adultas e lavadas para consumo) utilizadas na cadeia de produção.
- Avaliar a infecciosidade dos HAdV e EV detectados nas amostras de água e alfaces, pelo isolamento viral em cultivo celular.
- Avaliar a qualidade da água utilizando parâmetros físico-químicos e bacteriológicos.
- Comparar a presença de vírus entéricos e da bactéria *Escherichia coli*, preconizada pela legislação atualmente como marcador de contaminação ambiental.

5 ASPECTOS ÉTICOS

O desenvolvimento deste projeto não contempla a utilização de amostras biológicas de origem humana ou animal. Os riscos de danos à saúde de profissionais envolvidos ou das populações, que por ventura residam em áreas próximas ao local das coletas, também não estarão comprometidos.

6 METODOLOGIA

6.1 Local do estudo e coleta das amostras

Este estudo foi realizado em um sítio de produção de alface orgânica localizado na região do Brejal, município de Petrópolis, na região serrana do Rio de Janeiro, caracterizado por seu clima tropical de altitude, verões quentes e úmidos e invernos moderadamente frios e secos. A temperatura média anual na região é de 19° C e as chuvas atingem 2400 mm por ano (PETRÓPOLIS, 2012).

As alfaces foram produzidas em um terreno de 30.000 metros quadrados de extensão dividido em duas áreas (Figura 9). Na primeira, as mudas foram cultivadas por um período de 20 a 30 dias e, a seguir foram transferidas para outra área localizada há dois quilômetros de distância onde foram plantadas, colhidas, lavadas e enviadas para comercialização. O tempo médio de produção de alface é de 60 dias e diferentes fontes de água foram utilizadas em cada área.

Figura 9 - Mapa geográfico do Brejal, município de Petrópolis, RJ - produção orgânica.



Fonte: Google Earth, 2017.

Dois litros de água e três amostras de alfaces, suficientes para atingir 25 g foram coletados em campanhas realizadas semanalmente em agosto de 2010 (estudo piloto) e

quinzenalmente, de maio a agosto de 2011, totalizando 60 amostras de água e 36 de alfaces. Foram coletadas amostras de água em cinco pontos (W1 a W5) do terreno e amostras de alface (L1 a L3) nas diferentes etapas de produção, em locais marcados por GPS (Sistema de Posicionamento Global - eTREX Legend H, Garmin Ltda, Olathe, KS) da seguinte forma: 1. Pontos de coleta de água: W1- água de irrigação das mudas; W2 - água de captação da nascente; W3 - açude; W4 - água de irrigação de alface; W5 - água de lavagem de alface. 2. Tipos de amostras de alfaces: L1 - mudas; L2 - alfaces; L3 - alfaces lavadas (Figura 10). As amostras foram coletadas em frascos (*Hexis Scientific*[®], Jundiaí, São Paulo, Brasil) e sacos plásticos (*Whirl-Pak*[®] Bag [Nasco, Atlanta, EUA]) estéreis para água e alfaces, respectivamente. O transporte ocorreu em isopor contendo gelo até o laboratório, onde foram imediatamente estocadas em geladeira (entre 2 e 8° C), até a realização das análises.

Figura 10 - Fluxograma da produção de alface orgânica.



Fonte: (Do autor, 2017).

6.2 Vírus

Foram utilizadas amostras de RVA, NoV, HAdV e EV (Sabin3) disponíveis no Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) e no Laboratório de Enterovírus (LEV), como vírus controles, previamente caracterizados pelo sequenciamento parcial do genoma.

Bacteriófago PP7, gentilmente fornecido pela Dr. Verónica Rajal (Universidade de Salta, Argentina) e cultivados no hospedeiro *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692), foi utilizado em um estudo piloto como controle positivo dos métodos de concentração e moleculares das matrizes aquática e alimentar. Este bacteriófago também foi utilizado como controle interno de processo (CIP) nos procedimentos de recuperação e quantificação viral nas amostras coletadas. O bacteriófago foi escolhido devido a seu pequeno tamanho, similar aos enterovírus e pelas propriedades físico-químicas (RAJAL et al, 2007).

6.3 Método de concentração viral

Para a concentração das amostras da água foi empregado o método de filtração baseado em eluição e adsorção em membranas carregadas negativamente como descrito anteriormente por Katayama et al. (2002). Para amostras de alface, o mesmo método adaptado para pequenos volumes (120 mL), utilizando filtro Stericup® (250 mL) (Nihon, Millipore, EUA) (FUMIAN et al, 2009). Um total de 24 amostras de água e alfaces foram semeadas com PP7 na concentração de $2,9 \times 10^9$ cópias do genoma/mL, como CIP, para averiguar a eficiência do método de concentração para a fiel quantificação dos vírus estudados. Os dois experimentos foram realizados independentemente para amostras de água e alface.

6.3.1 Água

As amostras foram previamente clarificadas por filtração com pré-filtro AP-20® (142 mm de diâmetro, Millipore), para a remoção de possíveis resíduos, utilizando um Sistema de Filtração Millipore (Millipore, RJ) constituído de uma bomba de vácuo, um recipiente de pressão e um suporte para as membranas (Figura 11).

Figura 11 - Sistema de Filtração Millipore®: bomba de vácuo, recipiente de pressão e suporte para as membranas.



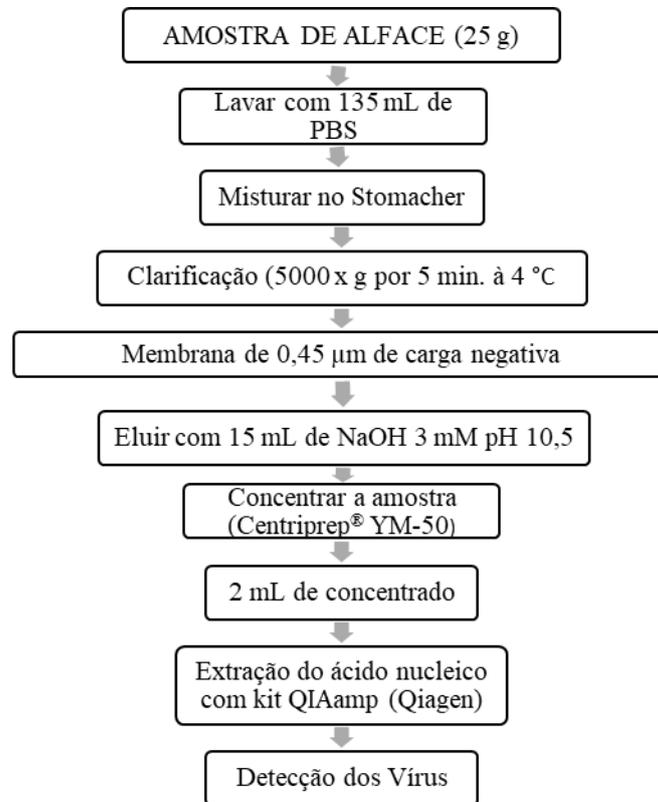
Fonte: (Do autor, 2017).

Após a clarificação, 25 mL de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) foram adicionados às amostras, a uma concentração final de 25 mM (Vetec, Brasil). O pH foi ajustado para 5,0 com a adição de ácido clorídrico 6N (HCl, Merck, Brasil). Em seguida, as mesmas foram filtradas em membrana HA carregadas negativamente (142 mm de diâmetro, malha 0,45 μm , Millipore) acopladas ao suporte do sistema de filtração. A membrana foi rinsada com 350 mL de ácido sulfúrico a 0,5 mM (H_2SO_4 , Merck, Brasil). Os vírus foram eluídos em 15 mL de hidróxido de sódio a 3mM, pH 10,5 (NaOH, Vetec, Brasil) por agitação em placa de Petri durante 10 minutos. O eluato foi neutralizado pela adição de 50 μL de H_2SO_4 50 mM e 50 μL de tampão Tris-EDTA (TE) 100 x (10 μM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 8,0) e transferido para uma unidade do concentrador Centriprep® YM-50 (Millipore, Brasil).

6.3.2 Alfaces

Vinte e cinco gramas (g) de alface foram homogeneizados no equipamento *Stomacher* (SOLAB, Capim Fino, Piracicaba, SP, Brasil) e processados pela adaptação do método para pequenos volumes (aproximadamente 120 mL) utilizando filtro de membrana Stericup® de carga negativa de 0,45 μm (250 mL) (Nihon, Millipore, EUA) após ultrafiltração com Centriprep Concentrator® 50 (Nihon, Millipore) para obter um volume final de 2 mL (Figura 12).

Figura 12 - Diagrama de fluxo para recuperação, concentração e detecção de vírus em amostras de alface.



Fonte: (Do autor, 2017).

6.4 Extração de ácido nucleico

Os ácidos nucleicos foram extraídos utilizando QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Inc., Valência, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados controles positivos e negativos ao longo de todo o processamento das amostras. As amostras clínicas RJ15221 e RJ12688 foram previamente sequenciadas como controles positivos para RVA e NoV, respectivamente.

6.5 Preparo de DNA complementar (cDNA)

Para NoV e RVA, obteve-se cDNA por transcrição reversa utilizando iniciadores hexâmeros aleatórios (unidades Pd(N)₆, A260, Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Reino Unido).

Foram adicionados dois (2) µL de dimetil sulfóxido (DMSO) (SIGMA[®]) a 10 µL de RNA extraído, incubou-se a 97°C por sete minutos para desnaturação, seguido de banho de gelo por dois minutos. Imediatamente, 38 µL da mistura de reagentes foram adicionados e

incubou-se a 25 °C por cinco minutos, 50 °C por uma hora e 70 °C por 20 minutos. O produto foi estocado a -20 °C até realizar a PCR (FERREIRA et al, 2009).

6.6 Detecção e quantificação de vírus por PCR quantitativo

6.6.1 Curvas padrão para Reação em Cadeia pela Polimerase quantitativa (qPCR)

Para qPCR, as curvas padrão foram geradas por clonagem em separado de fragmentos de DNA, no vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), contendo as seguintes regiões: gene NSP3 (RVA), região de sobreposição de ORF1/ORF2 (NoV), gene do hexon de HAdV (Tabela 2) e gene da replicase (bacteriófago PP7). Os plasmídeos foram purificados utilizando o *Kit Maxiprep Purification System*® (Promega Corporation, Madison, Winsconsin, EUA), seguindo as instruções do fabricante, e o DNA obtido foi quantificado com um NanoDrop® (Thermo Scientific) por absorvância a 260 nm. O número de cópias foi estimado com base no tamanho do plasmídeo e do fragmento inserido (YIN et al, 2001). Curvas padrão específicas foram geradas por diluição em série de 10 vezes do DNA. Os valores finais para os níveis absolutos do genoma viral são dados como cópias do genoma (GC) / reação.

Para EV utilizou-se RNA do poliovírus Sabin 3 (código NIBSC: 01/532) obtido a partir de culturas de células RD humanas, extraído e diluído de 10^{-1} a 10^{-9} . Para determinar o limite de detecção, o RNA padrão foi diluído em série em um conjunto de concentrados de água negativos. Os concentrados foram extraídos e testados em duplicatas.

6.6.2 qPCR

Os vírus foram detectados e quantificados pela qPCR, utilizando iniciadores e sondas descritas anteriormente (Tabela 2). Para EV foram utilizados iniciadores e sondas correspondentes à região 5'NC de EV humano desenhados e avaliados para detecção de espécies A a D (Da Silva, E.E. - Dados não publicados).

Para os vírus gastroentéricos utilizou-se a TaqMan Universal PCR Master Mix® (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) em ABI 7500® (Applied Biosystems). A qPCR do EV foi realizada utilizando o kit de RT-PCR *AgPath-IDTM One-step* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). Nove μ L de RNA extraídos foram adicionados à mistura de reação de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios foram colocados ABI PRISM 7500

Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) nas seguintes condições: incubação a 50°C durante 2 min para ativar UNG, desnaturação inicial a 95 °C durante 10 min e depois 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 56-60 °C durante 1 minuto. As amplificações foram analisadas em duplicata. As amostras que apresentaram sinais cruzando a linha de limiar em ambos as réplicas até $Ct \leq 40$, apresentando uma curva sigmoideal característica, foram consideradas positivas. A quantidade de DNA foi definida como a média dos dados duplicados obtidos.

Para todos os protocolos de qPCR, foram incluídos controles positivos e negativos. Foram utilizadas três salas separadas para todos os procedimentos moleculares, para evitar a contaminação cruzada de amostras.

Os resultados da concentração de vírus estão apresentados como cópia de genoma/litro (cg/L) e cg/25 g, para amostras de água e alface, respectivamente.

Tabela 2 - Vírus analisados, sequências dos iniciadores e sondas, regiões do genoma e referências das reações de cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

| Vírus | Iniciadores e Sondas | Sequência 5'-3' | Região do genoma | Referências |
|--------------|-----------------------------|---|-------------------------|----------------------|
| RVA | NSP3 F | ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG | NSP3 | Zeng et al, 2008 |
| | NSP3 R | GGTCACATAACGCCCTATAGC | | |
| HAdV | Sonda NSP3 | VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-MGB | Hexon | Heim et al, 2003 |
| | AQ1 F | GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT | | |
| | AQ2 R | GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC | | |
| NoV GII | Sonda | FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-TAMRA | ORF1-ORF2 junção | Kageyama et al, 2003 |
| | COG2F | CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG | | |
| | COG2R | TCGACGCCATCTTCATTCACA | | |
| EV | Sonda RING2 | FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA | | |
| | Conjunto EV grupo | Sob consulta | 5' | Da Silva, EE |

Fonte: (Do autor, 2017).

HAdV: adenovírus humano; NoV GII: norovirus genogrupo II; RVA: rotavírus espécie A; EV: enterovírus.

6.7 Isolamento viral

6.7.1 HAdV

Foram realizados ensaios em três diferentes linhagens celulares (cedidas pelo Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA/IOC/Fiocruz), para determinar a infecciosidade dos HAdV detectados. Monocamadas confluentes de células epiteliais basais alveolares de adenocarcinomas humanos (A549), células de rim embrionárias humanas 293 (HEK 293) e epitélio humano tipo 2 (HEp-2) foram preparadas separadamente, em tubos de 15 mL (Corning®, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), para tentativa de isolamento viral. 200 µL dos concentrados foram inoculados e incubados durante 60 minutos à $37 \pm 0,5^\circ$ C, sob agitação a cada 15 minutos, para adsorção de vírus, incluindo a cepa HAdV-35 e amostras negativas como controles. Os tubos foram então preenchidos com 1,8 mL de meio de manutenção (98% de Meio de Dulbecco Modificado de Eagle - DMEM, Gibco, Life Technologies, US [A549] e Meio Essencial Mínimo - MEM, Gibco, Life Technologies, EUA [HEK 293 e HEp-2] + 2% de soro fetal bovino - HyClone™ - FBS, Thermo Scientific, Scoresby, Victoria, EUA). Os tubos inoculados foram monitorados diariamente por microscopia óptica, para identificação de efeito citopático (ECP). Para cada linhagem celular, o inóculo foi submetido a três passagens, com um intervalo de incubação de sete dias à $37 \pm 0,5^\circ$ C e as monocamadas foram submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento, para a lise celular e liberação viral para inoculação. Após 21 dias, a cultura celular foi processada para qPCR (HERNROTH et al, 2002).

