

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

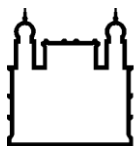
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOROVÍRUS EM MOLUSCOS BIVALVES DA  
CIDADE DE ARRAIAL DO CABO, RJ

SYLVIA KAHWAGE SARMENTO

Rio de Janeiro  
Março de 2020





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*SYLVIA KAHWAGE SARMENTO*

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOROVÍRUS EM MOLUSCOS BIVALVES DA  
CIDADE DE ARRAIAL DO CABO, RJ

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

**Orientador:** Dr. Tulio Machado Fumian

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2020

Sarmiento, Sylvia Kahwage .

Detecção e caracterização de norovírus em moluscos bivalves da cidade de Arraial do Cabo, RJ / Sylvia Kahwage Sarmiento. - Rio de Janeiro, 2020. 94 f.; il.

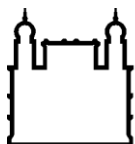
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientador: Tulio Machado Fumian.

Bibliografia: f. 77-95

1. Norovírus. 2. Moluscos Bivalves . 3. Arraial do Cabo . 4. Rio de Janeiro . 5. Tratamento com PMA . I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**SYLVIA KAHWAGE SARMENTO**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOROVÍRUS EM MOLUSCOS  
BIVALVES DA CIDADE DE ARRAIAL DO CABO, RJ**

**ORIENTADOR: Dr. Tulio Machado Fumian**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jaqueline Mendes de Oliveira – IOC**

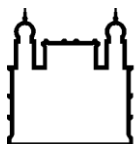
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Baur Vieira – UFF**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda de Bruycker Nogueira – IOC**

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Adriana de Abreu Corrêa – UFF**

**Prof. Dr. Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos –IOC**

Rio de Janeiro, 13 de março de 2020



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

Dedico esse trabalho à minha família pelo amor incondicional e pelo incentivo em cada conquista da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz.

Aos Drs. Gentil Arthur, Jaqueline Mendes, Fernanda Nogueira e Adriana Corrêa por aceitarem fazer parte da banca examinadora desta dissertação e pela disponibilidade de tempo.

À Dr<sup>a</sup> Carmen Baur Vieira pelo excelente trabalho de revisão, paciência, gentileza e por aceitar fazer parte da banca examinadora desta dissertação.

Ao Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, por permitir a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, Dr Tulio Machado Fumian, por quem eu tenho muito respeito, admiração e carinho, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, gentileza, apoio, incentivo e, principalmente, por acreditar na minha capacidade para realizar este trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Marize Pereira Miagostovich, por ter me recebido de braços abertos no laboratório, pela paciência e suporte nos momentos em que precisei.

Ao Dr José Paulo G. Leite, pela indicação do meu orientador para a realização desse trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Maria da Penha Xavier, pelas palavras de incentivo, pelos gestos de carinho, pelas conversas engraçadas, pela disponibilidade em ajudar no laboratório, pelas infinitas caronas para Niterói, pela companhia e pela amizade. O seu alto astral, otimismo e conselhos foram importantes demais nesse processo.

À Dr<sup>a</sup> Juliana da Silva Ribeiro de Andrade, pelos ensinamentos, pelas risadas, companhia, conselhos, momentos de descontração e amizade.



Ao Fabio Correia, colega muito querido, que, além de me ajudar nas atividades do laboratório com seu conhecimento e paciência, alegrou meus dias com seu jeito engraçado e irreverente.

À Caroline Rezende Guerra, do Laboratório de Genética Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, pela ajuda na coleta de ostras e mexilhões das praias de Arraial do Cabo.

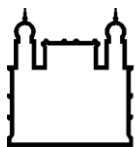
Aos colegas do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) e aos de outros laboratórios: Alexandre Fialho, Adriana Maranhão, Fernando, Gentil Arthur, Irene, Jaqueline Mendes, Márcia Pimenta, Márcia Terezinha, Sérgio, Rosane Assis e Valdir. Obrigada pelos ensinamentos, apoio, momentos de descontração e ajuda nos momentos necessários. Todos foram muito importantes para o meu crescimento pessoal e profissional.

A Deus, por me conceder saúde, determinação, força, resiliência, bom humor, inteligência e capacidade para que eu conseguisse alcançar todos os meus objetivos e sonhos até o momento.

Aos meus pais Silvio e Samara e meus irmãos Sara e Saulo, pelo amor incondicional, apoio, carinho, risadas, conselhos, confiança, educação e pelos princípios éticos e morais dados a mim ao longo de toda a minha vida. Agradeço imensamente por tê-los comigo.

Aos meus amigos, pelas risadas, brincadeiras, conversas intermináveis, conselhos, apoio e companheirismo em todas as horas. Vocês são muito especiais para mim.

Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre. (Albert Einstein)



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

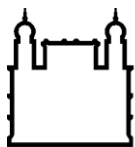
### **DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS NOROVÍRUS EM MOLUSCOS BIVALVES DA CIDADE DE ARRAIAL DO CABO, RJ**

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**Sylvia Kahwage Sarmiento**

Os norovírus são a causa mais comum de surtos de gastroenterites não bacterianas em humanos no mundo e podem ser encontrados nas águas utilizadas no cultivo de moluscos bivalves. Esses animais tem grande relevância no panorâma dos surtos alimentares, e devido ao mecanismo de alimentação por filtração que eles possuem, as partículas virais podem se concentrar em seus tecidos e serem transmitidas durante o consumo desses alimentos. O padrão microbiológico de monitoramento da qualidade dos moluscos por meio de indicadores bacteriológicos não assegura a inexistência dos vírus. Este trabalho teve como principal objetivo detectar, quantificar e caracterizar por ferramentas moleculares os norovírus genogrupos I (GI) e II (GII) em moluscos bivalves durante um monitoramento contínuo de 16 meses em três pontos de coleta da cidade de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. Foi avaliada também pela primeira vez no Brasil a utilização do Propídeo Monoazida (PMAxx™) para avaliar a infecciosidade dos norovírus detectados. Um total de 77 amostras de moluscos bivalves (19 de ostras e 58 de mexilhões) foram coletadas de março de 2018 a junho de 2019. Os norovírus foram detectados em 41,5% das amostras, sendo o genogrupo GII o mais prevalente (37,7%). Os mexilhões apresentaram uma carga viral maior que as ostras e o tratamento com PMAxx™ demonstrou a diminuição significativa da carga viral entre as amostras tratadas e não tratadas com o intercalante, permitindo estabelecer uma distinção entre as partículas infecciosas e não-infecciosas. A caracterização genética das amostras positivas demonstrou a circulação dos genótipos GII.2[P16] e GII.4[P4]. A triagem de moluscos bivalves para vírus entéricos e o conhecimento da disseminação viral nas amostras auxilia na prevenção de surtos entre os consumidores e pode contribuir para a melhoria da qualidade das águas de cultivos dos bivalves.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **DETECTION AND CHARACTERIZATION OF NOROVIRUSES IN BIVALVE MOLLUSCS OF THE CITY OF ARRAIAL DO CABO, RJ**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA**

**Sylvia Kahwage Sarmiento**

Noroviruses are the most common cause of outbreaks of non-bacterial gastroenteritis in humans in the world and can be found in the bivalve molluscs grown in sewage-polluted water. These animals have a great relevance in the panorama of foodborne, and because of their filtering feeding mechanism, viral particles can be concentrated in their tissues and be transmitted during the consumption of these foods. The microbiological standard of the monitoring the quality of molluscs through bacteriological indicators is not enough to ensure the absence of viruses. This work aimed to detect, quantify and characterize by molecular tools norovirus genogroups I (GI) and II (GII) in bivalve molluscs during a 16-months continuous monitoring in three collection points in the city of Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. For the first time we also evaluated the use of Monoazide Propidium (PMAxx™) to evaluate the infectivity of the detected noroviruses. A total of 77 samples of bivalve molluscs (19 from oysters and 58 from mussels) were collected from March 2018 to June 2019. Noroviruses were detected in 41.5% of the samples, being the GII genogroup most prevalent (37,7%). Mussels had a higher viral load than oysters, and the treatment with PMAxx™ demonstrated a significant decrease in viral load between samples treated and untreated with the intercalating dye, allowing a difference to be made between infectious and non-infectious particles. The genetic characterization of the positive samples demonstrated the circulation of the GII.2[P16] and GII.4[P4] genotypes. The screening of bivalve molluscs for enteric viruses and the knowledge of viral dissemination in the oysters and mussels samples assist to prevent outbreaks of gastroenteritis among consumers and can contribute to the improvement of the bivalves grown waters.