6.7.2 EV

Todas as amostras positivas concentradas e clarificadas foram inoculadas em um volume de 0,2 mL em tubos de poliestireno (Nalgene™, Thermo Fisher Scientific, EUA), transparentes, estéreis e descartáveis, contendo monocamadas de três diferentes linhagens celulares sensíveis ao isolamento do gênero *Enterovirus*: rabdiosarcoma humano (RD), células diploides humanas derivadas do pulmão (MRC-5) e células de carcinoma epitelial humano (HEp 2c) de acordo com protocolo previamente descrito WHO (2004). As células foram fornecidas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) / Atlanta, EUA ao Laboratório de Enterovírus da Fiocruz/RJ.

Para cada grupo de amostras inoculadas, foi utilizado um controle celular (RD, MRC-5 e HEp 2c), servindo como padrão de controle negativo, sendo constituído apenas de células e meio essencial mínimo. Os tubos foram incubados a $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e submetidos a leituras diárias de cinco a sete dias consecutivos, em microscópio invertido, para observação de ECP de 75-100%. Posteriormente, as amostras foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento rápido, em gelo seco e álcool etílico, visando à liberação das partículas virais para uma segunda passagem em cultura celular. Novas leituras diárias por cinco a sete dias consecutivas foram realizadas para observação de ECP. Os tubos que apresentaram ECP característico de enterovírus foram armazenadas a -20°C , para posterior identificação por RT-PCR. O ECP característico de enterovírus é caracterizado por alterações morfológicas das células, as quais se tornam arredondadas, refrativas e deslocam-se da superfície do tubo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

6.8 Parâmetros microbiológicos e físico-químicos

Para avaliar a qualidade da água, os coliformes totais e *Escherichia coli* (*E. coli*) foram quantificados por Colilert® Quanti-Tray®/2000 (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA).

Os resultados foram relatados como o número mais provável por 100 mL (NMP/100 mL). A regulamentação brasileira especifica um máximo de 200 NMP/100 mL de *E. coli*, como padrão para água de irrigação (BRASIL, 2005b).

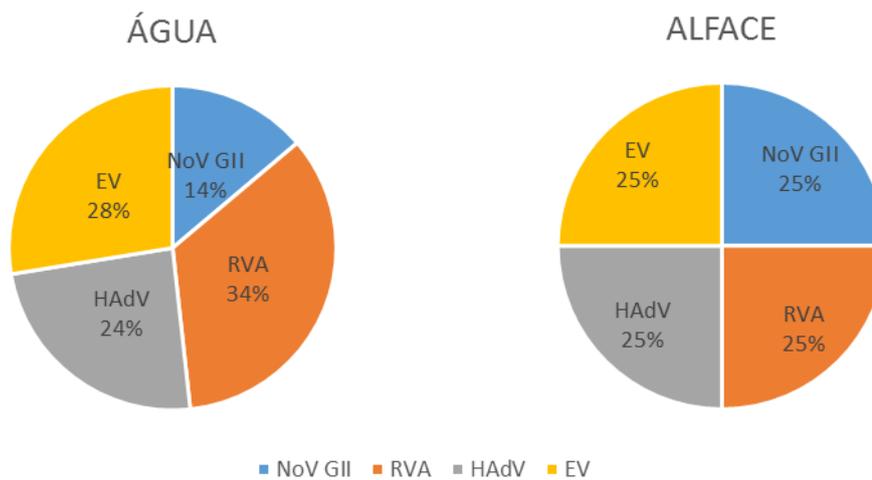
A temperatura da água ($^\circ\text{C}$), o pH, a turbidez (em unidades de turbidez nefelométrica - NTU) e a condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$) foram medidas em todas as amostras no momento da coleta utilizando o *Water Quality Checker U-10* (Horiba, Ltd, Irvine, CA, EUA).

7 RESULTADOS

De um total de 96 amostras, foram detectados vírus em 47% delas (45/96), sendo que 48% (29/60) e 44% (16/36) das amostras de água e alface, respectivamente. Pelo menos dois vírus distintos foram detectados em todos os pontos de coleta (água e alfaces), com concentrações variando de \log_{10}^1 (observado para NoV) para \log_{10}^{2-6} cópias genômicas por litro (cg/L), inclusive na coleta de alfaces onde a concentração de EV atingiu $5,56 \times 10^4$ (Tabela 3 e 4).

A figura 13 representa a distribuição da percentagem do total de cada vírus nas matrizes estudadas.

Figura 13 - Gráfico da percentagem de disseminação dos NoV GII, RVA, HAdV e EV, em matrizes de água e alface.



Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 3 - Detecção e quantificação de rotavírus A (RVA), norovírus genogrupo II (NoV GII), adenovírus humano (HAdV) e enterovírus (EV) em amostras de água, de acordo com locais de coleta (n = 12 por local).

| Pontos de coleta de amostras de água | Vírus | | | | | | | |
|---|------------------|--|------------------|--|------------------|--|------------------|--|
| | NoV GII | | RVA | | HAdV | | EV | |
| | Nº positivos (%) | Concentração de vírus (cg/L) | Nº positivos (%) | Concentração de vírus (cg/L) | Nº positivos (%) | Concentração de vírus (cg/L) | Nº positivos (%) | Concentração de vírus (cg/L) |
| W1 | 1 (8,3) | 1,92 x 10 ³ | 2 (16,7) | 2,11 x 10 ³ 6,88 x 10 ³ | 3 (25,0) | 2,65 x 10 ³ 1,16 x 10 ² 1,71 x 10 ² | 4 (33,3) | 6,36 x 10 ⁴ 7,62 x 10 ⁵ 3,37 x 10 ³ 4,72 x 10 ⁶ |
| W2 | ND | ND | 3 (25,0) | 1,27 x 10 ³ 1,19 x 10 ³ 2,97 x 10 ² 3,93 x 10 ² | 1 (8,3) | 1,92 x 10 ² | 2 (16,7) | 2,03 x 10 ⁵ 1,64 x 10 ⁶ |
| W3 | 1 (8,3) | 7,29 x 10 ¹ | 3 (25,0) | 7,50 x 10 ² 7,20 x 10 ² | 1 (8,3) | 3,76 x 10 ² | 1 (8,3) | 5,14 x 10 ³ |
| W4 | 2 (16,7) | 7,29 x 10 ² 8,57 x 10 ¹ | 1 (8,3) | 2,38 x 10 ³ | 1 (8,3) | 4,51 x 10 ³ | 1 (8,3) | 2,37 x 10 ⁴ |
| W5 | ND | ND | 1 (8,3) | 2,03 x 10 ³ | 1 (8,3) | 2,15 x 10 ² | ND | ND |

Fonte: (Do autor, 2017).

W1. Água de irrigação das mudas; W2. Captação da água da nascente; W3. Açude; W4. Água de irrigação de alfaces;

W5. Água de lavagem das alfaces.

ND. Não detectado.

Tabela 4 - Detecção de rotavírus A (RVA), norovírus genogrupo II (NoV GII), adenovírus humano (HAdV) e enterovírus (EV) em amostras de alfaces (n=12)

| Pontos de coleta de amostras de alfaces | Vírus | | | | | | | | |
|---|------------------|--|------------------------------|--|----------|--|----------|--|--|
| | NoV GII | | | RVA | | Concentração de vírus (cg/L) | | | |
| | Nº positivos (%) | | Concentração de vírus (cg/L) | | HAdV | | EV | | |
| L1 | 1 (8,3) | 2,98 x 10 ³ | 3 (25,0) | 5,10 x 10 ³ 2,98 x 10 ³ 2,98 x 10 ³ | 1 (8,3) | 4,39 x 10 ² | ND | ND | |
| L2 | 2 (16,7) | 1,16 x 10 ³ 4,29 x 10 ¹ | 1 (8,3) | 1,30 x 10 ⁴ | 1 (8,3) | 5,67 x 10 ² | 2 (16,7) | 3,28 x 10 ⁴ 5,47 x 10 ⁴ | |
| L3 | 1 (8,3) | 1,50 x 10 ² | ND | ND | 2 (16,7) | 3,74 x 10 ² 5,65 x 10 ² | 2 (16,7) | 2,14 x 10 ⁴ 5,56 x 10 ⁴ | |

Fonte: (Do autor, 2017).

L1. Mudas; L2. Alface; L3. Alface lavada; ND. Não detectado.

Um total de 23 amostras, sendo 11 positivas para HAdV e 12 positivas para EV por qPCR foram submetidas a três passagens consecutivas após sete dias. A qPCR realizada em amostras pareadas (concentrados iniciais e culturas), não mostrou redução nos valores de Cts (*Cycle Threshold*), que é a referência para a quantificação da expressão de determinada sequência gênica-alvo, revelando nenhuma replicação de vírus.

A Tabela 5 apresenta os resultados da caracterização da qualidade microbiológica e parâmetros físico-químicos das amostras de água. *E.coli* foi detectada em todos os pontos, mas em W1 o valor superou o limite de 200 NMP/mL usado como critério para a qualidade da água de irrigação. Neste local, a água também apresentou maior valor de condutividade quando comparado aos outros pontos.

O bacteriófago PP7 foi recuperado em 86,7% das amostras de água e alfaces analisadas, no estudo piloto.

Tabela 5 - Valores médios microbiológicos e físico-químicos de 12 amostras de água por ponto de coleta

| Amostras por ponto de coleta | Bactéria (mín-máx) | | Físico-químico (mín-máx) | | | |
|------------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------|---|-----------------|
| | Coliformes totais* | <i>E.coli</i> * | Temperatura °C | pH | Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$) | Turbidez (NTU) |
| W1 | 3069,8 (767 – 15500) | 279,9 (26 – 779,0) | 16,7 (13,9-23,1) | 7,0 (5,70–7,75) | 0,74 (0,010-0,156) | 31,9 (5-169) |
| W2 | 909,9 (40 – 1610) | 16,7 (1 – 74,3) | 16,6 (14,1-23,1) | 6,0 (4,75-6,75) | 0,01 (0,012-0,016) | 34,2 (10-65) |
| W3 | 2788,0 (368 – 19400) | 33,8 (12 – 103,0) | 17,3 (15,8-23,1) | 5,7 (5,22-6,46) | 0,03 (0,012-0,016) | 24,6 (10-52) |
| W4 | 1665,4 (184 – 8112) | 51,7 (1 – 147,6) | 16,9 (14,3-23,1) | 6,2 (5,05-7,31) | 0,05 (0,015-0,270) | 39,1 (10-87) |
| W5 | 12470,5 (159 – 91400) | 18,9 (1 – 113,0) | 17,4 (12,7-23,1) | 6,3 (4,81-7,07) | 0,22 (0,011-0,041) | 12,3 (7-25) |
| Total | 4180,7 (40-91400) | 80,2 (1-779,0) | 17,0 (12,7-23,1) | 6,3 (4,75-7,75) | 0,21 (0,010-0,270) | 28,4 (5-169) |

Fonte: (Do autor, 2017).

*Número Mais Provável (NMP/100mL). W1. Água de irrigação das mudas; W2. Água de captação da nascente; W3. Água do açude; W4. Água de irrigação da alface; W5. Água de lavagem da alface; ND. Não detectado.

Neste estudo, não foi possível associar a detecção viral com a produção orgânica. A falta de dados disponíveis sobre a diferença de transmissão viral entre alimentos de fazendas orgânicas e convencionais e o risco em ambas as produções foram descritos anteriormente (ALEXANDER et al, 2014; MIE et al, 2017).

8 DISCUSSÃO

Os vírus entéricos têm sido descritos como importantes contaminantes ambientais, sendo utilizados como indicadores de contaminação fecal humana (LIN; GANESH, 2013; DE GIGLIO et al, 2017). Neste estudo, a investigação de RVA, NoV, HAdV e EV em uma área importante da agricultura do Estado do Rio de Janeiro teve como objetivo demonstrar a disseminação destes vírus em áreas produtoras de hortaliças em territórios com saneamento inadequado, enfatizando a necessidade da implementação de medidas que proporcionam uma produção de alimentos mais segura.

Inicialmente, pela realização de um estudo piloto verificou-se a qualidade da água em algumas coletas, revelando que a contaminação das alfaces foi introduzida na primeira etapa da cadeia produtiva devido à má qualidade da água utilizada na irrigação das mudas. Assim, embora a fonte de água utilizada na área dois tenha uma qualidade físico-química e microbiológica satisfatória, a presença de vírus demonstra a contaminação inicial, pela concentração logarítmica na ordem de 10^4 , nas alfaces colhidas. A constatação da presença de vírus em amostras de água consideradas satisfatórias por parâmetros bacteriológicos, corrobora com a ausência da correlação entre estes microrganismos contaminantes. No Brasil, a água de irrigação para as culturas que são consumidas cruas e desenvolvidas junto ao solo está enquadrada na classe um (1) da Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 375 (2005), onde a contagem não deve exceder 200 coliformes fecais por 100 mililitros (mL), de acordo com os limites estabelecidos pela agência ambiental (BRASIL, 2005b). As diretrizes da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos para águas superficiais recomendam contagem abaixo de 1.000 coliformes fecais por 100 mL de água superficial, incluindo água do rio e para irrigação de culturas (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1986), mas não há padrões para vírus.

Neste mesmo estudo piloto, também demonstramos o baixo nível de inibição do método de concentração utilizado, com a recuperação de 86,7% do bacteriófago PP7 utilizado como controle interno de processo (CIP). O bacteriófago PP7 tem sido utilizado como CIP por apresentar características de similaridade com os poliovírus, tanto pelo seu tamanho (25 nm) quanto por suas propriedades físico-químicas, com sucesso de recuperação por diferentes metodologias (FUMIAN et al, 2009; SCHERER et al, 2009; MORALES-RAYAS et al, 2010; SÁNCHEZ et al, 2012; STALS et al, 2012). PP7 também foi recuperado com êxito nas amostras de alface com a metodologia utilizada para concentração de água (RAJAL et al, 2007; FUMIAN et al, 2010; BRANDÃO et al, 2014).