## ÍNDICE

Lista de Figuras .....	xiv
Lista de Tabelas .....	xvi
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xvii
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
1- INTRODUÇÃO.....	19
1.1 - Aquicultura no Brasil .....	21
1.2 - Moluscos bivalves .....	23
1.3 - Legislação Brasileira .....	26
1.4 - Patógenos humanos relacionados ao consumo de molusco bivalves.....	27
1.5 – Norovírus.....	29
1.5.1 - Histórico .....	29
1.5.2 - Estrutura e genoma viral .....	31
1.5.3 - Classificação .....	33
1.5.4 - Epidemiologia e aspectos clínicos da infecção .....	37
1.6 - Detecção dos norovírus em amostras de moluscos bivalves .....	39
2- JUSTIFICATIVA .....	43
3- OBJETIVOS	
3.1 - Objetivo geral .....	45
3.2 - Objetivos específicos .....	45
4- MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 - Área de estudo e amostragem.....	46
4.2 - Preparo de extratos de glândulas digestivas, concentração viral e controle interno.....	47
4.3 - Extração do ácido nucleico viral .....	48
4.4 - Detecção e quantificação de norovírus e do controle interno (PP7) .....	49
4.5 - Avaliação da eficiência de recuperação viral.....	50
4.6 - Caracterização molecular dos norovírus nas amostras de bivalves .....	51
4.7 - Análise filogenética .....	52

4.8 - Tratamento com PMAxx™ nos moluscos bivalves contaminados .....	52
4.9 - Análises estatísticas .....	53
5- RESULTADOS.....	54
5.1 - Determinação da integridade do capsídeo viral como ferramenta de avaliar a infeciosidade das partículas virais .....	60
5.2 - Caracterização genética dos norovírus .....	61
5.3 - Clonagens das amostras positivas para norovírus .....	64
6- DISCUSSÃO .....	66
7- CONCLUSÕES .....	76
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Produção mundial da pesca de captura e da aquicultura, 1950-2015.....	20
Figura 2: Principais moluscos bivalves cultivados no Brasil: ostra e mexilhão .....	24
Figura 3: Representação esquemática da anatomia interna de ostras e mexilhões.....	25
Figura 4: Visão simplificada do processo de absorção de nutrientes nos moluscos bivalves .....	26
Figura 5: Agregado de partículas do agente de Norwalk-like encontrado em filtrado de fezes por microscopia eletrônica.....	31
Figura 6: Descrição esquemática de uma partícula viral de norovírus, com ênfase para a proteína estrutural majoritária VP1.....	32
Figura 7: Representação esquemática do genoma dos norovírus.....	33
Figura 8: Classificação filogenética dos norovírus baseada na sequência de aminoácidos da VP1 em dez genogrupos e dois não atribuídos (NA). .....	34
Figura 9: Classificação filogenética dos norovírus baseada na sequência de aminoácidos da VP1.....	35
Figura 10: Classificação dos norovírus em genogrupos e genótipos baseada na sequência completa da VP1, e o número de P-grupos e P-tipos com base na sequência de uma região parcial da RdRp na extremidade 5' da ORF1.....	36
Figura 11: Mecanismo de identificação da partícula viral infecciosa por RT-qPCR.....	42
Figura 12: Cidade de Arraial do Cabo (RJ) e os pontos de coleta de moluscos bivalves.....	47
Figura 13: Quantificação de Norovírus GI e GII em amostras de moluscos bivalves coletadas na cidade Arraial do Cabo. ....	55
Figura 14: Quantificação de Bacteriófago PP7 como controle interno nas amostras de moluscos bivalves analisadas .....	56
Figura 15: Distribuição mensal de amostras e amostras positivas para norovírus nas praias de Arraial do Cabo durante no período de 16 meses.....	57

Figura 16: Detecção de Norovírus GI e GII em moluscos bivalves de acordo com as estações do ano (2018-2019).....	58
Figura 17: Detecção de Norovírus GI e GII em mexilhões <i>Perna-perna</i> e ostras <i>Crassostrea gigas</i> de acordo com as áreas de coleta no período de 2018-2019.....	59
Figura 18: Box-Plot da quantificação de Norovirus em amostras de moluscos bivalves positivas para norovírus com e sem tratamento com PMAxx™.....	61
Figura 19: Análise filogenética dos norovírus baseada nas sequências da região da polimerase e da VP1.....	63



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Evolução da produção aquícola brasileira no período de 2013 a 2017.....	21
Tabela 2: Principais estados brasileiros produtores e produção de moluscos bivalves em 2017.....	23
Tabela 3: Iniciadores e sondas utilizados para a detecção de norovírus .....	49
Tabela 4: Detecção de Norovírus GI e GII em moluscos bivalves da cidade de Arraial do Cabo durante o período de monitoramento de 16 meses.....	54
Tabela 5: Taxas de recuperação viral de Bacteriófagos PP7.....	56
Tabela 6: Frequência de Norovírus GI e GII em moluscos bivalves de acordo com os pontos de coleta no período de 2018-2019.....	59
Tabela 7: Concentração de Norovirus em amostras de moluscos bivalves com e sem tratamento com PMAxx™.....	60
Tabela 8: Número de amostras de ostras e mexilhões positivas para norovírus caracterizadas e as cepas identificadas nos moluscos das praias de Arraial do Cabo....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGE – Gastreenterite Aguda (do inglês *Acute Gastroenteritis*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

cDNA – DNA complementar (do inglês *Complementary DNA*)

CG – Cópias Genômicas

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

Ct – Cycle Threshold

DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)

E. Coli – *Escherichia coli*

ES – Espírito Santo

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization*)

FERG – Grupo de Referência em Epidemiologia das Doenças Transmitidas por Alimentos (do inglês *Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group*)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – Gravidade

g – Grama

G – Genogrupo

HAdV – Adenovírus Humano

HBGA – Antígenos de Grupo Sanguíneo (do inglês *Histo-Blood Group Antigens*)

INEA – Instituto Estadual do Ambiente

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

mL – Mililitro

N – Domínio N-terminal

NCBI – Centro Nacional para Biotecnologia da Informação (National Center for Biotechnology Information)

nm – Nanômetro

NMP – Número Mais Provável

NTPase – Nucleosídeo trifosfatase

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Fase Aberta de Leitura (Open Reading Frame)

P – Domínio Protuding

pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia pela polimerase (Polimerase Chain Reaction)

PIB – Produto Interno Bruto

PMA – Propídio monoazida (Propidium monoazide)

PNCMB – Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves

qPCR – Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (Real time Polimerase Chain Reaction)

RdRp – RNA polimerase RNA dependente (RNA-dependent RNA polymerase)

RNA – Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)

rpm – rotações por minuto

RT – transcriptase reversa (do inglês Reverse Transcriptase)

SC – Santa Catarina

SRSVs – Small Round Structured Viruses

VP – Proteína viral (Viral protein)

VPg – Proteína viral associada ao genoma (vírus protein genome)

°C – Graus Celsius

## 1) Introdução

Recursos aquáticos desempenham um importante papel na cadeia de fornecimento de alimentos para a população, promovendo uma ligação entre ambiente, desenvolvimento econômico e bem-estar humano (Subasinghe, 2014). O cultivo de organismos como os crustáceos, peixes e moluscos em ambientes aquáticos é chamado de aquicultura. Comparada aos setores da agricultura e pecuária, exceto em alguns países, a aquicultura ainda pode ser considerada um setor jovem para produção de alimentos. No entanto, esse setor cresceu rapidamente nos últimos 40 anos, com um aumento na produção de 4,7 milhões de toneladas de animais aquáticos em 1980 para 76,6 milhões de toneladas em 2015 favorecido pelos altos níveis de produção da China, que é o país com a maior produção mundial atualmente (FAO, 2017).

Desde que a produção pesqueira extrativista, que se baseia na retirada de recursos pesqueiros do ambiente natural, se tornou estagnada no final dos anos 80 a aquicultura, baseada no cultivo de organismos aquáticos em espaço confinado e controlado, tem sido responsável pelo crescimento no fornecimento de peixes e moluscos cultivados para consumo humano (Figura 1). Com crescimento médio anual de 5,8% durante o período de 2001-2016, a aquicultura representa o setor produtor de alimentos de mais rápido crescimento no mundo (FAO, 2018).

A aquicultura abrange, dentro outras áreas, a malacocultura que é o cultivo de moluscos bivalves como ostras e mexilhões. Segundo os últimos dados divulgados pelo Departamento de Pesca e Aquicultura da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção de moluscos bivalves marinhos de cultivo ocupa a segunda posição (21,2%) entre os grupos de espécies da produção aquícola mundial, atrás somente da produção de peixes (67,2%) (FAO, 2018).

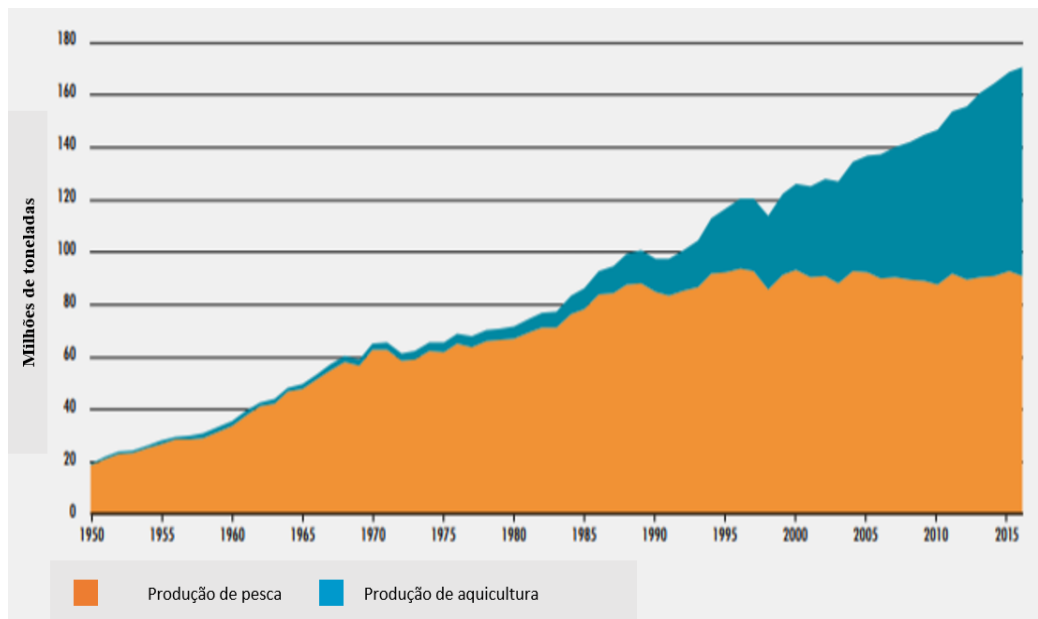


Figura 1: Produção mundial da pesca de captura e da aquicultura, 1950-2015. Adaptado de FAO/WHO (2018).