O método de concentração que utiliza a filtração por membranas negativas foi escolhido pela ideia inicial de se pesquisar NoV, cuja detecção só é possível pela realização de metodologias moleculares. Este método foi descrito como de baixa inibição, por utilizar solventes inorgânicos (KATAYAMA et al, 2002), e adaptado para pequenos volumes, utilizando filtro Stericup® (Nihon, Millipore, EUA), conforme descrito previamente (FUMIAN et al, 2009). Estas metodologias se mostraram eficientes para detecção dos vírus investigados na ocasião. Vale ressaltar que este estudo foi realizado anteriormente a publicação das Normas ISO/TS 15216-1:2017 e ISO/TS 15216-2:2013 que estabelecem metodologias padronizadas para detecção de vírus a partir de quatro categorias de alimentos, incluindo vegetais folhosos, que segundo estas normas devem ser recuperados utilizando PEG (ISO/TS 2013, 2017). As metodologias de extração de material genético, utilização de CIP e quantificação viral atenderam a ISO que descreve estes métodos para quantificação de NoV. Os métodos de quantificação utilizados para RVA e HAdV têm sido amplamente utilizados para detecção de vírus, a partir de amostras clínicas e ambientais (HERNROTH et al, 2002; ZENG et al, 2008; FUMIAN et al, 2010; RUSIÑOL et al, 2014). Em relação aos EV, a metodologia utilizada para o isolamento viral em cultivos celulares, segue o estabelecido pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004), enquanto a detecção direta do RNA viral é realizada por PCR em tempo real, com a utilização de um kit *in house* (da Silva et al, manuscrito em preparação).

O impacto da contaminação viral na produção de alface orgânica deve ser considerado, uma vez que na região das montanhas do Estado do Rio de Janeiro estão localizados inúmeros sítios de práticas agrícolas, concentrando 50% de terras cultivadas de todo o estado, com produção destinada principalmente a suprir a metrópole (MARAFON; RIBEIRO, 2006). Isso sugere que esta região montanhosa de clima frio e ameno possa contribuir para a estabilidade de vírus, por um período mais longo, em produtos agrícolas (SEYMOUR; APPLETON, 2001; GERBA; CHOI, 2006).

Previamente, Abreu et al. (2010) demonstraram que a contaminação por água de irrigação e vegetais com microrganismos é uma realidade na agricultura brasileira e a contaminação com patógenos, de frutas e vegetais frescos e prontos para comer, é uma questão significativa. A prevalência de vírus entéricos na água utilizada para irrigação foi descrita anteriormente (FONG; LIPP, 2005; CHEONG et al, 2009; ALLENDE; MONAGHAN, 2015; CARDUCCI et al, 2015; LÓPEZ-GÁLVEZ et al, 2016). Outros estudos demonstraram contaminação de hortaliças, na cadeia de produção ou mesmo em

produtos obtidos em mercados (JUNG et al, 2014; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015).

Em relação aos vírus detectados, é notável a detecção de RV e HAdV. A alta porcentagem de detecção de RVA no presente estudo sugere que esses vírus também devem ser considerados como marcadores de contaminação fecal, em países em desenvolvimento, corroborando com estudos realizados no Brasil que apontaram RVA como um importante contaminante ambiental, especialmente pela alta taxa de excreção, 10^5 a 10^{11} /g de fezes (MIAGOSTOVICH et al, 2008; FUMIAN et al, 2011; VIEIRA et al, 2012). A taxa de excreção e as condições de saneamento de países em desenvolvimento podem explicar a alta taxa de detecção destes vírus no ambiente. A água de irrigação e os legumes crus correspondentes, pesquisados em três regiões da África foram avaliadas quanto à presença de RVA onde foram encontrados em 14% das amostras de água de irrigação e em 1,7% das amostras de legumes crus (VAN ZYL et al, 2006).

Embora a porcentagem de RVA tenha sido superior à de HAdV, é importante notar que este último foi detectado em todos os pontos estudados. Esses vírus têm sido descritos como indicadores de contaminação fecal humana, uma vez que são agentes patogênicos resistentes às condições do meio ambiente, abundantes, facilmente detectados por métodos moleculares e são de grande importância na saúde pública (GIRONES et al, 2006; BOFILL-MAS et al, 2006, 2013; USEPA, 2016). HAdV têm sido descritos como contaminantes de tomates e morangos adquiridos no comércio do Rio de Janeiro (MELGAÇO, 2016).

Em relação aos NoV, os dados obtidos neste estudo também corroboram com estudos prévios que demonstram uma menor disseminação destes vírus no ambiente quando comparados com RVA (FUMIAN et al, 2010; VIEIRA et al, 2012). No Brasil, o NoV não foi detectado em alimentos coletados no mercado (FUMIAN et al, 2009, BRANDÃO et al, 2014).

Os NoV, em geral, estão associados a surtos de gastroenterite ligados a alimentos contaminados por manipulação (GUO et al, 2014; CHEN et al, 2016; COUTTS et al, 2017). Em países como Canadá, Bélgica e França, a prevalência do NoV em vegetais folhosos provenientes de mercados em 2009 e 2010, foi de 28,8%, 33,3% e 50%, respectivamente (BAERT et al, 2011). Nenhuma das amostras de produção agrícola e de mercados revelou-se positiva para NoV GI e GII, enquanto que 9% (N = 57) e 7% (N = 85) das amostras de produtos rurais e de mercado, respectivamente, foram positivas para HAdV (ANTWI-AGYEI et al, 2015).

A pesquisa de EV, neste estudo, revelou que a carga viral variou de $3,37 \times 10^3$ a $4,72 \times 10^6$ cópias genômicas por litro (cg/L) e de $2,14 \times 10^4$ a $5,56 \times 10^4$ cópias do genoma por 25 gramas (cg/25g) para as amostras de água e alface, respectivamente. EV, assim como os vírus gastroentéricos, foram detectados em várias matrizes como em amostras de esgoto e em alguns estudos de vigilância ambiental de poliovírus e enterovírus não pólio (CHEONG et al, 2009; NDIAYE et al, 2014; DE OLIVEIRA PEREIRA et al, 2016), inclusive na água de irrigação (ESPINOSA et al, 2009). Outros estudos demonstraram que EV podem ser transferidos para a superfície de vegetais através de água de irrigação por pulverização, resultando em contaminação viral dos vegetais (CHEONG et al, 2009; PACHEPSKY et al, 2011; ALLENDE; MONAGHAN, 2015; UYTTENDAELE et al, 2015).

A detecção molecular destes vírus em concentração variando de 10^1 a 10^6 ainda é limitante para se demonstrar o risco de infecção pelo consumo, uma vez que a metodologia empregada não determina a infecciosidade dos vírus detectados. Afim de se demonstrar a viabilidade destes vírus realizou-se uma tentativa de isolamento de HAdV e EV, replicáveis em diversos tipos de células (MARTI; BARARDI, 2016). O isolamento de RVA não foi considerado, uma vez que os RVA são considerados vírus fastidiosos (PINTÓ et al, 1995). Embora repliquem em cultivo de células MA104, possuem crescimento lento, necessitando de adaptação (WARD et al, 1984; DESSELBERGER, 2014). Quanto aos NoV, ainda não existe um cultivo celular eficiente para sua replicação (QU et al, 2016).

Infelizmente, neste estudo, mesmo com a utilização de três linhagens de culturas celulares distintas para HADV e três para EV não foi possível isolar os vírus detectados molecularmente. O intervalo de tempo entre as coletas das amostras (2010-2011) e a realização deste ensaio (2015-2016) pode ter influenciado no isolamento em culturas de células, assim como algumas condições ambientais não avaliadas. Marti e Barardi (2016) após avaliarem contaminação em cinco amostras de alface, cebolinha verde e morango, somente em cebolinhas verdes puderam detectar partículas infecciosas.

Outro aspecto novo a ser considerado na contaminação de vegetais folhosos por vírus é a detecção de vírus humanos nas raízes e no interior dos alimentos, que mesmo parecendo ser um evento improvável, já foi demonstrado e representa um novo desafio de saúde pública, pois a internalização representa um risco adicional para os consumidores (CHANCELLOR et al, 2006; BUTOT et al, 2007; WEI et al, 2011; DICAPRIO et al, 2012; CARDUCCI et al, 2015; ESSEILI et al, 2018).

Concluindo, os resultados obtidos neste estudo apontam a utilização de vírus como marcadores de contaminação fecal, como uma ferramenta adicional que pode ajudar a garantir

produtos de qualidade. Como a contaminação de vírus no ambiente é difícil de eliminar, estes dados enfatizam a importância do saneamento básico na segurança alimentar (COOK et al, 2016) e abre novas perspectivas de estudo nesta área. Pesquisas futuras são recomendadas.

9 CONCLUSÕES

- A detecção de vírus entéricos em todas as amostras de águas e alfaces estudadas nas diferentes etapas da cadeia de produção dos alfaces, revela contaminação fecal humana na região de cultivo utilizada.

- A detecção de HAdV em todos os pontos de coleta demonstram seu papel como indicador de contaminação viral.

- A prevalência de RVA corrobora com estudos anteriores realizados no país que demonstram a ampla disseminação destes vírus no ambiente.

- Apesar da impossibilidade de demonstrar a infecciosidade dos EV e HAdV em seis diferentes culturas de células, os resultados representam um risco sanitário à população, devido a presença de partículas virais nas amostras estudadas.

- A presença de vírus em águas consideradas próprias de acordo com os parâmetros bacteriológicos, aponta os vírus como importantes indicadores de contaminação ambiental.

10 PERSPECTIVAS

Os dados encontrados serão informados aos órgãos competentes da região para alertar sobre a importância do saneamento do território utilizado na produção orgânica e a implementação da vigilância sanitária e ambiental será recomendada.

Será sugerida a implantação de uma área de pesquisa e controle da qualidade em alimentos, para a identificação de vírus associados à contaminação por alimentos no INCQS/Fiocruz.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEGAN M. Advanced detection of viruses and protozoan parasites in water. **Reviews in Biology and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 21-6, 2001.
- ABREU, I. M. O. et al. Microbiological quality and productivity of lettuce under chemical and organic fertilization. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, p. 108-118, 2010.
- AKTAR, W. et al. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009.
- ALBINANA-GIMENEZ N. et al. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. **Water Research**, v. 43, n. 7, p. 2011-2019, 2009.
- ALEXANDER J. et al. Comparison of organic and conventional food and food production Overall summary: Impact on plant health, animal health and welfare, and human Health. Opinion of the Scientific Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. **VKM report**, 2014.
- ALLENDE A.; MONAGHAN J. Irrigation water quality for leafy crops: a perspective of risks and potential solutions. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.12, n.7, p.7457-77, 2015.
- ANTWI-AGYEI, Prince et al. A farm to fork risk assessment for the use of wastewater in agriculture in Accra, Ghana. **PloS One**, v. 10, n. 11, p. e0142346, 2015.
- BAERT, L. et al. Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 261-269, 2011.
- BAŞ M. et al. Implementation of HACCP and prerequisite programs in food businesses in Turkey. **Food Control**, v. 17, n. 2, p. 118-126, 2006.
- BERK A. J. Adenoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE D. M.; HOWLEY P. M. (Org.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2355-2394.

BISHOP R. F. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v.2, p. 1281- 83, 1973.

BOFILL-MAS S. et al. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7894-7896, 2006.

_____. Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

BOSCH A. et al. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 295-301, 2008.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready- to- eat lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 5, 2014.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 2001.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**: versão preliminar. Brasília, 2004.

_____. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004**. Boletim eletrônico epidemiológico, ano 05, n. 6, dezembro 2005a.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2005b. Seção 1, p. 58-63.

_____. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília, 2010. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ManuaVEDTA.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2016.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Imunizações (PNI) : 40 anos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013. 236 p. ISBN 978-85-334-2048-9. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_imunizacoes_pni40.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2018.

_____. Ministério dos Negócios Estrangeiros. **Mercosul**. 2014. Disponível em: <<http://www.itamaraty.gov.br/en/politica-externa/integracao-regional/6347-mercosur-en>>. Acesso em: 08 maio 2018.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**: [recurso eletrônico]. Brasília, 2016. 773 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. **Avaliando as coberturas vacinais do Calendário Nacional de Vacinação**, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/28/2-c-coberturas-vaciniais-CIT-final_27jun2017-jptoledo.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2018.

BRITZ T. J.; SIGGE G.O. **Quantitative investigation into the link between irrigation water quality and food safety**: volume I: agricultural water - smallholder irrigation. South Africa Water Research Commission, 2012.

BUSTREO F. et al. World Health Organization perspectives on the contribution of the Global Alliance for Vaccines and Immunization on reducing child mortality. **Archives of Disease in Childhood**, v. 100, p. S34-S37, 2015. Suppl 1.

BUTOT S. et al. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 186-92, 2007.

CALGUA B. et al. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, v. 153, n. 2, p. 79-83, 2008.

CAMINO FELTES, M. M. et al. Food quality, food-borne diseases, and food safety in the Brazilian food industry. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 1, p. 13-27, 2017.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. 2014.

<<http://www.inspection.gc.ca/food/safe-food-production-systems/haccp-generic-models-and-guidance-documents/guidance-fresh-cut-vegetables/eng/1371036204069/1371036205913>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

CARDUCCI A. et al. Virological control of groundwater quality using biomolecular tests. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 3, p. 261-266, 2003.

_____. Possible internalization of an Enterovirus in hydroponically grown lettuce. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 7, p. 8214-27, 2015.

CARVALHO-COSTA et al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005- 2009. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.30, p.S35-S41, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Surveillance for foodborne disease outbreaks. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, n. 35, p. 1197–1202, 2011.

_____. **The food production chain: how food gets contaminated - foodborne outbreaks - investigating outbreaks**, 2015.

_____. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). **Foodborne Germs and Illnesses**. USA, 2016.

CHAN, M. C. W. et al. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII. 17 variant in late 2014. **Nature Communications**, v. 6, p. 10061, 2015.

_____. Global spread of norovirus GII. 17 Kawasaki 308, 2014–2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1350, 2017.

CHANCELLOR, D. D. et al. Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 6, p. 1468-1472, 2006.

CHANDER, M. et al. Organic livestock production: an emerging opportunity with new challenges for producers in tropical countries. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 30, n. 3, p. 969-983, 2011.

CHAPRON, C. D. et al. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2520-2525, 2000.

CHEN, Shou-Chien et al. Rotavirus infection and the current status of rotavirus vaccines. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 111, n. 4, p. 183-193, 2012.

CHEN, Meng-Yu et al. An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with asymptomatic food handlers in Kinmen, Taiwan. **BMC Public Health**, v. 16, n. 1, p. 372, 2016.

CHEONG S. et al. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7745-7751, 2009.

CHMIELEWSKA, D.; SOUZA, D. **The food security policy context in Brazil**: country study. Brasilia: International Policy Centre for Inclusive Growth, 2011.

CIFUENTE J. O. et al. Structures of the procapsid and mature virion of enterovirus 71 strain 1095. **Journal of virology**, v. 87, n. 13, p. 7637-7645, 2013.

COOK, N. et al. Persistence and elimination of human norovirus in food and on food contact surfaces: a critical review. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1273-1294, 2016.

CORRÊA A. A.; MIAGOSTOVICH M. P. Optimization of an Adsorption-Elution Method with a Negatively Charged Membrane to Recover Norovirus from Lettuce. **Food and Environmental Virology**, v. 5, p. 144-149, 2013.

COUTTS, S. P. et al. An outbreak of foodborne norovirus gastroenteritis linked to a restaurant in Melbourne, Australia, 2014. **Western Pacific Surveillance and Response Journal: WPSAR**, v. 8, n. 2, p. 12, 2017.

DA SILVA, M. P.; LAVINAS, F. C. Virose alimentar: microbiologia das principais doenças de origem alimentar transmitidas por vírus. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 5, n. 1, p. 33-43, 2010.

DE ANDRADE, J. S. R. et al. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004–2011. **Journal of Clinical Virology**, v. 61, n. 3, p. 345-352, 2014.

DEBBINK K. et al. Genetic mapping of a highly variable norovirus GII. 4 blockade epitope: potential role in escape from human herd immunity. **Journal of Virology**, v. 86, n. 2, p. 1214-1226, 2012.

DE GIGLIO O. et al. Enteric Viruses and Fecal Bacteria Indicators to Assess Groundwater Quality and Suitability for Irrigation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 558, 2017.

DE JONG J. C.; OSTERHAUS A. D. M. E. Human adenovirus type 52: a type 41 in disguise? **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3809-3810, 2008.

DE MORAES T. T. et al. Vírus Entéricos Veiculados Por Água: Aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, 2007.

DE OLIVEIRA PEREIRA, J. S. et al. Environmental surveillance of polioviruses in Rio de Janeiro, Brazil, in support to the activities of global polio eradication initiative. **Food and Environmental Virology**, v. 8, n. 1, p. 27-33, 2016.

DE QUADROS RODRIGUES, R. et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 152-164, 2014.

DESSELBERGER U.; GRAY J. J. Rotavirus. **The Springer Index of Viruses**, 2011. p.1635-43.

DESSELBERGER, U. Rotaviruses. **Virus Research**, v. 190, p. 75-96, 2014.

DICAPRIO, E. et al. Internalization and dissemination of human norovirus and animal caliciviruses in hydroponically grown romaine lettuce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p. 6143-6152, 2012.

DINU, S. et al. Molecular identification of emergent GII. P17-GII.17 norovirus genotype, Romania, 2015. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 7, 2016.

DULGHEROFF A. C. B. et al. Diversity of group A rotavirus genes detected in the Triângulo Mineiro region, Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 731-740, 2016.

EDEN J. S. et al. Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage. **Journal of Virology**, v. 87, n. 11, p. 6270-82, 2013.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ambient water quality criteria for bacteria-1986**. Washington, DC: **Office of Water Regulations and Standards**; USEPA, 1986. (EPA/440/5-84-002).

ESCOBAR A. L. et al. Diarrhea and health inequity among Indigenous children in Brazil: results from the First National Survey of Indigenous People's Health and Nutrition. **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, p. 191, 2015.

ESPINOSA, A. C. et al. Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. **Environmental Health**, v. 8, n. 1, p. 49, 2009.

ESSEILI, M. A. et al. Tissue distribution and visualization of internalized human norovirus in leafy greens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 12, p. AEM. 00292-18, 2018.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1747-85.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1917-74.

ESTES, M. K.; GREENBERG, H. B. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p.1347- 1401.

EUROPEAN COMMISSION. Regulation n° 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 2004. Disponível em:
<<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:en:PDF>>.
Acesso em: 12 maio 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of food and agriculture**: climate change, agriculture and food security. Rome, 2016a. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i6030e.pdf>>. Acesso em: 08 maio 2018.

_____. CODEX ALIMENTARIUS. **International Food Standards**. Rome, 2016b. Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/en/>>. Acesso em: 08 maio 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Viruses in food**: scientific advice to support risk management activities: meeting report. Rome, 2008. 58 p. (Microbiological Risk Assessment Series, n. 13). Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_fruitveges/en>. Acesso em: 11 dez. 2017.

_____. Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables. In: CODEX Alimentarius: International food standards. 2017. (CAC/RCP 53-2003). Disponível em: <<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/pt/>>. Acesso em: 11 maio 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **The FDA takes important steps in modernizing the food safety system**. 2015. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm461437.htm>>. Acesso em: 29 set. 2016).

FERREIRA, F. F. M. et al. Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. **Water Science and Technology**, v. 60, n. 3, p. 633-642, 2009.

FONG T. T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, p.357-371, 2005.

FONG T. T. et al. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 715-723, 2010.

FOX B. K. et al. A preliminary study of microbial water quality related to food safety in recirculating aquaponic fish and vegetable production systems, **Food Safety and Technology**. FST-51. p. 1-11, Oct. 2012.

FUMIAN T. M. et al. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. **Journal of Virology Methods**, v.155, p. 39-43, 2009.

_____. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **Journal of Virological Methods**, v. 170, n. 1, p. 42-46, 2010.

FUMIAN T. M. **Detecção e caracterização molecular de vírus entéricos em águas residuárias na cidade do Rio de Janeiro**. 2011. 136f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2011.

GELDERBLOM, H. R. **Structure and classification of viruses**. 1996.

GERBA, C. P. et al. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.5167-69, 2002.

GERBA, C. P.; CHOI C. Y. Role of irrigation water in crop contamination by viruses. In: **VIRUSES in Foods**. Springer US, 2006. p. 257-263.

GIRONES, R. Tracking viruses that contaminate environments. **Microbe-American Society for Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 19, 2006.

GIRONES R. et al. Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v. 44, n. 15, p. 4325-4339, 2010.

GLASS, R. I. et al. The control of rotavirus gastroenteritis in the United States. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 123, p. 36, 2012.

GLOBAL POLIO ERADICATION INICIATIVE et al. **Polio eradication and endgame strategic plan 2013-2018**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2016.

GUO, Z. et al. A food-borne outbreak of gastroenteritis caused by norovirus GII in a university located in Xiamen City, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p. 101-106, 2014.

HAMZA I. A. et al. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, v. 43, n. 10, p. 2657-2668, 2009.

_____. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 424-436, 2011.

HARAMOTO E. et al. Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. **Journal of Virology Methods**, v.142, p.169-173, 2007.

_____. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. **Water Research**, v. 44, n. 6, p. 1747-1752, 2010.

HARDY M. E. Norovirus protein structure and function. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, n. 1, p. 1-8, 2005.

HASSANAIN N. A. et al. Public health importance of foodborne pathogens. **World Journal of Medical Sciences**, v. 9, p. 208-222, 2013.

HAVELAAR, A. H. et al. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 12, p. e1001923, 2015.

HEIM, Albert et al. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real- time PCR. **Journal of Medical Virology**, v. 70, n. 2, p. 228-239, 2003.

HENNECHART-COLLETTE C. et al. Comparison of three extraction methods to detect noroviruses in dairy products. **Food Microbiology**, v. 61, p. 113-119, 2017.

_____. Multiplex real- time RT- qPCR for the detection of Norovirus in bottled and tap water using murine norovirus as a process control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 179-190, 2014.

HERNROTH, B. E. et al. 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**, v. 68, n. 9, p. 4523-4533, 2002.

HODGSON K. R. et al. Bacteriophages as enteric viral indicators in bivalve mollusc management. **Food Microbiology**, v. 65, p. 284-293, 2017.

HOLVOET K. et al. Relationships among hygiene indicators and enteric pathogens in irrigation water, soil and lettuce and the impact of climatic conditions on contamination in the lettuce primary production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 21-31, 2014.

HOVI T. Surveillance for polioviruses. **Biologicals**, v. 34, n. 2, p. 123-126, 2006.

HOVI T. et al. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. **Epidemiology and Infection**, v. 140, n. 1, p. 1, 2012.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Genus**: enterovirus. 2017. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus>. Acesso em: 25 set. 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TS 15216-1**: microbiology of food and animal feed-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: method for quantification. Geneva, Switzerland, 2017.

_____. **ISO/TS 15216-2**: microbiology of food and animal feed-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection. Geneva, Switzerland, 2013.

ITURRIZA-GOMARA, M.; O'BRIEN, S. J. Foodborne viral infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 495-501, 2016.

JAHAN, S. Epidemiology of foodborne illness. In: SCIENTIFIC, Health and Social Aspects of the Food Industry. InTech, 2012.

JIANG, S. et al. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 179-184, 2001.

JUNG, Y. et al. Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 517-527, 2014.

KAGEYAMA, T. et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1548-1557, 2003.

KATAYAMA, H. et al. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1033-39, 2002.

_____. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. **Water Research**, v. 42, n. 6, p. 1441-1448, 2008.

KIRK, M. D. et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 12, p. e1001921, 2015.

KOOPMANS M. et al. Foodborne viruses. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 187-205, 2002.

KOOPMANS M.; DUIZER E. Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 1, p. 23-41, 2004.

KOOPMANS, M. Food-borne viruses from a global perspective. In: IMPROVING food safety through a one-health approach: workshop summary. National Academies Press, 2012. p. 225.

LEIFELS M. et al. From Lab to Lake—Evaluation of Current Molecular Methods for the Detection of Infectious Enteric Viruses in Complex Water Matrices in an Urban Area. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0167105, 2016.

LIN J.; GANESH, A. Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 23, n. 6, p. 484-506, 2013.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **The Lancet**, v. 388, n. 10063, p. 3027-3035, 2016.

LÓPEZ- GÁLVEZ, F. et al. Occurrence of enteric viruses in reclaimed and surface irrigation water: relationship with microbiological and physicochemical indicators. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 4, p. 1180-1188, 2016.

LOVE D. C.; SOBSEY, M. D. Simple and rapid F+ coliphage culture, latex agglutination, and typing assay to detect and source track fecal contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4110-4118, 2007.

MALUF, R. S. et al. Nutrition-sensitive agriculture and the promotion of food and nutrition sovereignty and security in Brazil. **Ciencia & Saúde Coletiva**, v. 20, n. 8, p. 2303-2312, 2015.

MARAFON, G. J.; RIBEIRO, M. A. Agricultura familiar, pluriatividade e turismo rural: reflexões a partir do território fluminense. **Revista Rio de Janeiro**, n. 18-19, p. 111-130, 2006.

MARSHALL, J. A.; BRUGGINK, L. D. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 4, p. 1141-1149, 2011.

MARTI E.; BARARDI C. R. M. Detection of human adenoviruses in organic fresh produce using molecular and cell culture-based methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 230, p. 40-44, 2016.

MATTISON, K. et al. Enteric viruses in ready-to-eat packaged leafy greens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1815, 2010.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v. 153, n. 8, p. 1621-1629, 2008.

_____. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**. v.156, n.8, p.1397-1413, 2011.

MCLINDEN T. et al. Component costs of foodborne illness: a scoping review. **BMC Public Health**, v.14, n.1, p.509, 2014.

MEDICI, M. et al. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 35, p. 1-5, 2015.

MELGAÇO F. G. **Avaliação da metodologia de floculação orgânica para recuperação de vírus entéricos em frutas e queijos**. 2016. 102 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2016.

MELGAÇO F. G. et al. Virus recovering from strawberries: Evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 14-19, 2016.

MENA K. D.; GERBA, C. P. Waterborne adenovirus. In: **REVIEWS of Environmental Contamination and Toxicology**. Springer New York, 2008. p. 133-167.

METCALF T. G. et al. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 461-487, 1995.

MIAGOSTOVICH M. P. et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.2, p. 375-382, 2008.

_____. Assessment of water quality in a border region between the Atlantic forest and an urbanised area in Rio de Janeiro, Brazil. **Food and Environmental Virology**, v. 6, n. 2, p. 110-115, 2014.

MIE A. et al. Human health implications of organic food and organic agriculture: a comprehensive review. **Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 111, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2016. Disponível em:
<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

MORALES-RAYAS, R. et al. Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 48-55, 2010.

MORILLO, S. G. et al. Rapid detection of norovirus in naturally contaminated food: foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil, 2010. **Food and Environmental Virology**, v. 4, n. 3, p. 124-129, 2012.

_____. Norovirus GII. Pe Genotype: tracking a foodborne outbreak on a cruise ship through molecular epidemiology, Brazil, 2014. **Food and Environmental Virology**, v. 9, n. 2, p. 142-148, 2017.

MORILLO S. G; TAVARES TIMENETSKY, M. C. S. Norovírus: uma visão geral. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p. 462-467, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Sharing research data**. Washington, DC: The National Academies Press, 1985. DOI <https://doi.org/10.17226/2033>.

NDIAYE, A. K. et al. Environmental surveillance of poliovirus and non-polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007-2013). **The Pan African Medical Journal**, v. 19, 2014.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases: the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S3-S15, 2010.

NYACHUBA D. G. Foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 257-269, 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION. **OECD-FAO Agricultural Outlook**. Paris: OECD Publishing, 2015.

OKOH A. I. et al. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 6, p. 2620-2637, 2010.

PACHEPSKY, Y. et al. 2 Irrigation Waters as a Source of Pathogenic Microorganisms in Produce: A Review. **Advances in Agronomy**, v. 113, n. 7, 2011.

PALLANSCH, M. A. et al. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p.490 - 530.

PANDEY, Pramod K. et al. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 51, 2014.

PANG, X. L. et al. Influence of novel norovirus GII. 4 variants on gastroenteritis outbreak dynamics in Alberta and the Northern Territories, Canada between 2000 and 2008. **PloS One**, v. 5, n. 7, p. e11599, 2010.

PARASHAR, U. D. et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, p. S9-S15, 2009. Suppl. 1.

PARRA, G. I.; GREEN, K. Y. Genome of emerging norovirus GII.17, United States, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1477, 2015.

PATEL M. M. et al. Noroviruses: A comprehensive review. **Journal of Clinical Virology**, v.44, n. 1, p. 1-8, 2009.

PETRÓPOLIS: guia do investidor 2012. Disponível em:
<http://www.petropolis.rj.gov.br/sta/images/guia_do_investidor.pdf>. Acesso em 12 dez 2017).

PINA S. et al. Characterization of a strain of infectious hepatitis E virus isolated from sewage in an area where hepatitis E is not endemic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4485-4488, 1998.

PINTÓ, R. M. et al. Detection of fastidious infectious enteric viruses in water. **Environmental Science & Technology**, v. 29, n. 10, p. 2636-2638, 1995.

QU, L. et al. Replication of human norovirus RNA in mammalian cells reveals lack of interferon response. **Journal of Virology**, v. 90, n. 19, p. 8906-8923, 2016.

RAJAL V. B. et al. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. **Water Research**, v. 41, n. 7, p. 1411-1422, 2007.

RAMES, E. et al. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. **Water Research**, v. 96, p. 308-326, 2016.

REMBIAŁKOWSKA E. Quality of plant products from organic agriculture. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 15, p. 2757-2762, 2007.

RODRIGUES M. M. et al. Indícios de Rotavírus na etiologia de um surto de infecção de origem alimentar. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 88-93, 2004.

RODRIGUEZ-LAZARO D. et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 786-814, 2012.

ROSER M. **Life expectancy**. Oxford, Our World in Data, 2016. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/life-expectancy/>>. Acesso em: 5 jan. 2017.

RUSIÑOL, M. et al. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. **Water Research**, v. 59, p. 119-129, 2014.