As principais espécies de moluscos bivalves produzidas mundialmente destinadas ao consumo humano direto são as ostras, vieiras e os mexilhões. Por serem consumidos preferencialmente crus ou pouco cozidos, a comercialização desses produtos tem sido acompanhada de um crescente interesse pela sua inocuidade (Alfano-Sobsey et al., 2012; Doré et al., 2010; Lunestad et al., 2016) e de medidas sanitárias cada vez mais rigorosas para o comércio nacional e internacional. O Código de Práticas para Peixes e Produtos da Pesca, elaborado pelo Comitê do Codex Alimentarius, fornece orientações tecnológicas e os requisitos de higiene essenciais na produção de peixes e mariscos seguros para o consumo humano, além de conter instruções sobre a aplicação da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, que é recomendada para garantir a produção higiênica de peixes e produtos da pesca em cumprimento dos requisitos de saúde e segurança (Codex Alimentarius, 2005).

A qualidade do animal a ser consumido está relacionada às condições do ambiente aquático em que são cultivados, como por exemplo, a temperatura da água, a disponibilidade de alimento e a presença de agentes poluentes - isso porque os moluscos bivalves obtêm alimento filtrando a água e, se ela estiver contaminada, microrganismos patogênicos podem bioacumular no tecido destes animais (Maalouf et al., 2011). Portanto, a conservação do ambiente é fundamental não só para a manutenção da qualidade dos moluscos, como também para a viabilidade econômica das comunidades que exploram esses recursos naturais.

### 1.1) Aquicultura no Brasil

A aquicultura no Brasil aumentou 925% de 1990 a 2001 (20,5 mil toneladas para 210 mil toneladas), superando a média mundial de 187% neste mesmo período. Economicamente, esta atividade também apresentou um crescimento significativo, passando de US\$104,4 milhões obtidos em 1990 para US\$ 830,3 milhões em 2001, colocando o Brasil como o décimo terceiro em receitas geradas (Borghetti et al., 2003). No período de 2004 a 2014, o país apresentou maior incremento percentual na produção aquícola com crescimento anual médio de quase 8%. Em 2009, a produção aquícola total brasileira foi de 324 mil toneladas e em 2014 o país ficou em décimo terceiro lugar na produção mundial de aquicultura produzindo um pouco mais de meio milhão de toneladas por ano (FAO, 2016; Kubitzka, 2015). Atualmente, a aquicultura tem uma produção de cerca de 548 mil toneladas por ano, sendo os moluscos bivalves responsáveis por 3,9% dessa produção (Tabela 1, IBGE, 2017),

Tabela 1: Evolução da produção aquícola brasileira no período de 2013 a 2017.

Produto	Produção por ano (toneladas)				
	2013	2014	2015	2016	2017
Peixes	392.492	474.329	483.241	498.205	485.254
Camarões	64.668	65.018	69.859	52.119	40.967
Ostras, vieiras e mexilhões	19.359	22.091	21.063	20.829	20.947
Total Aquicultura	476.519	561.438	574.163	580.070	547.163

Adaptado de IBGE, Pesquisa Pecuária municipal 2017.

A malacocultura no Brasil teve início no estado de Santa Catarina (SC) no final da década de 1980 com o cultivo da ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*. Os custos relativamente baixos de investimentos permitiram o acesso de pequenos produtores a essa atividade. A ausência da necessidade de compra de ração para a alimentação dos moluscos diminuiu os gastos de produção devido à função biológica desses animais que realizam a absorção de microalgas como fonte de alimentação (Dorow, 2013).

No país há a produção do mexilhão *perna perna* e de duas espécies de ostras, a *Crassostrea rhizophorae* e a ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*, que são cultivados pelo litoral brasileiro devido às condições climáticas e facilidade na obtenção de sementes de espécies nativas. A região sul é responsável pelo maior percentual da produção nacional de moluscos bivalves (Tabela 2) e pelo segundo maior da América Latina, perdendo somente para o Chile. A presença de praias de mar aberto, baías enseadas e estuários facilitam a formação de áreas de cultivo, além de historicamente o local ter sido colonizado por povos de origem açoriana que tinham como tradição o aproveitamento de moluscos como alimento (Rosa, 1997).

Na região sudeste, a malacocultura foi introduzida ainda na década de 1980 quando o Instituto de Pesca de São Paulo trouxe sementes de ostras *Crassostrea gigas* do Oyster Reserarch Institute of Sendai (Japão) para o cultivo no município de Cananéia (SP) e Píuna no Espírito Santo. No Rio de Janeiro, o cultivo de moluscos bivalves teve início após experimentos com mexilhões na região de Arraial do Cabo pelo Instituto de Pesquisas da Marinha, que desenvolveu modelos de balsas de cultivo e técnicas de produção. Porém, esse estado não teve o mesmo grau de expansão desta atividade que Santa Catarina devido a falta de apoio financeiro na região (Poli, 1994).

O Rio de Janeiro é o maior produtor de moluscos da região sudeste (76 toneladas), segundo dados do IBGE de 2017 (Tabela 2), com destaque para as ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões *perna perna* cultivados principalmente em duas áreas do estado: a Baía de Ilha Grande, Angra dos Reis, que concentra o maior número de fazendas marinhas e a Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, unidade de conservação de uso sustentável, onde o cultivo é restrito aos moradores nativos da cidade (Lavinias et al., 2008).

Tabela 2: Principais estados brasileiros produtores e produção de moluscos bivalves em 2017.

<b>Local</b>	<b>Produção (toneladas)</b>
<b>Brasil</b>	20.941
<b>1º) Santa Catarina</b>	20.537
<b>2º) Paraná</b>	77
<b>3º) Rio de Janeiro</b>	76
<b>4º) São Paulo</b>	69
<b>5º) Pará</b>	56
<b>6º) Alagoas</b>	50
<b>7º) Bahia</b>	43

Adaptado de IBGE, Pesquisa Pecuária municipal 2017.

## 1.2) Moluscos bivalves

Moluscos bivalves são animais filtradores suspensívoros, que se alimentam de partículas em suspensão na coluna de água (Gosling, 2003). Possuem corpo mole protegido por um manto que tem a forma de duas abas simétricas que recobrem o seu corpo e segregam as valvas (conchas). Estas podem ser fechadas ou abertas por retracção ou relaxamento dos músculos adutores. A cabeça é rudimentar, sem tentáculos, massa bucal, rádulas, mandíbulas ou faringe, sendo a função de obtenção de alimentos transferida para os palpos labiais, cavidade paleal e as brânquias que possuem pequenos filamentos, os cílios, que conduzem a corrente de água para a cavidade do manto (Galtsoff, 1964). Eles estão classificados no filo Mollusca, classe *Bivalvia*, e incluem as ostras (Figura 2-A), vieiras, berbigões e mexilhões (Figura 2-B), sendo que as ostras e mexilhões são amplamente cultivados e consumidos mundialmente (Salvini-Plawen & Steiner, 1996).



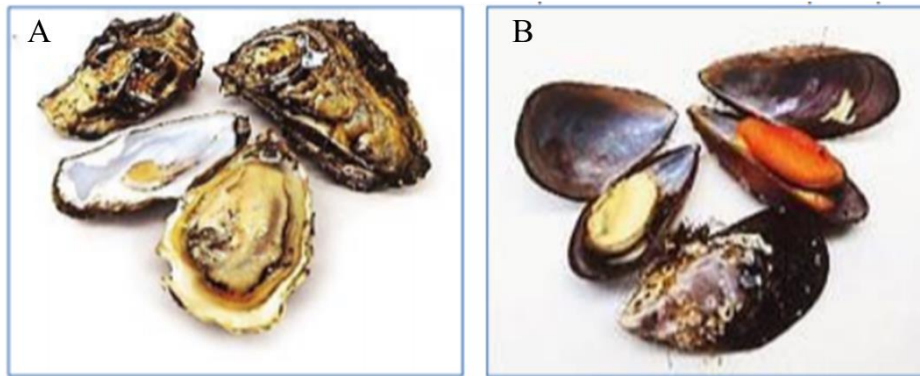


Figura 2: Principais moluscos bivalves cultivados no Brasil: ostra (A) e mexilhão (B). Adaptado de Secretaria Municipal de Pesca e Agricultura de Angra dos Reis. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

As ostras pertencem a Ordem *Ostreoida*, Família *Ostreidae* e sua estrutura interna é desprovida de esqueleto, composta por um corpo macio protegido por duas sessões de conchas calcárias, unidas por um ligamento, com linhas de crescimento. As brânquias, coração, fígado, boca, estômago, intestino, ânus, pálpebras, músculo adutor, tentáculos e gânglio cerebral se encontram na massa visceral, cobertos por uma manta protetora (Ruppert et al., 1996). Possuem brânquias bem desenvolvidas, que são responsáveis pela respiração e pela filtração de alimentos (Figura 3-A) (Farias, 2008). Atualmente, as espécies desse gênero cultivadas no Brasil são a *Crassostrea rhizophorae*, que ocorre de Fortim/BA até Florianópolis/SC, e a *Crassostrea gigas*, cultivada em Santa Catarina, Rio de Janeiro e São Paulo (Lima, 2015).

Mexilhão é o termo comumente utilizado na denominação de diversas espécies de bivalves pertencentes à Ordem *Mytiloida*, Família *Mytilidae* (Boehs, 2010), que têm como características comuns conchas alongadas e assimétricas e estarem presas ao substrato por um feixe filamentososo, o bisso (Figura 3-B). No Brasil, as espécies comestíveis e de maior importância comercial são a *Perna-perna*, espécie tropical encontrada nos costões rochosos de águas oceânicas, e *Mytela falcata*, presente nos estuários. O mexilhão *Perna-perna* é a espécie cultivada mais abundante entre os estados do Rio de Janeiro e Santa Catarina, representando 4% da produção total da aquicultura nacional. O cultivo de *Perna-perna* no Brasil teve um crescimento bastante acentuado até o ano de 2000, quando registrou uma produção de 12.500 toneladas (Manzoni, 2005). A produção de mexilhões, principalmente no litotal catarinense, teve um declínio devido às variações de temperatura na água do mar, provocadas por mudanças climáticas,

acarretando na mortalidade dos animais em todas as fases de cultivo e às tecnologias rudimentares ainda utilizadas. Na safra de 2017, a produção de mexilhões foi de 11.056 toneladas, representando uma diminuição de 11,79% em relação ao ano anterior (12.534 toneladas) (Poli, 2004; Epagri, 2018).

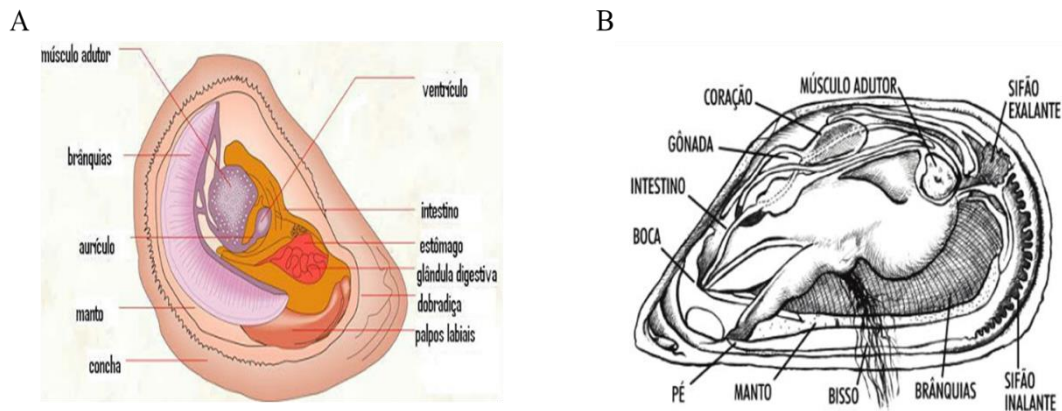


Figura 3: Representação esquemática da anatomia interna de ostras (A) e mexilhões (B). Adaptado de Lunetta, 1969 e Pilotto, 2015.

O mecanismo de alimentação de ostras e mexilhões é um processo de separação ativa, a partir do qual partículas orgânicas são ingeridas e selecionadas por tamanho em diferentes órgãos do animal. Essas partículas que estão em suspensão na água, são captadas pelas brânquias durante o processo de filtração e selecionadas nos palpos labiais (Figura 4). Em seguida, as partículas rejeitadas são envoltas em muco e eliminadas para o exterior como pseudofeces no fechamento das valvas, já as que são passíveis de serem digeridas são encaminhadas para o estômago onde são trituradas e absorvidas (Beecham, 2008).

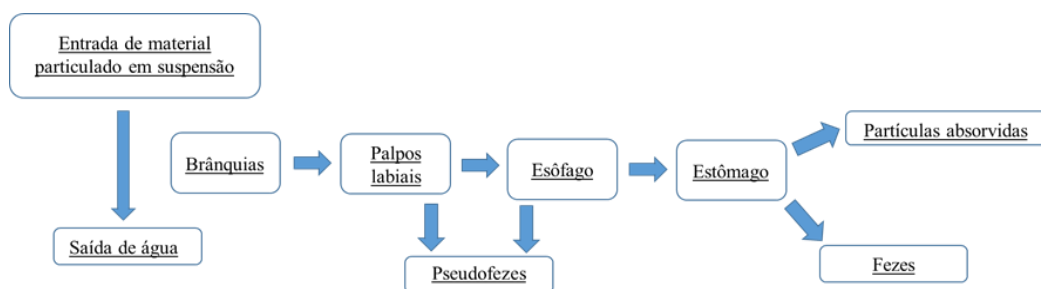


Figura 4: Visão simplificada do processo de absorção de nutrientes nos moluscos bivalves. Adaptado de Beecham, 2008.

A taxa de filtração desses animais é de aproximadamente 4 a 20 litros por hora (Pereira et al., 2006) e, durante esse processo, os animais podem filtrar e acumular em

seus tecidos eventuais patógenos humanos e outros contaminantes presentes nas águas onde são cultivadas (Bosh et al., 2009). Com o aumento da população próximo aos locais de cultivo e o consequente aumento do descarte de esgoto não tratado ou ineficientemente tratado nas águas litorâneas, tem crescido a detecção de patógenos bacterianos e virais tanto nas águas de cultivo como nos próprios animais (Souza et al., 2012).

### 1.3) Legislação Brasileira

A Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, estabelece que a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deve exceder 43 por 100 mL nas águas salinas de cultivo de moluscos bivalves destinados a alimentação humana (Brasil, 2005).

A resolução nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que trata sobre os padrões microbiológicos para alimentos, exige a pesquisa de *Salmonella spp.* e *Staphylococcus coagulase* positiva em moluscos *in natura*, resfriados ou congelados (Brasil, 2001).

Em maio de 2012, o Ministério de Aquicultura e Pesca, através da Instrução Normativa Interministerial número 7, instituiu o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), que tem a finalidade de estabelecer requisitos mínimos necessários para a garantia da inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, bem como monitorar e fiscalizar o atendimento desses requisitos. O PNCMB abrange as etapas de retirada, trânsito, processamento e transporte de moluscos bivalves e prevê, assim como a Portaria nº 204, de 28 de junho de 2012, o monitoramento de biotoxinas produzidas por algas marinhas e de microorganismos contaminantes (Brasil, 2012). O padrão microbiológico é monitorado por meio da estimativa da densidade média em Número mais provável (NMP) de *Escherichia coli* (*E. coli*) em 100g da parte comestível dos moluscos bivalves (Brasil, 2012), não havendo nenhum indicador viral. De acordo com esse monitoramento, a retirada de moluscos bivalves é classificada como liberada (< 230 NMP *E. coli*), liberada sob condição (> 230 e < 46.000 NMP *E. coli*) e suspensa (> 46.000 NMP *E. coli*). A legislação define que os moluscos bivalves procedentes das áreas de cultivo liberadas sob

condição podem ser comercializados após: i) depuração, ii) processamento térmico que permita eliminar os microrganismos patogênicos ou iii) remoção de vísceras e gônadas conforme a espécie processada (Brasil, 2012). Entretanto, não é fornecido nenhum detalhamento da forma que esses processamentos devem ser realizados ou de suas eficácias.

#### **1.4) Patógenos humanos relacionados ao consumo de molusco bivalves**

A associação entre doenças infecciosas transmitidas por moluscos e poluição por esgoto foi documentada pela primeira vez no final do século XIX e início do século XX, com numerosos surtos de febre tifóide em vários países europeus e nos Estados Unidos (Allen, 1899; Darra Mair, 1909; Wilson, 1928; Rippey, 1994). O reconhecimento de moluscos bivalves como fonte de riscos de doenças infecciosas levou ao estabelecimento, pela maioria dos países, de controles sanitários em sua produção, áreas de colheita e comercialização. Esses regulamentos também incluem tratamento térmico ou depuração, para reduzir o risco de transmissão de doenças. Na depuração, os animais retirados do mar são mantidos em tanques com sistema de fluxo aberto ou em recirculação, contendo ao menos um método de desinfecção da água. Nessas condições, eles realizam sua atividade de bombeamento e filtração por um período suficiente para expulsar o conteúdo intestinal contaminado, de modo que os vírus e bactérias patogênicas sejam eliminados (Brasil, 2012). Entretanto, é importante apontar que fatores como a utilização de tanques que permitam a correta limpeza e descontaminação; estrutura dos tanques que possibilitem a separação das fezes, prevenindo a recontaminação dos animais; e um sistema com bom fluxo de água, desinfecção e oxigenação são necessários para que o processo de depuração não seja ineficaz na eliminação total de partículas virais durante os processos comerciais convencionais pós-colheita (Wyn-Jones and Sellwood, 2001; Loisy et al. 2005; Corrêa, 2010; Rupinik et al., 2018).