SÁNCHEZ, G. et al. Single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 1-2, p. 9-13, 2012.

SANTANA, N. G. et al. Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 255-261, 2009.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7, 2011.

SCHERER, K. et al. Application of a swab sampling method for the detection of norovirus and rotavirus on artificially contaminated food and environmental surfaces. **Food and Environmental Virology**, v. 1, n. 1, p. 42, 2009.

SCHERER K. et al. Avaliação bacteriológica e físico-química de águas de irrigação, solo e alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Ambiente & Água**, v. 11, n. 3, p. 665, 2016.

SCHLINDWEIN A. D. et al. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. **Water Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 537-544, 2010.

SEUFERT V. et al. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 229-232, 2012.

SEYMOUR, I. J.; APPLETON, H. Foodborne viruses and fresh produce. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 759-773, 2001.

SHUKLA, S. et al. Prevalence and evaluation strategies for viral contamination in food products: Risk to human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 405-419, 2018.

SIDHU, J. P. S.; TOZE, S. G. Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 187-201, 2009.

SIEBENGA, J. Joukje et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII. 4 variants, 2001–2007. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 5, p. 802-812, 2009.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (**SINAN net**). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. Ed. Brasília, 2014. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf> Acesso em: 09 maio 2017.

STALS, A. et al. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 1-9, 2012.

STEELE M.; ODUMERU J. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2839-2849, 2004.

STOECKEL, D. M. Fecal contamination of irrigation water: Keep it off the dinner table. In: **Proceedings of the 54th New Jersey annual vegetable meeting**. 2009. p. 100-102.

TAMARU C. S. et al. **Testing for water borne pathogens at an aquaponic farm**. Honolulu: College of Tropical Agriculture and Human Resources. 2012.

TATE J. E. et al. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, p. S96-S105, 2016. Suppl. 2.

THOMPSON S. S. et al. Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. **Water Environment Research**, v. 75, n. 2, p. 163-170, 2003.

TONDO E. C. et al. Avanços da segurança de alimentos no Brasil. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 122-130, 2015.

TREE J. A. et al. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2038-2043, 2003.

USEPA. 2016. Drinking water contaminant candidate list 4: final. **Federal Register**, v. 81, n. 222, p. 81099-114, 2016.

UYTTENDAELE M. et al. Microbial hazards in irrigation water: Standards, norms, and testing to manage use of water in fresh produce primary production. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 336-356, 2015.

VAN BEEK, J. et al. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II. 4, late 2012. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 1, p. 8-9, 2013.

VAN ZYL, W. B. et al. Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in southern Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4554-60, 2006.

VERHOEF, L. et al. Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 238, 2008.

_____. An integrated approach to identifying international foodborne norovirus outbreaks. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 412, 2011.

VIEIRA C. B. et al. Vírus entéricos na Lagoa Rodrigo de Freitas. **Oecologia Australis**, v.16, p.540-65, 2012.

VINJÉ J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 373-381, 2015.

WALDMAN E. A.; SATO A. P. S. Trajetória das doenças infecciosas no Brasil nos últimos 50 anos: um contínuo desafio. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 68, 2016.

WARD, R. L. et al. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 748-753, 1984.

WEI J. et al. Murine norovirus-1 internalization into *Lactuca sativa* during irrigation. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011.

WILKES G. et al. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. **Water Research**, v. 43, n. 8, p. 2209-2223, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture**. In: REPORT of a WHO Scientific Group. WHO: Geneva, Switzerland, 1989. (Technical Report Series, n. 778).

_____. **WHO global strategy for food safety: safer food for better health**. Geneva: The Organization, 2002.

_____. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation, 2003. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67854/1/WHO_V-B_03.03_eng.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Polio laboratory manual**. 4th ed. WHO/IVB/04.10, and supplement to the WHO polio laboratory manual. Geneva, Switzerland, 2004.

_____. **WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater: volume II Wastewater use in Agriculture**. Geneva, 2006.

_____. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: meeting report. In: MICROBIOLOGICAL hazards in fresh leafy vegetables and herbs: meeting report. Geneva: WHO, 2008a.

_____. **Microbiological hazards in fresh fruits and vegetables**. 2008b. (Microbiological risk assessment series). Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_FruitVegetables.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2017.

_____. **Diarrhoea: why children are still dying and what can be done**. Geneva: UNICEF/WHO, 2009.

_____. WHO/UNICEF JOINT WATER SUPPLY, SANITATION MONITORING PROGRAMME. **Progress on sanitation and drinking water: 2015 update and MDG assessment**. Geneva, 2015a.

_____. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. Geneva, 2015b.

_____. **Wild poliovirus list:** global polio eradication initiative. Geneva, 2015c. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek/Wildpolioviruslist.aspx>> Acesso em: 22 jun. 2017.

_____. **Financial resource requirements 2013-2019:** global polio eradication initiative. UNICEF, 2016. Disponível em: <<http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/this-week/>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

_____. **Semi-annual status report july to december 2016:** global polio eradication & endgame strategic plan. UNICEF, 2017. Disponível em: <http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2017/04/Status-Report_Jul-Dec2016.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2017.

YIN, J. L. et al. 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**, v. 79, n. 3, p. 213, 2001.

ZENG, S. Q. et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of Virological Methods**, v. 153, n. 2, p. 238-240, 2008.

ZHENG, D. P. et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, v.346, p.312-23, 2006.

ANEXOS

ANEXOS 1 - Dissemination of gastroenteric viruses in the production of lettuce in developing countries: a public health concern.



FEMS Microbiology Letters, 364, 2017, fnx085

doi: 10.1093/femsle/fnx085

Advance Access Publication Date: 21 April 2017

Research Letter

RESEARCH LETTER – Food Microbiology

Dissemination of gastroenteric viruses in the production of lettuce in developing countries: a public health concern

Lucia M. C. Werneck^{1,*}, Carmen B. Vieira², Tulio M. Fumian²,
Thalles Borges Caetano¹, Jarbas Emílio dos Santos¹,
Fernando César Ferreira², Marcia Maria Pimenta²
and Marize P. Miagostovich²

¹National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), 4365 Rio de Janeiro, Brazil and ²Oswaldo Cruz Foundation (IOC), Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, 21040-900, Brazil

*Corresponding author: National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Brasil, 4365 Rio de Janeiro, Brazil. Tel: +552138655169; Fax: +552122900915; E-mail: lucia.werneck@incqs.fiocruz.br

One sentence summary: Gastroenteric viruses were detected in a lettuce production chain in Brazil, representing a public health concern.

Editor: Wolfgang Kneifel

ABSTRACT

Investigation of major viruses responsible for acute viral gastroenteritis, such as norovirus (NoV), rotavirus species A (RVA) and human adenovirus (HAdV), was conducted in the mountainous region of the state of Rio de Janeiro in a lettuce-producing area. Irrigation water and lettuce samples were collected at different production stages. Viruses were concentrated using an adsorption-elution method and detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). We detected HAdV in all collection points, although no virus infectivity was shown. The RVA was the most prevalent virus from both water (16.7% [10/60]) and lettuce samples (11.1% [4/36]), with loads ranging from 2.97×10^2 to 6.88×10^3 genomic copies per litre (gc L⁻¹) and 6.24×10^2 to 1.30×10^4 gc per 25 g, respectively. NoV was detected in 8.33% [8/96] in water and lettuce samples, with concentrations ranging from 7.29×10^1 to 1.92×10^3 gc L⁻¹ and from 4.29×10^1 to 2.98×10^3 gc 25 g⁻¹, respectively. *Escherichia coli* values also demonstrated poor quality of the irrigation and washing water. The presence of at least two different virus strains in all sites reveals the need to improve basic sanitation measures in order to increase food safety.

Keywords: irrigation water; food; gastroenteric viruses; lettuce

INTRODUCTION

For over 100 years, irrigation and fertilisation of food crops using water contaminated with faeces have played a major role in the transmission of enteric organisms such as viruses (Gerba and Choi 2006). The potential of pathogenic organisms transferred from irrigation water to the surface of fresh produce,

combined with their ability to survive in these unfavourable circumstances, offers conditions where consumers unknowingly face high risks of being infected with harmful organisms when consuming fresh produce (Britz and Sigge 2012). There are several factors that contribute to food risks for consumers, including agricultural practices, poor hygiene at all stages of the

Received: 10 January 2017; Accepted: 18 April 2017
© Crown copyright 2017.

food production chain, lack of preventive controls in food processing and preparation operations, contaminated water used for irrigation, inadequate or improper storage, etc. (WHO 2008).

Focusing on public health and consumer protection, manuals such as Good Agricultural Practices, Good Manufacturing Practices and Hazard Analysis Critical Control Point describe procedures to be applied in the processing facilities (CFIA 2014) in order to prevent contamination of vegetables and fruits with microbial pathogens.

In developed countries, current agricultural production takes special care of food safety and quality, in addition to consumer awareness of food safety issues (FAO 2003). However, in many parts of the world, agriculture still does not meet these standards; mainly in the case of organic agriculture, greater attention is needed, especially regarding hygiene procedures carried out in the production area (Chander et al. 2011). Organic agriculture is a sustainable management system aimed at environmental preservation as well as increasing agrobiodiversity and the quality of human life (Seufert, Ramankutty and Foley 2012); however, some authors comment on its high risk and contamination by viruses, bacteria and fungi (Rembalkowska 2007; Schuler, Frangoul and Domm 2010; de Quadros Rodrigues et al. 2014; Marti and Barardi 2016). Microbial pathogens associated with raw vegetables include *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Norovirus* (Norwalk-like viruses), hepatitis A virus and protozoan parasites such as *Cryptosporidium* (Hassanain et al. 2013).

In this context, organic lettuce (*Lactuca sativa*) has been acknowledged as an important transmission source of enteric viruses, since it is traditionally eaten raw or receives minimal processing (Gerba and Choi 2006). This study aims to assess the dissemination of major viruses responsible for acute gastroenteritis, such as the norovirus genogroup II (NoV GII), rotavirus species A (RVA) and human adenovirus (HAdV), in an organic lettuce production site located in the municipality of Petropolis, a mountainous region in Rio de Janeiro, Brazil, and the largest producer of organic agriculture in the state.

MATERIALS AND METHODS

Study site and sampling collection

This study was carried out in an organic production site located in the Brejal region, municipality of Petropolis, in the mountains of Rio de Janeiro, Brazil, characterised by a high-altitude tropical climate with milder and wet summers and moderately cold and dry winters. The average annual temperature is 19°C, with an annual precipitation of 2400 mm (Petropolis 2012). The lettuce production occupies a region of 30 000 m², divided into two areas. In the first area, the seedlings are grown for a period of 20 to 30 days and subsequently transferred to another area located 2 km away for cultivation, harvesting, washing and packing for commercialisation. The average time of lettuce production is 60 days; different sources of water are used in each area (Fig. 1).

We collected 2 L of water and three samples of lettuce, including seedlings, at different production stages in two collection campaigns weekly in August 2010 and biweekly during May to August 2011, totalling 96 samples. Five water samples (W1–5) and three lettuce samples (L1–3) were collected in sites marked by Global Positioning System (eTREX Legend H, Garmin Ltd, Olathe, KS, USA) as follows: W1—seedling irrigation water; W2—catchment spring water; W3—dam water; W4—lettuce irrigation water; W5—lettuce wash water; L1—seedlings; L2—lettuces; L3—washed lettuce.

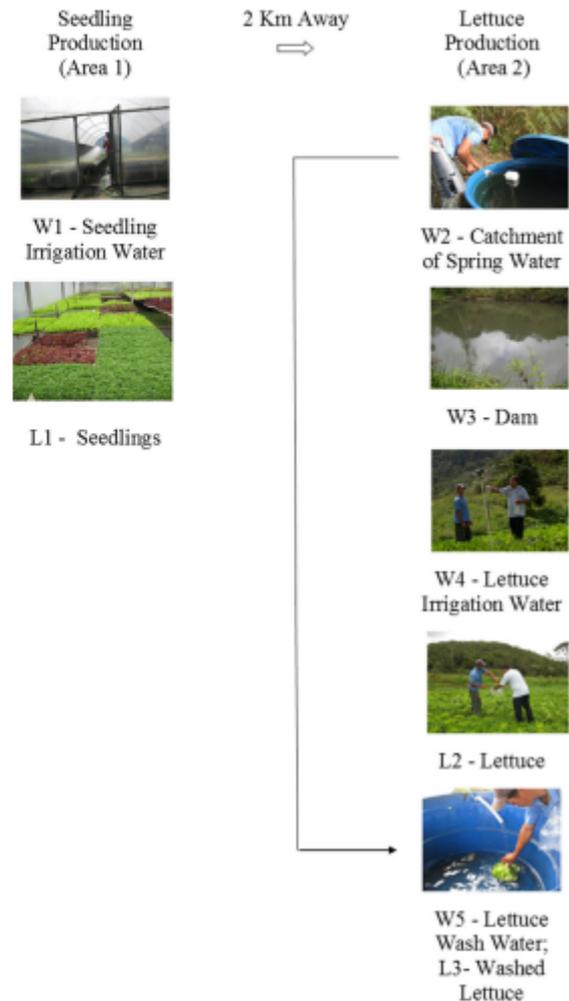


Figure 1. Flow of organic lettuce production.

Viral concentration methods

Water was processed for viral concentration using an adsorption-elution method with a negatively charged membrane as described previously by Katayama, Shimasaki and Ohgaki (2002). For lettuce samples, 25 g were concentrated via the same method adapted for small volumes (~120 mL), using a 0.45- μ m negative charge membrane with a Stericup® filter (250 mL) (Nihon, Millipore, USA); ultrafiltration was performed with a Centriprep Concentrator® 50 (Nihon) to obtain a final volume of 2 mL (Fumian et al. 2009).

Virus detection and quantification

Nucleic acids were extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. For NoV GII and RVA, cDNA was obtained by reverse transcription using a random hexamer (PdN6, A260 units, Amersham Biosciences, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK).

Table 1. Viruses analysed, primers and probe sequences, genome regions and references of qPCR assays.

| Viruses | Primers and probe | Sequences 5'-3' | Genome region | References |
|---------|-------------------|---|--------------------|------------------------|
| RVA | NSP3 F | ACCATCTWCACRTRAGCCCTCTATGAG | NSP3 | Zeng et al. (2008) |
| | NSP3 R | GGTCACATAAGCCCCCTATAGC | | |
| | NSP3 probe | VIC-AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA-MGB | | |
| HAdV | AQ1 F | GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT | Hexon | Heim et al. (2003) |
| | AQ2 R | GCCCCAGTGGTCTTACATGCACATC | | |
| | Probe | FAM-TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA-TAMRA | | |
| NoV GII | COG2F | CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG | ORF1-ORF2 junction | Kageyama et al. (2003) |
| | COG2R | TOGAGCCCATCTTCATTACA | | |
| | RING2-probe | FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA | | |

HAdV, human adenovirus; NoV GII, norovirus genogroup II; RVA, rotavirus species A.

Viruses were detected and quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), using primers and probes described previously (Table 1). The qPCR was performed using TaqMan Universal PCR Master Mix[®] (Applied Biosystems, CA, USA) in ABI 7500[®] (Applied Biosystems, Singapore). For all qPCR protocols, positive, negative and non-template controls were included. Three separate rooms were used for all molecular procedures to avoid cross-contamination of samples.

HAdV infectivity

Infectivity assays using three cell lines were performed to determine HAdV infectivity. Confluent monolayers of adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549), human embryonic kidney cells 293 (HEK 293) and human epithelial type 2 (HEp-2) used were separately prepared in 15-mL tubes (Corning[®], Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) for the assay; 200 μ L of each sample were inoculated and incubated for 60 min at $37 \pm 2^\circ\text{C}$, swinging every 15 min for virus adsorption. Tubes were then filled with 1.8 mL of maintenance medium (98% Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM, Gibco, Life Technologies, USA [A549] and Minimum Essential Medium-MEM, Gibco, Life Technologies [HEK 293 and HEp-2] + 2% HyClone fetal bovine serum - FBS, Thermo Scientific, Scoresby, Victoria, Australia). Inoculated cell tubes were monitored daily using optical microscopy. For each cell line, the inoculum was submitted to three passages with a 7-day incubation interval at 37°C when monolayers were pipetted and subjected to three freeze/thaw cycles for cell lysis and viral release for inoculation. After 21 days, the cell culture was processed for qPCR (Table 1).

Human adenovirus 35 (HAdV 35), kindly donated by Dr Annika Allard, Umea University, Sweden, and DMEM and MEM were used as positive and negative controls, respectively. They were processed under the same conditions as the field samples.

Internal process control

Bacteriophage PP7 was spiked in 24 water samples as internal process control (IPC). The PP7 was kindly provided by Dr. Verónica Rajal (Salta University, Argentina) and was produced by cultivation in the host *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692) (Rajal et al. 2007).

Microbiological and physicochemical parameters

To assess water quality, total coliforms and *Escherichia coli* were quantified by Colilert[®] Quanti-Tray[®]/2000 (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). Results were reported as most

probable number per 100 mL (MPN 100 mL⁻¹). The Brazilian regulation specifies a maximum of 200 MPN 100 mL⁻¹ of *E. coli* for irrigation water (Brasil 2005).

Water temperature ($^\circ\text{C}$), pH, turbidity (in nephelometric turbidity units, NTU) and conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$) were measured in all samples at the time of collection using a Water Quality Checker U-10 (Horiba, Ltd, Irvine, CA, USA).

RESULTS

From a total of 96 samples, viruses were detected in 35% (21/60) and 30% (11/36) of water and lettuce samples, respectively. At least two distinct viral agents were detected in all collection points (water and lettuces), with concentrations ranging from 1 log₁₀ (observed only for NoV GII) to 2–3 log₁₀ genomic copies per litre (gc L⁻¹), except lettuce, where RVA concentration reached 1.30×10^4 gc 25 g⁻¹ (Tables 2 and 3). Bacteriophage PP7 was recovered in 86.7% of the analysed water samples.

A total of 11 HAdV-positive samples by qPCR were inoculated to attempt viral isolation in the three cell lines described. After three consecutive passages of 7 days, qPCR was carried out in paired samples (initial concentrates and cultures); there was no reduction in Cts values, revealing no virus replication.

Table 4 presents the results of characterisation of microbiological quality and physicochemical parameters of water samples. *Escherichia coli* was detected at all points. However, at W1, the value exceeded the 200 MPN mL⁻¹ limit used as a criterion for the quality of irrigation water. At this site, water also presented a higher conductivity value when compared to the other sites. Figure 2 presents the microbiological results obtained in samples of water used for irrigation and washing, evidencing that the presence of viruses in waters did not exceed the values established by the Brazilian resolution act.

DISCUSSION

This study investigated the presence of NoV GII, RVA and HAdV (considered as indicators of human faecal contamination) in order to demonstrate the environmental contamination in an organic lettuce production located in an important agricultural zone of Rio de Janeiro, Brazil. Viral dissemination was observed in all water samples used throughout the entire production chain, regardless of the different sources (seedlings and lettuces). The poor quality of the water used in the process was undoubtedly a determinant of the viral concentrations detected in the different stages of lettuce production. These results reveal how neglect in basic sanitation impacts the vegetable production chain, emphasising that this region concentrates 50% of

Table 2. Detection and quantification of rotavirus species A (RVA), norovirus genogroup II (NoV GII) and human adenovirus (HAdV) in water samples according to collection sites (n = 12 per site).

| Water sample collection sites | No of positive (%) | | | | Viruses | | | |
|-------------------------------|--------------------|--|----------|--|----------|--|-------------|---|
| | NoV GII | | RVA | | HAdV | | Any viruses | |
| W1 | 1 (8.3) | 1.92×10^3 | 2 (16.7) | 2.11×10^3 6.88×10^3 | 3 (25.0) | 2.65×10^3 1.16×10^2 1.71×10^2 | 6 (50.0) | 1.16×10^2 – 6.88×10^3 |
| W2 | ND | ND | 3 (25.0) | 1.27×10^3 1.19×10^3 2.97×10^2 | 1 (8.3) | 1.92×10^2 | 4 (33.3) | 1.92×10^2 – 1.27×10^3 |
| W3 | 1 (8.3) | 7.29×10^1 | 3 (25.0) | 3.93×10^2 7.50×10^2 7.20×10^2 | 1 (8.3) | 3.76×10^2 | 5 (41.7) | 7.29×10^1 – 7.50×10^2 |
| W4 | 2 (16.7) | 7.29×10^2 8.57×10^1 | 1 (8.3) | 2.38×10^3 | 1 (8.3) | 4.51×10^3 | 4 (33.3) | 8.57×10^1 – 4.51×10^3 |
| W5 | ND | ND | 1 (8.3) | 2.03×10^3 | 1 (8.3) | 2.15×10^2 | 2 (16.7) | 2.15×10^2 – 2.03×10^3 |

W1, seedling irrigation water; W2, catchment of spring water; W3, dam; W4, lettuce irrigation water; W5, lettuce wash water; ND, not detected.

Table 3. Detection of rotavirus species A (RVA), norovirus genogroup II (NoV GII) and human adenovirus (HAdV) in lettuce samples (n = 12 per site).

| Lettuce sample collection sites | No. of positive (%) | | | | Viruses | | | |
|---------------------------------|---------------------|--|----------|--|----------|--|-------------|---|
| | NoV GII | | RVA | | HAdV | | Any viruses | |
| L1 | 1 (8.3) | 2.98×10^3 | 3 (25.0) | 5.10×10^3 2.98×10^3 2.98×10^3 | 1 (8.3) | 4.39×10^2 | 5 (41.7) | 4.39×10^2 – 5.10×10^3 |
| L2 | 2 (16.7) | 1.16×10^3 4.29×10^1 | 1 (8.3) | 1.30×10^4 | 1 (8.3) | 5.67×10^2 | 4 (33.3) | 4.29×10^1 – 1.30×10^4 |
| L3 | 1 (8.3) | 1.50×10^2 | ND | ND | 2 (16.7) | 3.74×10^2 5.65×10^2 | 3 (25.0) | 1.50×10^2 – 5.65×10^2 |

L1, seedlings; L2, lettuce; L3, washed lettuce; ND, not detected.

Table 4. Microbiological and physicochemical mean values of 12 water samples per collection site.

| Sample collection sites | Bacteria mean (min–max) | | Physicochemical mean (min–max) | | | |
|-------------------------|--|----------------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------|
| | Total coliforms MPN 100 mL ⁻¹ | E. coli MPN 100 mL ⁻¹ | Temperature, °C | pH | Conductivity μ S cm ⁻¹ | Turbidity NTU |
| W1 | 3069.8 (767–15500) | 279.9 (26.03–779.04) | 16.7 (13.9–23.1) | 7.0 (5.70–7.75) | 0.74 (0.010–0.156) | 31.9 (5–169) |
| W2 | 909.9 (40–1610) | 16.7 (1–74.3) | 16.6 (14.1–23.1) | 6.0 (4.75–6.75) | 0.01 (0.012–0.016) | 34.2 (10–65) |
| W3 | 2788.0 (368–19400) | 33.8 (12–103) | 17.3 (15.8–23.1) | 5.7 (5.22–6.46) | 0.03 (0.012–0.016) | 24.6 (10–52) |
| W4 | 1665.4 (184–8112) | 51.7 (1–147.6) | 16.9 (14.3–23.1) | 6.2 (5.05–7.31) | 0.05 (0.015–0.270) | 39.1 (10–87) |
| W5 | 12470.5 (159–91400) | 18.9 (1–113) | 17.4 (12.7–23.1) | 6.3 (4.81–7.07) | 0.22 (0.011–0.041) | 12.3 (7–25) |
| Total | 4180.7 (40–91400) | 80.2 (1–779.04) | 17.0 (12.7–23.1) | 6.3 (4.75–7.75) | 0.21 (0.010–0.270) | 28.4 (5–169) |

MPN, most probable number; W1, seedling irrigation water; W2, catchment of spring water; W3, dam; W4, lettuce irrigation water; W5, lettuce wash water.

cultivated land of the whole state, with production destined mainly for supply to the metropolitan area of Rio de Janeiro (Marafon et al. 2005). Previously, Abreu et al. (2010) have found that irrigation water and vegetable contamination with microorganisms is a reality in Brazilian agriculture and the contamination of fresh, ready-to-eat fruits and vegetables with pathogens is a significant issue. The prevalence of enteric viruses in water used for irrigation has been described previously (Fong and Lipp 2005; Cheong et al. 2009; López-Gálvez et al. 2016), and RVA has been found in 14% of irrigation water samples and in 1.7% of raw vegetable samples in South Africa (van Zyl et al. 2006).

In this study, it was not possible to associate viral detection with organic production. The lack of data available on the difference of viral transmission between food from organic and conventional farms and the hazard in both productions have been described previously (Lairon 2010; Smith-Spangler et al. 2012).

The high RVA percentage in the environment corroborated previous findings in developing countries that revealed those viruses as important contaminants, even after the onset of the vaccine era in 2006 (Ruiz-Palacios et al. 2006; Miagostovich et al. 2008; Fumian et al. 2011; Vieira et al. 2012). The RVA excretion rate (10^5 to 10^{11} per g faeces), coupled with a lack of sanitation,

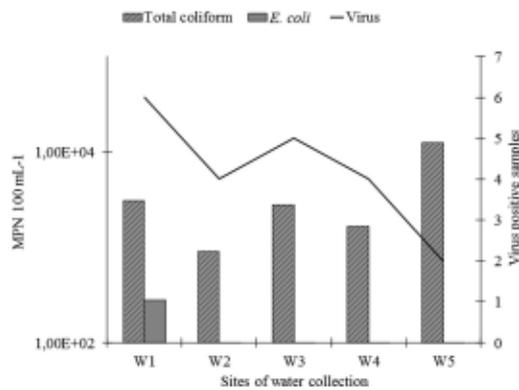


Figure 2. Average values of total coliforms, *E. coli* and any viruses studied. W1, seedling irrigation water; W2, catchment of spring water; W3, dam; W4, lettuce irrigation water; W5, lettuce wash water; MPN, most probable number per 100 mL.

can explain the high level of contamination detected in the State of Rio de Janeiro. Although the RVA percentage was higher than that of HAdV, it is important to note that the latter virus was detected in all points studied. In previous studies, HAdV has been described as a marker of human faecal contamination in water matrices since it is prevalent, stable in the environment, species-specific and has no seasonality (Bofill-Mas et al. 2006, 2013; Girones 2006). HAdV infectivity can be demonstrated since those viruses replicate in different types of cell lines (Perron-Henry, Herrmann and Blacklow 1988; Witt and Bousquet 1988; Siqueira-Silva et al. 2009). In this study, it was not possible to demonstrate infectivity of detected viruses, even using three different cell lines. It is important to emphasise that molecular methods detected nucleic acid from infectious or non-infectious particles and that there is a reduction in viral concentration when comparing data obtained by qPCR and cell cultures (Girones et al. 2010; Leifels et al. 2016). In a study evaluating the contamination of fresh produce, Marti and Barardi (2016) did not detect infectious virus particles in lettuces, despite the detection in green onions. Using the same methodology, HAdV infectivity could be demonstrated for tap water (Miagostovich et al. 2014).

We found NoV GII in lower concentration in the environment, corroborating the findings of previous studies carried out in different environmental matrices in the State (Vieira et al. 2012). Although NoV GI and GII are associated with food-borne outbreaks (Bitler et al. 2013; Huang et al. 2013; Torner et al. 2016), in this study, we restricted our research to the GII, mainly due to its impact on epidemiological data obtained in Rio de Janeiro State (Victoria et al. 2007; Ferreira et al. 2010; Fioretti et al. 2011). Previously, Brandão et al. (2014) have not detected NoV in three types of lettuce obtained in markets of Rio de Janeiro. In a study conducted in Accra, Ghana, assessing the use of wastewater in agriculture, none of the samples from farms and markets were found positive for norovirus GI and GII, while 9% ($n = 57$) of farm produce and 7% ($n = 85$) of market produce samples were positive for adenovirus (Antwi-Agyei et al. 2015). In a different study, NoV could be detected in leafy greens obtained from markets in Canada, Belgium and France in 2009 and 2010, with values of 28.8%, 33.3% and 50%, respectively (Baert et al. 2011).

The detection of viruses in environmental samples presents some challenges, mainly regarding the representativeness of samples as well as the inhibition of molecular reactions by sub-

stances present in concentrated samples. In this study, bacteriophage PP7 was used as IPC in 25% of the water samples with recovery rate of 86.7%, revealing little inhibition of the methodology used, as previously described (Rajal et al. 2007). In previous research, this bacteriophage was successfully used as IPC for water and lettuce matrices (Rajal et al. 2007; Fumian et al. 2010; Brandão et al. 2014).

Our results point out the need to observe food safety in places where the lack of basic sanitation is remarkable. The impact of viral contamination in lettuce production should be considered since this knowledge can be the first step in implementing measures to provide safer food. Considering the difficulties of eliminating viral contamination from foods (Cook, Knight and Richards 2016), our results reinforce the urgent need to implement basic sanitation in agricultural areas, avoiding contamination in the first stages of the production chain. In this production area, two different sources of water are used. Although the catchment of spring water in the second area has shown satisfactory physicochemical and microbiological qualities, both sources present viral contamination. The difficulty in establishing the origin of food contamination is well recognised, and viral contamination is often attributed to food handlers at the end of the production chain (Gil et al. 2015; Cook, Knight and Richards 2016).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Brejal producer, EMATER (Rio de Janeiro Technical Assistance and Rural Extension firm) for irrigation water supply and the INCQS (National Institute of Quality Control in Health) group. This research work is within the scope of the activities of FIOCRUZ as a collaborating centre of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

FUNDING

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ).