As gastroenterites associadas ao consumo de moluscos bivalves têm sido relatadas há várias décadas, sendo a maioria devido à contaminação fecal dos ecossistemas aquáticos de cultivo (Stafford et al., 1997; Simmons et al., 2001; Chan et al., 2006; Souza et al., 2013; Le Mennec et al., 2017; Schaeffer et al., 2018). Algumas bactérias de origem fecal envolvidas na contaminação dos moluscos bivalves, incluindo as pertencentes aos gêneros *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia*, apresentam correlação fraca com a contaminação viral (Flannery et al., 2013), ainda que se encontrem em concentração

aceitáveis no ambiente, pois são eliminadas facilmente durante o processo de depuração com água do mar estéril, não assegurando a inexistência de outros patógenos, principalmente os vírus, que são mais resistentes à inativação por esse tipo de tratamento (Baggi et al., 2001; Ortega et al., 2009).

Os principais agentes etiológicos de doenças associadas ao consumo de moluscos bivalves são os vírus entéricos, incluindo os norovírus, adenovírus humanos (HAdV), rotavírus, enterovírus e os vírus da hepatite A e E (Le Guyader et al., 2000; Batz et al., 2011; Bigoraj et al., 2014; Iritani et al., 2014; Hassard et al., 2017; La Rosa et al., 2017). Esses microrganismos são comumente excretados em altas concentrações nas fezes de indivíduos infectados (média de  $10^{11}$  cópias genômicas por grama), sendo capazes de contaminar direta ou indiretamente a água do mar e, conseqüentemente, os moluscos bivalves cultivados nessas áreas. Eles permanecem viáveis por meses nesses ambientes e possuem uma baixa dose infecciosa (10–100 partículas), podendo ocasionar surtos de doenças em indivíduos susceptíveis que consumirem os moluscos contaminados (Cheng et al., 2005; Rodríguez-Lázaro et al., 2012; Bellou et al., 2013).

Diferentes vírus entéricos humanos responsáveis por surtos de gastroenterite foram detectados em ostras e mexilhões em diferentes países (Mesquita et al., 2011; Lowther et al., 2012; Fusco et al., 2017). Muitas dessas espécies comerciais são comuns nos ambientes costeiros, onde a presença de águas doces, salobras e marinhas, junto aos altos níveis de nutrientes, favorecem seu crescimento. Porém, infelizmente, essas águas também são frequentemente contaminadas com esgoto humano (Shieh et al., 2003; Ueki et al., 2005; Iwai et al. 2009; Schaeffer et al., 2018), o que favorece a concentração de patógenos gastroentéricos nestes animais (Lees 2000; Pommepuy et al. 2008). Devido ao grande número de surtos de infecções oriundos do consumo de moluscos bivalves associados ao norovírus dos genogrupos I e II, estes têm sido considerados os mais relevantes do ponto de vista da segurança alimentar (Koopmans & Duizer 2004; Taylor & Nat 2011).

Vários estudos realizados no Brasil apontaram a presença de vírus entéricos patogênicos em altas frequência e concentrações em águas de cultivo de mexilhões e ostras (Souza et al., 2018; Keller et al., 2019; Pilotto et. al., 2019). Entretanto, o norovírus destaca-se por ser o mais frequentemente encontrado nos moluscos devido a relação com sua alta prevalência nas comunidades, onde o vírus é transmitido de pessoa para pessoa (Ferreira et al., 2012; Costa et al., 2017; Reymão et al., 2018).

## **1.5) Norovírus**

Os norovírus são os principais agentes etiológicos das gastroenterites não bacterianas em todo o mundo. Eles são responsáveis por um quinto de todos os casos de gastroenterite aguda (AGE) em crianças com menos de 5 anos de idade, resultando em cerca de 4,2 bilhões de dólares em custos diretos ao sistema de saúde a cada ano e mais de 200.000 mortes infantis, principalmente em países em desenvolvimento (Atmar et al., 2010; Le Guyader et al., 2010; Ahmed et al., 2014; Nguyen et al., 2017).

São vírus pequenos, não envelopados e altamente infecciosos (Teunis et al., 2008). O alto número de partículas virais nas fezes e vômito, a alta estabilidade no ambiente, resistência à desinfecção e baixa dose infecciosa são fatores que contribuem para a alta infecciosidade e rápida transmissão do vírus (Lopman et al., 2012; Atmar et al., 2008). Soma-se a estas características, o fato destes vírus possuírem RNA como genoma, altas taxas de mutação, e elevadas taxas de recombinação gênica, o que favorece uma rápida evolução. Estes mecanismos garantem a diversidade genética e a emergência de cepas variantes epidêmicas ou pandêmicas, com adaptação ao hospedeiro, escape da resposta imunológica, e consequente permanência na população humana, além de impor um desafio ao desenvolvimento de vacinas eficazes (Donaldson et al., 2010; De Graaf et al., 2016; Rocha-Pereira et al., 2016)

### **1.5.1) Histórico**

Nas décadas de 1940 e 1950, e principalmente a partir dos anos 70, iniciou-se, no campo da virologia, a procura por um agente infeccioso que pudesse estar implicado nos casos de gastroenterites cujas etiologias bacterianas haviam sido excluídas. A doença chamada de “síndrome” era caracterizada por um conjunto de sinais/sintomas clínicos que envolviam vômito, diarreias, dores abdominais que podiam se manifestar isoladamente ou em conjunto. Desde então, tentativas de cultivar e caracterizar *in vitro* o patógeno responsável pela doença foram realizadas em células de vários animais, contudo sem sucesso (Reimann et al., 1945; Gordon et al., 1947; Jordan et al., 1953).

No período de outubro a novembro de 1968, ocorreu um surto de gastroenterite numa escola na cidade de Norwalk, Ohio, Estados Unidos, em que metade dos alunos e professores e aproximadamente um terço dos familiares adoeceram. As tentativas iniciais

de identificar o agente causador foram fracassadas, porém amostras coletadas de pessoas doentes foram utilizadas como inóculos em estudos experimentais no *National Institute of Health* nos quais os voluntários inoculados apresentaram os sintomas típicos da síndrome (Dolin et al., 1971).

Em 1972, Kapikian e colaboradores, por meio de microscopia eletrônica, identificaram partículas virais nas amostras de voluntários infectados com o inóculo de amostras do surto de Norwalk (Kapikian et al., 1972). O vírus foi denominado de agente de Norwalk e se constituiu no primeiro agente infeccioso viral associado à gastr enterite (Figura 5). Estudos posteriores demonstraram outros vírus morfológicamente similares, pequenos e arredondados também associados a gastroenterites (Appleton et al., 1977; Thornhill et al., 1977; Dolin et al., 1982), denominados então *Small Round Structured Viruses* (SRSVs). Sendo assim, a classificação desses vírus foi inicialmente baseada na morfologia ao microscópio eletrônico e o vírus Norwalk foi considerado a cepa protótipo dos SRSVs (Atmar & Estes, 2001).

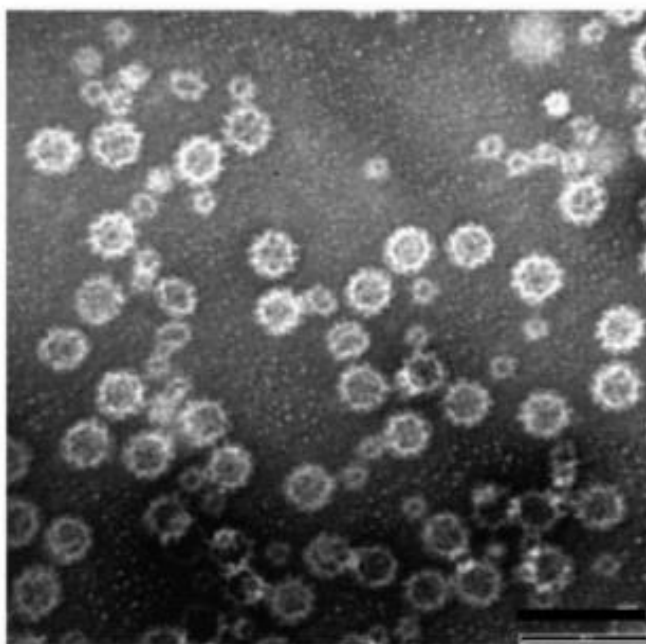


Figura 5: Agregado de partículas do agente de Norwalk encontrado em filtrado de fezes por microscopia eletrônica. Adaptado de Kapikian e colaboradores (1972).