Conflict of interest. None declared.

REFERENCES

- Abreu IMDO, Junqueira AMR, Peixoto JR et al. Microbiological quality and productivity of lettuce under chemical and organic fertilization. *Food Sci Technol* 2010;30:108–18.
- Antwi-Agyei P, Cairncross S, Peasey A et al. A farm to fork risk assessment for the use of wastewater in agriculture in Accra, Ghana. *PLoS One* 2015;10:e0142346.
- Baert L, Mattison K, Loisy-Hamon F et al. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health. *Int J Food Microbiol* 2011;151:261–9.
- Bitler EJ, Matthews JE, Dickey BW et al. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiol Infect* 2013;141:1563–71.
- Bofill-Mas S, Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P et al. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Appl Environ Microb* 2006;72:7894–96.
- Bofill-Mas S, Rusiñol M, Fernandez-Cassi X et al. Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. *Biomed Res Int* 2013;2013:1–11.

- Brandão ML, Almeida DO, Bispo FC et al. Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready-to-eat lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *J Food Sci* 2014;79:M961–6.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Classifica as águas doces, salobras e salinas e especifica os parâmetros e limites associados aos níveis de qualidade requeridos para seu aproveitamento. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 18 de março 2005.
- Britz TJ, Sigge GO. Quantitative investigation into the link between irrigation water quality and food safety: Volume I. *Agricultural Water - Smallholder Irrigation*. South Africa Water Research Commission. 2012.
- CFIA (Canadian Food Inspection Agency). *Food Safety Practices Guidance for Ready-to-Eat Fresh-Cut Vegetable Manufacturers*. 2014. <http://www.inspection.gc.ca/food/safe-food-production-systems/haccp-generic-models-and-guidance-documents/guidance-fresh-cut-vegetables/eng/1371036204069/1371036205913> (5 January 2017, date last access).
- Chander M, Bodapati S, Mukherjee R et al. Organic livestock production: an emerging opportunity with new challenges for producers in tropical countries. *Rev Sci Tech OIE* 2011;30:569–83.
- Cheong S, Lee C, Song SW et al. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Appl Environ Microb* 2009;75:7745–51.
- Cook N, Knight A, Richards G. Persistence and elimination of human norovirus in food and on food contact surfaces: a critical review. *J Food Protect* 2016; 79:1273–94.
- de Quadros Rodrigues R, Loiko MR, de Paula CMD et al. Microbiological contamination linked to implementation of good agricultural practices in the production of organic lettuce in Southern Brazil. *Food Control* 2014;42:152–64.
- FAO/WHO. *Assuring Food Safety and Quality: Guidelines for Strengthening National Food Control Systems*. FAO: Rome; 2003. <http://www.fao.org/docrep/006/y8705e/y8705e00.htm> (18 April 2017, date last accessed).
- Ferreira MSR, Victoria M, Carvalho-Costa FA et al. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005–2008. *J Med Virol* 2010;82:1442–8.
- Fioretti JM, Ferreira MSR, Victoria M et al. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem I Oswaldo Cruz* 2011;106:942–7.
- Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol R* 2005;69:357–71.
- Fumian TM, Leite JPG, Castello AA et al. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *J Virol Methods* 2010;170:42–6.
- Fumian TM, Leite JPG, Marin VA et al. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *J Virol Methods* 2009;155:39–43.
- Fumian TM, Leite JPG, Rose TL et al. One year environmental surveillance of rotavirus specie A (RVA) genotypes in circulation after the introduction of the Rotarix® vaccine in Rio de Janeiro, Brazil. *Water Res* 2011;45:5755–63.
- Gerba CP, Choi CY. Role of irrigation water in crop contamination by viruses. In Goyal SM (ed). *Viruses in Foods*. St. Paul, Minnesota, USA: Springer, University of Minnesota, 2006, 257–63.
- Gil MI, Selma MV, Suslow T et al. Pre- and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. *Crit Rev Food Sci* 2015;55:453–68.
- Girones R. Tracking viruses that contaminate environments. *ASM Microbe* 2006;1:19.
- Girones R, Ferrus MA, Alonso JL et al. Molecular detection of pathogens in water—the pros and cons of molecular techniques. *Water Res* 2010;44:4325–39.
- Hassanain NA, Hassanain MA, Ahmed WM et al. Public health importance of foodborne pathogens. *World J Med Sci* 2013;9:208–22.
- Heim A, Ebnet C, Harste G et al. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 2003;70:228–39.
- Huang J, Xu X, Weng Q et al. Serial foodborne norovirus outbreaks associated with multiple genotypes. *PLoS One* 2013;8:e63327.
- Kageyama T, Kojima S, Shinohara M et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:1548–57.
- Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microb* 2002;68:1033–9.
- Lairon D. Nutritional quality and safety of organic food. A review. *Agron Sustain Dev* 2010;30:33–41.
- Leifels M, Hamza IA, Krieger M et al. From lab to lake—evaluation of current molecular methods for the detection of infectious enteric viruses in complex water matrices in an urban area. *PLoS One* 2016;11:e0167105.
- López-Gálvez F, Truchado P, Sánchez G et al. Occurrence of enteric viruses in reclaimed and surface irrigation water: relationship with microbiological and physicochemical indicators. *J Appl Microbiol* 2016;121:1180–88.
- Marafon GJ, Ribeiro M, Arantes Silva CM et al. *Regiões de Governo do Estado do Rio de Janeiro: uma Contribuição Geográfica*. Rio de Janeiro: Gramma Editora 2005.
- Marti E, Barardi CRM. Detection of human adenoviruses in organic fresh produce using molecular and cell culture-based methods. *Int J Food Microbiol* 2016;230:40–4.
- Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimarães FR et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microb* 2008;74:375–82.
- Miagostovich MP, Guimarães FR, Vieira CB et al. 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;6:110–5.
- Perron-Henry DM, Herrmann JE, Blacklow NR. Isolation and propagation of enteric adenoviruses in HEp-2 cells. *J Clin Microbiol* 1988;26:1445–7.
- Petropolis. *Guia do investidor* 2012. http://www.petropolis.rj.gov.br/sta/images/guia_do_investidor.pdf (5 January 2017, date last accessed).
- Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE et al. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res* 2007;41:1411–22.
- Rembiałkowska E. Quality of plant products from organic agriculture. *J Sci Food Agr* 2007;87:2757–62.
- Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006;354:11–22.
- Schulert AK, Frangoul HA, Domm J. Enteric viruses in ready-to-eat packaged leafy greens. *J Med* 2010;362:88–9.
- Seufert V, Ramankutty N, Foley JA. Comparing the yields of organic and conventional agriculture. *Nature* 2012;485:229–32.

- Siqueira-Silva J, Yeda FP, Favier AL et al. Infection kinetics of human adenovirus serotype 41 in HEK 293 cells. *Mem I Oswaldo Cruz* 2009;104:736–44.
- Smith-Spangler C, Brandeau ML, Hunter GE et al. Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives? a systematic review. *Ann Intern Med* 2012;157:348–66.
- Torner N, Martinez A, Broner S et al. Epidemiology of acute gastroenteritis outbreaks caused by human calicivirus (Norovirus and Sapovirus) in catalonia: a two year prospective study, 2010-2011. *PLoS One* 2016;11:e0152503.
- Van Zyl WB, Page NA, Grabow WOK et al. Molecular epidemiology of group A rotaviruses in water sources and selected raw vegetables in Southern Africa. *Appl Environ Microb* 2006;72:4554–60.
- Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB et al. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:602–6.
- Vieira CB, Mendes ACDO, Guimarães FR et al. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem I Oswaldo Cruz* 2012;107:778–84.
- Witt DJ, Bousquet EB. Comparison of enteric adenovirus infection in various human cell lines. *J Virol Methods* 1988;20:295–308.
- WHO (World Health Organization). *Microbiological Hazards in Fresh Leafy Vegetables and Herbs: Meeting Report*. Geneva: World Health Organization 2008.
- Zeng SQ, Halkosalo A, Salminen M et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. *J Virol Methods* 2008;153:238–40.

ANEXOS 2 - Dissemination of enteroviruses in the production chain of organic lettuce in Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 4 December 2017 | Revised: 20 April 2018 | Accepted: 23 April 2018

DOI: 10.1002/mbo3.653

ORIGINAL ARTICLE

WILEY *MicrobiologyOpen*

Dissemination of enteroviruses in the production chain of organic lettuce in Rio de Janeiro, Brazil

¹Lucia M. C. Werneck¹ | ²Marcia Leite Baptista² | Marize P. Miagostovich² |
²Edson Elias da Silva²

¹Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) - National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Rio de Janeiro, Brazil

²Oswaldo Cruz Institute (IOC), Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence

Lucia M. C. Werneck, National Institute of Quality Control in Health (INCQS), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Avenida Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Brazil.
Email: lucia.werneck@incqs.fiocruz.br

Funding information

CNPq; FAPERJ; INCQS/Fiocruz; IOC/Fiocruz

Abstract

This study aimed to survey the environmental dissemination of enterovirus (EV) in a site of organic lettuce situated in the mountainous region of the state of Rio de Janeiro, Brazil. For this purpose, a total of 96 environmental samples, including water and lettuce samples obtained in different stages of the production chain (e.g., irrigation water, seedlings, lettuces grown, and washed lettuces ready-to-eat), were analyzed. EV genomes were detected in 12.5% (12/96) of the tested samples (eight from irrigation water and 4 from lettuce samples). Levels of viral concentration ranged from 3.37×10^3 to 4.72×10^6 genomic copies per liter (gc L⁻¹) and from 2.14×10^4 to 5.56×10^4 genome copies per 25 grams (gc 25 g⁻¹) for the water and lettuce samples, respectively. Such findings suggest that the use of viruses as human fecal contamination markers must be considered in order to improve food safety in organic supply chains.

KEYWORDS

agriculture, environmental health, food safety, viruses, water quality

1 | INTRODUCTION

Organic lettuce (*Lactuca sativa*) has been acknowledged as an important transmission source of enteric viruses, since it is traditionally eaten raw or receives minimal processing (Gerba & Choi, 2006). Due to their resistance to adverse conditions, the low infectious dose and the large number of infectious particles, these viruses have been described as important environmental contaminants (De Giglio et al., 2017; Grassi et al., 2010). Among those viruses are the human enteroviruses (EVs), which are associated with asymptomatic infections or mild diseases, such as the common cold or minor undifferentiated febrile illnesses. Yet under certain conditions, EVs also cause serious human diseases such as poliomyelitis, meningitis, encephalitis, myocarditis, and hand, foot, and mouth disease (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2016; Faustini et al., 2006;

Khetsuriani, Lamonte-Fowlkes, Oberst, & Pallansch, 2006; Starlin et al., 2001; Zhu et al., 2007).

Originally EV were classified into four groups: poliovirus (PV), coxsackie A virus (CA), coxsackie B virus (CB), and human orphan cytopathic enteric virus (echovirus), but it was noted that there were significant overlaps in the biological properties of those viruses in different groups. Currently, the *Enterovirus* genus, classified within the *Picornaviridae* family, consists of 13 species including *Enterovirus* A-J and *Rhinovirus* A-C, in which the species of *Enterovirus* A, B, C, D and *Rhinovirus* A, B, C, infect humans (<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>; International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2017).

EV was associated with the first transmission of food-borne viruses reported in 1914, when polio outbreaks were associated with milk consumption (Jubb, 1915). More recently, there are no reports

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2018 The Authors. *MicrobiologyOpen* published by John Wiley & Sons Ltd.

MicrobiologyOpen. 2018;e653.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.653>

www.MicrobiologyOpen.com | 1 of 5

| | |
|---|-----------|
|  | |
| Journal Name | MBO3 |
| Manuscript No. | 653 |
| WILEY | |
| No. of pages: | 5 |
| Dispatch: | 10-5-2018 |
| CE: Kesav | |
| PE: Bahkumar C. | |

of food-borne outbreaks associated with EV (Todd and Greig 2015). However, studies have detected EV in several matrices including sewage, irrigation water, and shellfish, some of them from environmental surveillance studies of polioviruses and nonpolio enterovirus (Cheong et al., 2009; Connell et al. 2012; De Oliveira Pereira et al., 2016; Espinosa, Arias, Sánchez-Colón, & Mazari-Hiriart, 2009; Ndiaye, Diop, & Diop, 2014). Elsewhere, some studies have shown that EV can be transferred onto the surface of vegetables through spray irrigation water resulting in viral contamination of the vegetables (Allende & Monaghan, 2015; Cheong et al., 2009; Pachepsky, Shelton, McLain, Patel, & Mandrell, 2011; Uyttendaele et al., 2015).

This study aims to investigate the environmental dissemination of human *Enterovirus* species in the production chain of organic lettuce in a small farm located in the region of Brejal, municipality of Petropolis, in the state of Rio de Janeiro, Brazil.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study site, sampling collection, and viral concentration methods

Water and lettuce samples were obtained at different lettuce production stages between August 2010 and August 2011 in an organic production site located in Brejal region, municipality of Petropolis, in the mountains of Rio de Janeiro. Ninety-six samples including seedling irrigation water (W1), catchment spring water (W2), dam water (W3), lettuce irrigation water (W4), lettuce wash water (W5), and three lettuce samples as seedlings (L1), lettuces grown (L2), and washed lettuce (L3), previously concentrated and investigated for rotavirus, norovirus, and human adenovirus (Werneck et al., 2017) were processed for EV investigation.

Water samples (2 L) were processed for viral concentration using an adsorption-elution method with a negatively charged membrane as described previously by Katayama, Shimasaki, and Ohgaki (2002). For lettuce samples, 25 grams (g) was concentrated using the same method adapted for small volumes (approximately 120 ml) using a 0.45 μm negative charge membrane with a Stericup® filter (250 ml) (Nihon, Millipore, USA) and ultrafiltration was performed with Centriprep Concentrator® 50 Nihon, Millipore) to give a final volume of 2 ml (Fumian, Leite, Marin, & Miagostovich, 2009; Katayama et al., 2002).

RNA extraction and One-step reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

Nucleic acids were extracted using QIAamp Viral RNA Mini Kits (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

RT-qPCR for EV was developed and standardized by the National Enterovirus Reference Laboratory. With an aim to improve the detection and quantification of EV by qPCR, primers and probes corresponding to the 5'NC region of human EV were designed and evaluated for species A to D detection (Da Silva, E.E. - Unpublished data). For a qPCR standard curve the RNA from poliovirus Sabin 3 (NIBSC code: 01/532) obtained from human RD cell cultures was

extracted and diluted from 10^{-1} to 10^{-9} . To determine the limit of detection standard RNA was serially diluted in a pool of negative water concentrates. The concentrates were extracted as described above and tested in duplicate.