Devido a características das partículas como densidade em gradiente de centrifugação, tamanho e estabilidade ao ácido e éter, o vírus Norwalk e os

11 outros SRSVs até então descritos foram classificados como “parvovirus-like” (Dolin et al., 1972). Entretanto, Greenberg (1981) propuseram a classificação do vírus Norwalk na família *Caliciviridae*, baseados na estrutura protéica do vírion. Posteriormente, a classificação do Norwalk como calicivírus foi reforçada por meio da clonagem do genoma, evidenciando seu genoma composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva (Jiang et al., 1990). Outros estudos confirmaram a relação genética entre Norwalk, os outros SRSVs e os calicivírus (Dingle et al., 1995; Lambden et al., 1995; Hardy & Estes, 1996; Seah et al., 1999). Com o avanço na biologia molecular, foi possível a classificação de acordo com o genoma, permanecendo então na família *Caliciviridae* (Jiang et al., 1990).

### **1.5.2) Estrutura e genoma viral**

Os norovírus são vírus pequenos, medindo de 26 a 37nm de diâmetro, não envelopados e exibem simetria icosaédrica  $T = 3$ , com capsídeo viral composto por 1 a 2 cópias da proteína VP2 e 180 cópias da proteína VP1, que se organizam em 90 dímeros, formando 32 arcos protuberantes arranjados em forma de “cálice” (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003). A proteína estrutural VP1 é a maior proteína que compõe o capsídeo viral, contendo aproximadamente 530-555 aminoácidos e responsável pelas funções de montagem, interações com o hospedeiro e imunogenicidade. Ela se divide em dois domínios principais denominados S (*shell*), região mais conservada, e P (*protuding*), região mais variável, que são unidas por uma dobradiça (Hardy, 2005). O primeiro domínio está localizado o braço N-terminal, que é a região mais interna do capsídeo, já o segundo domínio é dividido em dois subdomínios P1, que está compreendido entre os aminoácidos 226 - 278 e 406 - 520, e P2 que está compreendido entre os aminoácidos 279 a 405. O subdomínio P2 está localizado mais externamente (no topo dos arcos), e por isso considerado uma região hipervariável que desempenha papel importante na ligação do vírus com o receptor celular e na antigenicidade viral (Figura 6) (Prasad et al., 1999; Tan & Jiang, 2005; Cao et al., 2007).



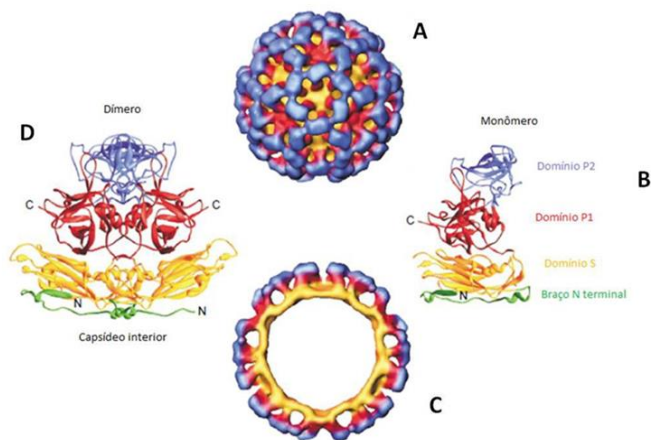


Figura 6: Descrição esquemática de uma partícula viral de norovírus: superfície viral (A). Proteína monomérica do capsídeo (B) dividida em uma região N-terminal (verde), um domínio S (amarela) e um domínio P subdividido em P1 e P2 (vermelho e azul respectivamente). Corte transversal da partícula viral (C). Dímeros da proteína do capsídeo (D). Adaptado de Hutson e colaboradores (2004).

Seu genoma é constituído de um RNA de fita simples, polaridade positiva, de aproximadamente 7,6 Kb, poliadenilado na extremidade 3' e com uma VPg, envolvida na replicação do genoma, ligada covalentemente na extremidade 5'. O RNA genômico é organizado em três fases abertas de leitura (ORFs do inglês *Open Reading Frames*): i) a ORF1 codifica uma poliproteína não estrutural, que é clivada em várias proteínas essenciais para a replicação viral (p48, p40, p22, VPg e a RNA polimerase RNA dependente); ii) a ORF2 codifica a proteína VP1(≈60KDa), principal proteína do capsídeo e; iii) a ORF3 codifica a VP2, uma proteína pequena também constituinte do capsídeo viral (Figura 7) (Glass, 2000; Katayama, 2002; Chen et al., 2006; Green, 2013).

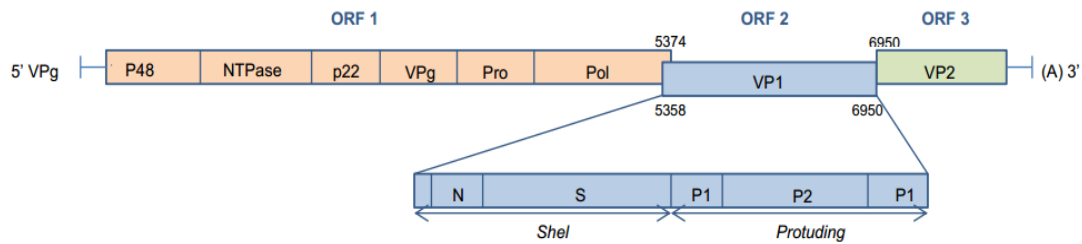


Figura 7: Representação esquemática do genoma dos norovírus. Proteínas não estruturais: P48, NTPase, P22, VPg, Protease e RNA Polimerase RNA dependente (RpRd). Proteínas estruturais: VP1 e VP2. Adaptado de Donaldson (2010).

### 1.5.3) Classificação

A família *Caliciviridae* apresenta cinco gêneros, dois importantes na saúde humana (*Norovirus* e *Sapovirus*) e três de interesse veterinário (*Lagovirus*, *Vesivirus* e *Nebovirus*), cada um representando um distinto clado genético dentro da família. Embora a maioria dos estudos diagnósticos tenham sido concebidos visando a detecção dos norovírus, o que provavelmente levou a uma subvalorização da relevância dos sapovírus, é inegável a importância epidemiológica dos norovírus nos quadros de diarreia grave (Atmar & Estes, 2001; Farkas et al., 2008; L'Homme et al., 2009; Day et al., 2010; Wolf et al., 2011; Mikaelson et al., 2014; Mor et al., 2017).

Devido a grande diversidade genética, os norovírus são divididos em genogrupos e genótipos baseado em um sistema de classificação filogenética que utiliza a sequência aminoacídica completa da proteína VP1 (Zheng et al., 2006; Kroneman et al., 2013). De acordo com este sistema, os norovírus são divididos em dez genogrupos (GI a GX) (Figuras 8 e 10). Os genogrupos GI, GII, GIV, GVIII e GIX são capazes de causar doenças em humanos, sendo GI e GII os de maior impacto epidemiológico (Vinjé, 2015; Chhabra et al., 2019). Os genogrupos, por sua vez, são subdivididos em 49 genótipos (Figuras 9A, 9B e 10), em que GI e GII compartilham menos de 50% de identidade na VP1 e os seus genótipos apresentam menos de 20% de homologia (Vinjé et al., 2000; Zheng et al., 2006). Baseando-se na sequência parcial do gene que codifica a RNA polimerase RNA dependente (RpRd), os norovírus também são descritos em 60 P-grupos, que são subdivididos em P-tipos (Figura 10). No caso da subtipagem em variantes GII.4, foi

decidido que a classificação seria baseada no grupamento filogenético e que novas variantes somente seriam reconhecidas depois de se tornarem epidêmicas em pelo menos duas regiões geograficamente diferentes (Chhabra et al., 2019).

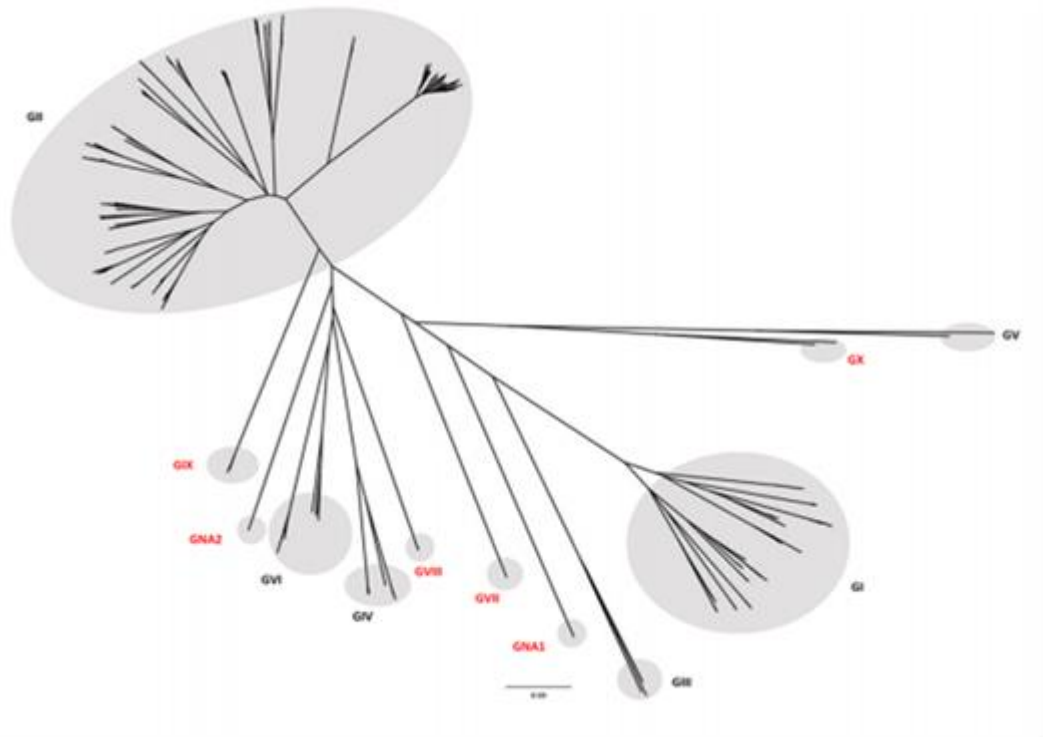


Figura 8: Classificação filogenética dos norovírus baseada na sequência de aminoácidos da VP1 em dez genogrupos e dois não atribuídos (NA). Adaptado de Chhabra e colaboradores (2019).