RT-qPCR was performed using AgPath-ID™ One-step RT-PCR Kit (Applied Biosystems, California, USA). Nine microliter of RNA extracted was added to the reaction mix according to manufacturer's instructions. Assays were placed into an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) on the following conditions: incubation at 50°C for 2 min to activate UNG, initial denaturation at 95°C for 10 min, and then 40 cycles of 95°C for 15 s and 56–60°C for 1 min. Amplifications were analyzed in duplicate, and positive and negative controls were included in each run. Virus concentration results are present as gc L^{-1} and gc 25 g^{-1} for water and lettuce samples, respectively.

2.2 | Virus isolation

According World Health Organization (2004), all positive samples were inoculated into three different cell lines sensitive to the isolation of the genus *Enterovirus*: human RD, MRC-5, and HEP 2c. Cells were supplied by the Center for Disease Control and Prevention (CDC; Atlanta, USA) to the Fiocruz/RJ Enterovirus Laboratory. Briefly, 200 μl of concentrate was inoculated in duplicate into 12 ml cell culture tubes (Nalgene™ Thermo Fischer Scientific, USA) containing 1.0×10^5 cells/ml. Culture cells were kept at 36°C with daily observation using an invert microscope for the appearance of cytopathic effect. Three serial passages were conducted with a 7-day interval. Control cultures cells were used to report toxicity, degeneration, or contamination. After 21 days, the qPCR was performed with paired samples (initial concentrates and inoculated cultures). The same procedure was accomplished for the three cell types used.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

This study investigated the presence of human *Enterovirus* species using one-step reverse transcriptase quantitative TaqMan® PCR (RT-qPCR) from water and lettuce samples obtained from a chain of organic lettuce. The limit of detection in 100 μl of water of RT-qPCR assays that were used in this study was found to be 168 gc for EV following the FSA 2006 guidelines (Armbruster & Pry, 2008; FSA 2006). The RT-qPCR assay detected EV in 12.5% (12/96) of total samples, 13% (8/60) from water, and 11% (4/36) from lettuce samples. EV load ranged from 3.37×10^3 to 4.72×10^6 genomic copies per liter (gc L^{-1}) and from 2.14×10^4 to 5.56×10^4 genome copies per 25 grams (gc 25 g^{-1}) for water and lettuce samples, respectively (Table 1). Previously, a study carried out with these same samples revealed high contamination with the main gastroenteric viruses (i.e., rotavirus, norovirus and, adenovirus) with detection of at least one of them in all the samples studied and with the rotavirus concentration reaching $10^4 \text{ gc 25 g}^{-1}$ in samples of lettuce ready for consumption (Werneck et al., 2017). A comparative analysis with the previous

TABLE 1 Detection and quantification of enterovirus (EV) according to matrix and collection points ($n = 12$ each)

| Matrix | Sample collection points | Number of positives (%) | EV concentration per genome copies (gc) |
|---------|--------------------------|-------------------------|---|
| Water | W1 | 4 (33.3) | 6.36×10^{4a} 7.62×10^5 3.37×10^3 4.72×10^5 |
| | | 2 (16.7) | 2.03×10^5 1.64×10^4 |
| | | 1 (8.3) | 5.14×10^3 |
| | W4 | 1 (8.3) | 2.37×10^4 |
| | W5 | ND | ND |
| Lettuce | L1 | ND | ND |
| | L2 | 2 (16.7) | 3.28×10^{4b} 5.47×10^4 |
| | | 2 (16.7) | 2.14×10^4 5.56×10^4 |

ND, Not detected.

^aWater (gc L⁻¹).

^bLettuce (gc 25 g⁻¹).

W1. Seedling irrigation water; W2. Catchment of spring water; W3. Dam; W4. Lettuce irrigation water; W5. Lettuce wash water; L1. Seedlings; L2. Dried lettuce; L3. Washed lettuce.

results shows that the EV were obtained in a higher concentration in the seedling's irrigation waters (10^6 gc L⁻¹). However, in the lettuce samples, mean values of EV were detected in concentrations similar to RVA data, and higher than HAdV (10^2 gc L⁻¹), which was the best indicator since they were present in at least one sample from each point of the production chain. The detection of viral concentration ranging from 10^2 to 10^4 gc 25 g⁻¹ in adult lettuce suggests that sometimes the level of viral contamination increased at the end of production. However, it is not possible to state whether there is a growing process of contamination for all viruses, mainly due to the heterogeneous distribution of them commonly observed in environmental samples. It was also observed that lettuces washed at the last stage of production do not represent a benefit for virus removal, since the waters used are also contaminated. Enteric viruses including EV have been used as indicators of sanitation and hygiene practices at food production sites on dairy and swine farms (Fongaro et al., 2014; Kokkinos et al., 2012; Lachapelle, Letellier, Fravalo, Brassard, & L'Homme, 2017; Maunula et al., 2013; Staggemeier et al., 2015; Yavermanesh, Alum, & Abbaszadegan, 2015).

In order to demonstrate EV infectivity, all 12 EV-positive samples by RT-qPCR were processed to attempt virus isolation following the World Health Organisation (WHO) protocol described previously (World Health Organization, 2004). No EV characteristic cytopathic effects were observed after three consecutive passages of 7 days each in cell cultures. After this period, RT-qPCR was carried out for all different culture cell lines in paired samples (initial concentrates and cultures) with no reduction in threshold cycle (Ct) values, revealing no virus replication. Human rhabdomyosarcoma (RD), human diploid cells derived from lung (MRC-5) and human epithelial carcinoma cells (HEp 2c) are susceptible to EV infection and were used to improve successful isolation as recommended by WHO. This

protocol is routinely performed by EV laboratories that usually inoculate specimens into a minimum of three cell lines (World Health Organization, 2004, World Health Organization (WHO), 2015). Although it has not been possible to demonstrate the infectivity of the EVs detected, the presence of the viral genome is sufficient to demonstrate the potential risk of infection from the consumption of those raw products. It was also not possible to demonstrate HAdV infectivity from those same samples, corroborating the idea previously mentioned that a long interval for performing assays may have influenced these results (Werneck et al., 2017).

In conclusion, our results point out the need of considering and monitoring enteric viruses, as environmental contaminants, mainly in food producing areas that do not meet the requirements of adequate sanitation. Worldwide, food security has been a growing concern for authorities that are stepping up efforts in an attempt to minimize harm to health (World Health Organization, 2002; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2016). In this context, viruses emerge as a challenge since their contamination in the environment is difficult to eliminate, reinforcing the importance of basic sanitation in food security (Cook, Knight, & Richards, 2016).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Brejal producer, EMATER (Rio de Janeiro Technical Assistance and Rural Extension firm by irrigation water supply, National Enterovirus Reference Laboratory of IOC (Institute of Oswaldo Cruz) members and INCQS (National Institute of Quality Control in Health) group. The authors also thank Marcelle Figueira Marques da Silva for the revision of the manuscript. This research work is within the scope of the activities of FIOCRUZ as a collaborating center of PAHO/WHO of Public and Environmental Health.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest declared.

ORCID

Lucia M. C. Werneck  <http://orcid.org/0000-0002-2026-0948>

REFERENCES

- Allende, A., & Monaghan, J. (2015). Irrigation water quality for leafy crops: A perspective of risks and potential solutions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 7457–7477. <https://doi.org/10.3390/ijerph120707457>
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemist Reviews*, 29(Suppl 1), S49.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2016). *Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 2014, annual report*. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC.
- Cheong, S., Lee, C., Song, S. W., Choi, W. C., Lee, C. H., & Kim, S. J. (2009). Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. *Applied and Environment Microbiology*, 75(24), 7745–7751. <https://doi.org/10.1128/AEM.01629-09>
- Cook, N., Knight, A., & Richards, G. P. (2016). Persistence and elimination of human norovirus in food and on food contact surfaces: A critical review. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1273–1294. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-570>
- De Giglio, O., Caggiano, G., Bagordo, F., Barbuti, G., Brigida, S., Lugoli, F., ... Montagna, M. T. (2017). Enteric viruses and fecal bacteria indicators to assess groundwater quality and suitability for irrigation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 558. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060558>
- De Oliveira Pereira, J. S., da Silva, L. R., de Meireles Nunes, A., de Souza Oliveira, S., da Costa, E. V., & da Silva, E. E. (2016). Environmental surveillance of polioviruses in Rio de Janeiro, Brazil, in support to the activities of global polio eradication initiative. *Food and Environmental Virology*, 8(1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9221-5>
- Espinosa, A. C., Arias, C. F., Sánchez-Colón, S., & Mazari-Hiriart, M. (2009). Comparative study of enteric viruses, coliphages and indicator bacteria for evaluating water quality in a tropical high-altitude system. *Environmental Health*, 8(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-49>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2016). *Rapid Risk Assessment - Enterovirus detections associated with severe neurological symptoms in children and adults in European countries*. Stockholm: ECDC.
- Faustini, A., Fano, V., Muscillo, M., Zaniratti, S., La Rosa, G., Tribuzi, L., & Perucci, C. A. (2006). An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 associated with attending school and swimming in pools. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(4), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2005.06.008>
- Fongaro, G., Viancelli, A., Magri, M. E., Elmahdy, E. M., Biesus, L. L., Kich, J. D., ... Barardi, C. R. (2014). Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. *Science of the Total Environment*, 479, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.004>
- FSA (2006). Review of the analytical terminology for codex use in the procedural manual. *FOOD STAND AGENCY INF BULL METHODS ANAL SAMPL FOODST*, 68, 1–15.
- Fumian, T. M., Leite, J. P. G., Marin, V. A., & Miagostovich, M. P. (2009). A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *Journal of Virological Methods*, 155(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.026>
- Gerba, C. P. (2006). Food virology: Past, present, and future. In ????? (Ed.), *Viruses in foods* (pp. 1–4). Boston, MA: Springer.
- Gerba, C. P., & Choi, C. Y. (2006). Role of irrigation water in crop contamination by viruses. In ????? (Ed.), *Viruses in foods* (pp. 257–263). New York, NY: Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-29251-9>
- Grassi, T., Bagordo, F., Idolo, A., Lugoli, F., Gabutti, G., & De Donno, A. (2010). Rotavirus detection in environmental water samples by tangential flow ultrafiltration and RT-nested PCR. *Environmental Monitoring and Assessment*, 164(1), 199–205. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0885-x>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2017) ??????. [online] Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus [Accessed 25 Sept 2017].
- Jubb, G. (1915). A third outbreak of epidemic poliomyelitis at West Kirby. *The Lancet*, 185(4767), 67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)63665-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)63665-1)
- Katayama, H., Shimasaki, A., & Ohgaki, S. (2002). Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Applied and Environment Microbiology*, 68(3), 1033–1039. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002>
- Khetsuriani, N., Lamonte-Fowlkes, A., Oberst, S., & Pallansch, M. A.; Centers for Disease Control and Prevention (2006). Enterovirus surveillance—United States, 1970–2005. *MMWR Surveillance Summary*, 55, 1–20.
- Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., ... Vantarakis, A. (2012). Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. *Food and Environmental Virology*, 4(4), 179–191. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9087-8>
- Lachapelle, V., Letellier, A., Fravallo, P., Brassard, J., & L'Homme, Y. (2017). Dynamics of virus distribution in a defined swine production network using enteric viruses as molecular markers. *Applied and Environment Microbiology*, 83(4), e03187-16.
- Maunula, L., Kaupke, A., Vasicikova, P., Söderberg, K., Kozyra, I., Lazic, S., ... Cook, N. (2013). Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.003>
- Ndiaye, A. K., Diop, P. A. M., & Diop, O. M. (2014). Environmental surveillance of poliovirus and non-polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007–2013). *The Pan African Medical Journal*, 19, 243.
- Pachepsky, Y., Shelton, D. R., McLain, J. E., Patel, J., & Mandrell, R. E. (2011). Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: A review. *Advances in Agronomy*, 113(7), 73–138.
- Parada-Fabián, J. C., Juárez-García, P., Natividad-Bonifacio, I., Vázquez-Salinas, C., & Quiñones-Ramírez, E. I. (2016). Identification of enteric viruses in foods from Mexico City. *Food and Environmental Virology*, 8(3), 215–220. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9244-6>
- Staggemeier, R., Bortoluzzi, M., da Silva Heck, T. M., da Luz, R. B., Fabres, R. B., Soliman, M. C., ... de Matos Almeida, S. E. (2015). Animal and human enteric viruses in water and sediment samples from dairy farms. *Agricultural Water Management*, 152, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.01.010>
- Starlin, R., Reed, N., Leeman, B., Black, J., Trulock, E., & Mundy, L. M. (2001). Acute flaccid paralysis syndrome associated with echovirus 19, managed with pleconaril and intravenous immunoglobulin. *Clinical Infectious Diseases*, 33(5), 730–732. <https://doi.org/10.1086/322624>
- Uyttendaele, M., Jaykus, L. A., Amoah, P., Chiodini, A., Cunliffe, D., Jacxsens, L., ... Medema, G. (2015). Microbial hazards in irrigation water: Standards, norms, and testing to manage use of water

- 1 in fresh produce primary production. *Comprehensive Reviews*
 2 *in Food Science and Food Safety*, 14(4), 336–356. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12133>
- 3 Werneck, L., Vieira, C. B., Fumian, T. M., Caetano, T. B., Emilio dos Santos,
 4 J., Ferreira, F. C., ... Miagostovich, M. P. (2017). Dissemination of gastro-
 5 enteric viruses in the production of lettuce in developing coun-
 6 tries: A public health concern. *FEMS Microbiology Letters*, 364(9), 1–7.
- 7 World Health Organization (2002). *The world health report 2002: Reducing risks, promoting healthy life*. Geneva, Switzerland: World
 8 Health Organization.
- 9 World Health Organization (2004). *Polio laboratory manual*, 4th ed.
 10 Geneva: WHO.
- 11 World Health Organization (WHO) (2015). *Enterovirus surveillance guide-*
 12 *lines. Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio*
 13 *Eradication Initiative*. Geneva: WHO.
- 14 Yavarmanes, M., Alum, A., & Abbaszadegan, M. (2015). Occurrence of
 15 Noroviruses and Their Correlation with Microbial Indicators in Raw

Milk. *Food and Environmental Virology*, 7(3), 232–238. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9185-5>

- Zhu, Z., Xu, W., Xu, A., Wang, H. Y., Zhang, Y., Song, L. Z., ... Ji, F. E. N. G. (2007). Molecular epidemiological analysis of echovirus 19 isolated from an outbreak associated with hand, foot, and mouth disease (HFMD) in Shandong Province of China. *Biomedical and Environmental Sciences*, 20(4), 321–328.

How to cite this article: Werneck LMC, Baptista ML, Miagostovich MP, da Silva EE. Dissemination of enteroviruses in the production chain of organic lettuce in Rio de Janeiro, Brazil. *MicrobiologyOpen*. 2018;e653. <https://doi.org/10.1002/mbo3.653>

UNCORRECTED PROOF

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

Graphical Abstract

The contents of this page will be used as part of the graphical abstract of html only.
It will not be published as part of main article.



Virus as food safety markers. Enterovirus as an environmental contaminant in lettuce production.