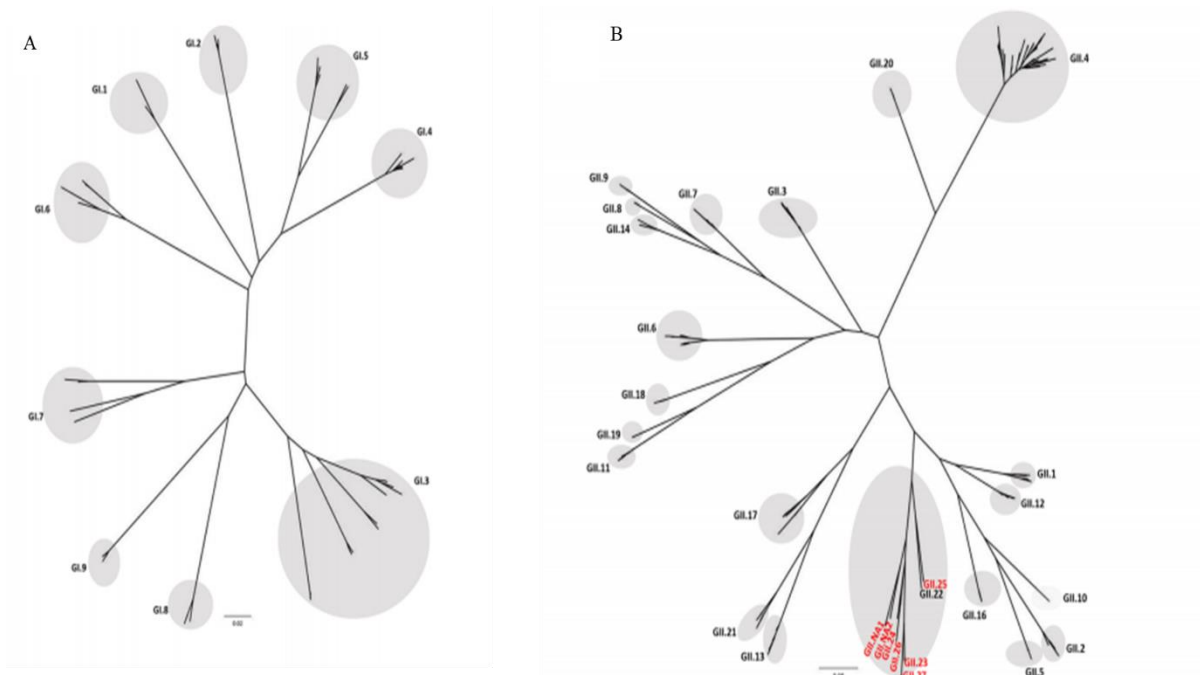


Figura 9: Classificação filogenética dos norovírus baseada na sequência de aminoácidos da VP1. A) Genótipos de GI e B) genótipos de GII. Adaptado de Chhabra e colaboradores (2019).

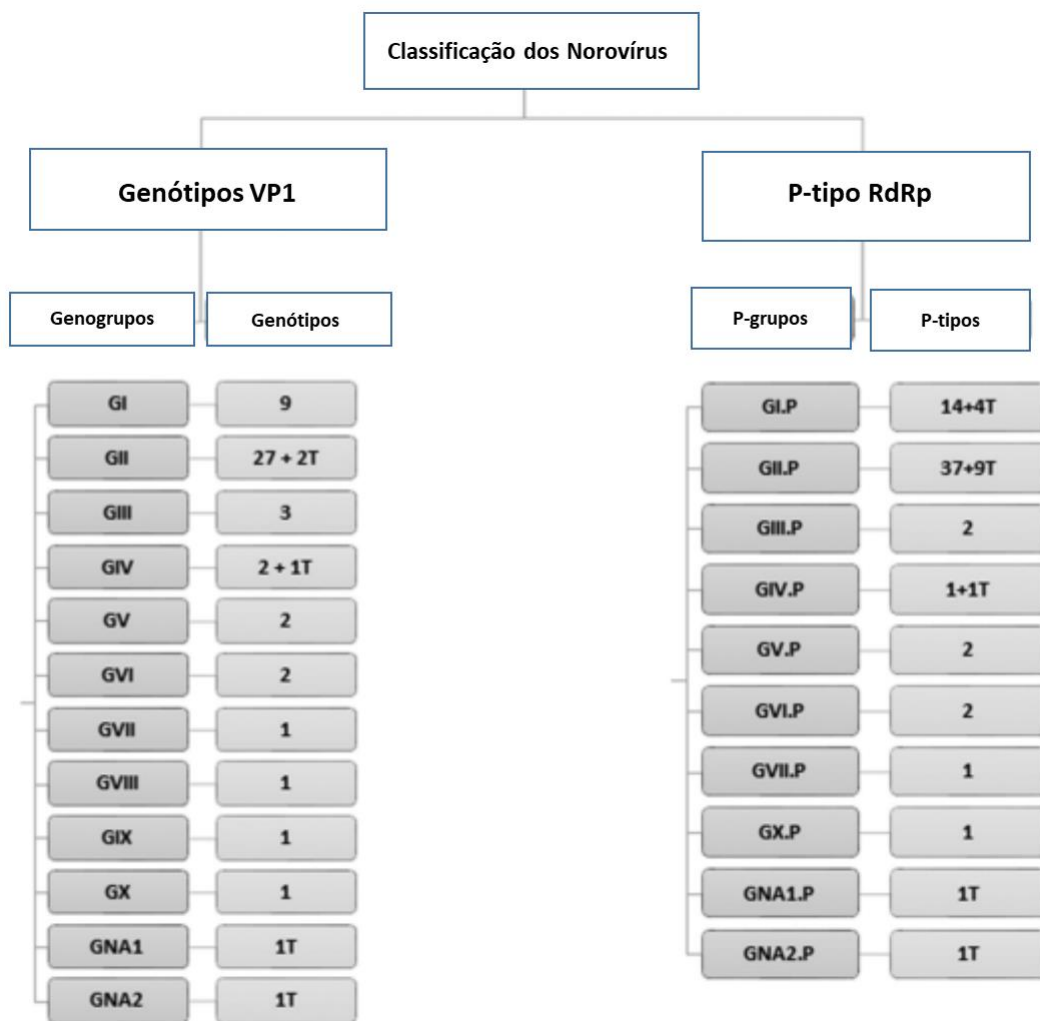


Figura 10: Classificação dos norovírus em genogrupos e genótipos baseada na sequência completa da VP1, e o número de P-grupos e P-tipos com base na sequência de uma região parcial da RdRp na extremidade 5' da ORF1. Adaptado de Chhabra e colaboradores (2019).

Assim, a nomenclatura padrão universal dos norovírus está baseada nas sequências das duas regiões genômicas (ORF1 e ORF2). Por exemplo, se uma cepa é classificada pela sequência da polimerase como GII.7 e pelo capsídeo como GII.6, sua nomenclatura é GII.P7-GII.6 (Kroneman et al., 2013), entretanto a nova nomenclatura definida por Chhabra e colaboradores em 2019 passa a designar primeiro o nome do capsídeo seguido pelo tipo P, por exemplo, de GII.P16-GII.4 Sydney para GII.4 Sydney [P16], ou GII.P7-GII.4 para GII.4[P7]. Quando obtém-se a sequência da ORF-1 e não se determina a da ORF-2 correspondente, esta é chamada de “órfã”, pois pode associar-se “promiscuamente” com diferentes capsídeos. Genótipos ORF1 órfãos passaram a ser representados preliminarmente por letra minúscula ao invés de números, até a

identificação do capsídeo correspondente (Bull et al., 2007; Kroneman et al., 2013). Este é o caso de GII.b, que inicialmente foi considerado um recombinante obrigatório (Bruggink et al., 2009; 2013) e posteriormente foi renomeado como GII.P21 (Kroneman et al., 2013).

A classificação dos norovírus é coordenada pelo *Norovirus Classification Working Group* (NCWG), que é constituído por um grupo de pesquisadores de diferentes países com *expertise* em pesquisas com norovírus (Kroneman et al., 2011). Duas redes de vigilância epidemiológica de norovírus estão disponíveis para a genotipagem de sequências de nucleotídeos, fornecendo o genótipo de acordo com as ORFs 1 e 2: O NoroNet mantida por virologistas e epidemiologistas de 13 países europeus (Duizer et al., 2008) e o NoroSurv, mantida pelo CDC (do inglês *Centers for Disease Control*) que compartilha dados sobre as tendências globais da diversidade das cepas dos norovírus em crianças menores de 5 anos. Ambas utilizam o mesmo banco de sequências de referência de norovírus disponível no GenBank

Dois principais mecanismos de diversificação genética conduzem a evolução dos norovírus: as mutações pontuais e os eventos de recombinação. O primeiro mecanismo está relacionado à rápida capacidade evolutiva viral associada à frequente emergência de novas cepas variantes desses vírus. O acúmulo de mutações no subdomínio P2 da proteína VP1, região hipervariável do genoma, originam alterações nos sítios antigênicos e de ligação aos receptores celulares, com implicações diretas na susceptibilidade do hospedeiro às infecções por norovírus e o desenvolvimento de vacinas (White, 2014; Mallory et al., 2019). Os eventos de recombinação constitui um importante mecanismo de emergência de novas variantes de norovírus, onde a região de junção entre as ORFs 1 e 2 é o principal ponto de recombinação do genoma viral, que pode ocorrer entre vírus de mesmo genótipo ou de genótipos diferentes. A interação de uma nova RdRp com as proteínas VP1 e VP2, altera positivamente a eficiência na replicação viral e favorece a diversidade genética (Bull et al., 2007; de Graaf et al., 2016).

#### **1.5.4) Epidemiologia e aspectos clínicos da infecção**

Os norovírus infectam pessoas de todas as idades e são causa de gastroenterite em diversos ambientes fechados, como universidades, hospitais, casas de repouso, creches e quartéis militares (Ferreira et al., 2012; Bányai et al., 2018; Huang et al., 2017; Morillo

et al., 2017; Kanamori et al., 2018; Volpini et al., 2019). Eles são considerados a principal causa de surtos e casos esporádicos de gastroenterite no mundo (Ahmed et al., 2014). Estima-se que os norovírus causem 64.000 episódios de diarreia que necessitam de hospitalização, 900.000 episódios que levam crianças à visitas médicas em países desenvolvidos e 212.000 óbitos por ano no mundo (Patel et al., 2008; Pires et al., 2015). O grupo referência em epidemiologia sobre doenças transmitidas por alimentos (*Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group - FERG*) da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que os norovírus causaram 684 milhões de casos de gastroenterites no ano de 2010 e foram a principal causa no mundo de doença transmitida por alimentos (Ahmed et al., 2014).

Os norovírus do genogrupo GI são os mais associados às gastroenterites virais vinculadas ao consumo de moluscos bivalves (Le Guyader et al., 2012; Kittigul et al., 2016; Farkas et al., 2018). Uma das explicações é que este genogrupo, assim como o GII.4, tem a capacidade de se ligar fortemente a antígenos presentes nas células dos tecidos digestivos das ostras, ausentes em tecidos mais externos dos animais. Estes antígenos são semelhantes aos antígenos presentes em células humanas, denominados antígenos do grupo sanguíneo HBGA e Lewis, que funcionam como receptores celulares para os norovírus. Isso facilita a ligação com o tecido do animal e dificulta a sua remoção durante os processos de purificação de moluscos bivalves, como por exemplo, a depuração (Le Guyader et al., 2012). Em amostras clínicas o norovírus GII é mais prevalente (Ferreira et al., 2012; Reymão et al., 2018; Jin et al., 2020). As diferenças na prevalência dos genogrupos de norovírus em pacientes com gastroenterite aguda e em moluscos bivalves podem ser devidas a fatores, como concentração viral, ligação específica ou não específica ao tecido do animal e persistência relativa viral (Tunyakittaveeward et al., 2019).

Os norovírus são transmitidos pela via fecal-oral, por contato entre indivíduos e ingestão de alimentos e água contaminados (Atmar & Estes, 2006). Também há evidências de transmissão pelo ar através de aerossóis produzidos pelos vômitos, forma de transmissão muito comum em hospitais, asilos e navios de cruzeiros (Marks et al., 2000; 2003; de Graaf et al, 2016). A dose infecciosa é baixa, representada por menos de 10 a 100 vírions, conforme dados de estudos experimentais em humanos (Hutson et al., 2004; Teuni et al., 2008).

Os norovírus são resistentes à inativação/desinfecção por desinfetantes normalmente utilizados contra outros vírus e a maioria das bactérias, como álcoois e compostos quaternários de amônio (Kingsley et al., 2014). São classificados como agentes biológicos de classe B, em função da alta estabilidade no ambiente, pela alta infecciosidade, pelo súbito e explosivo estabelecimento dos surtos e pela natureza debilitante da doença (Hutson et al., 2004). Nos moluscos bivalves os norovírus podem ser detectados mesmo após 72 horas de depuração provavelmente devido a maior interação desse vírus com os tecidos desses animais (Pilotto et al., 2019).

A média do período de incubação é de 12-48 horas e a média de duração dos sintomas de 12-72 horas (Graham et al., 1994). Os sintomas apresentados são vômito, diarreia, dor abdominal, febre, cefaleia, mialgia e calafrios. As fezes apresentam-se aquosas, com presença de muco. Pode haver complicações como desidratação, desequilíbrio eletrolítico, insuficiência renal, desnutrição e, em crianças jovens, convulsões benignas (Higuchi et al., 2017; Kim et al., 2018). Estudos demonstram um longo tempo de excreção viral, mesmo após a resolução dos sintomas. Há relatos de início de excreção viral de 18 horas após inoculação em voluntários e tempo de excreção viral variando de 13 a 56 dias (Okhuysen et al., 1995; Rockx et al., 2002; Atmar et al., 2008). Indivíduos podem apresentar infecções assintomáticas e, ainda assim, excretar elevados níveis de vírus nas fezes (Green, 2010; EFSA 2011).

A doença resultante da infecção pelos norovírus foi historicamente descrita como moderada e auto-limitada, com base em estudos de surtos e também em estudos envolvendo voluntários. Contudo, os sintomas podem durar mais tempo numa parcela de população, como em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (Rockx et al., 2005). Indivíduos com imunidade comprometida podem desenvolver infecção crônica com duração de meses ou até de anos e tem sido sugerido que eles podem funcionar como reservatórios dos vírus, devido à reduzida pressão imunitária (Karst et al., 2014; Vega et al., 2014).

#### **1.6) Detecção dos norovírus em amostras de moluscos bivalves**

A importância da realização de análises virológicas em diferentes matrizes ambientais, incluindo águas e alimentos, com o objetivo de diminuir os riscos à saúde humana vem sendo representada mundialmente por diferentes grupos (Manso et al.,



2013a; Terio et al., 2014; Polo et al., 2015; Fusco et al., 2017; Purpari et al., 2019; Pilotto et al., 2019).

Diversas tentativas de se identificar um sistema de cultura eficaz para os norovírus já foram feitas porém, sem sucesso. A inabilidade destes vírus em se propagarem em meios artificiais é o maior obstáculo para estudá-los (Karst, 2010). Portanto, neste contexto, a utilização de ferramentas moleculares para detecção dos norovírus em moluscos bivalves é fundamental, visto que, diferentes estudos tem demonstrado que nos surtos de origem alimentar, o alimento mais comumente envolvido foram as ostras, que quando consumidas cruas ou mal cozidas apresentam risco para a saúde humana (Hassard et al., 2017; El Moqri et al., 2019).

Dentre os principais desafios para o desenvolvimento de métodos para detecção de norovírus em amostras de alimentos estão a grande diversidade genética desses microrganismos e a baixa concentração nestas amostras, o que leva a necessidade de adoção de métodos sensíveis e específicos (Wang et al., 2018). Durante muitos anos esse vírus foi diagnosticado pela microscopia eletrônica, porém a introdução de técnicas moleculares, como a RT-PCR convencional, melhorou consideravelmente a sensibilidade de detecção do genoma viral, tornando-se o teste padrão para diagnóstico deste patógeno (Manso et al., 2014; La Bella et al., 2017; Lowther et al., 2018; Rosiles- González et al., 2019). Apesar da sua sensibilidade a RT-PCR é um método de alto custo que requer pessoas bem treinadas e equipamentos sofisticados. Geralmente há a necessidade do uso de metodologias complementares após a realização da RT-PCR convencional, como o sequenciamento, afim de caracterizar os genogrupos e genótipos dos norovírus (de Bruin et al., 2006; Mattison & Bidawid, 2009).

Outra técnica amplamente utilizada é a PCR em tempo real (qPCR), que revolucionou o processo de detecção/quantificação de fragmentos de RNA viral, visto que a RT-PCR convencional fornece resultados qualitativos. Esta técnica tem como vantagem ser muito mais sensível, fácil quantificação, rápida análise, alta precisão, melhor controle de qualidade, menor quantidade de material genético nas reações e baixo risco de contaminação (Trujillo et al., 2006; Manso et al., 2013b)

Embora as técnicas de biologia molecular permitam ultrapassar as limitações da cultura celular, existem diversos obstáculos (López-Campos et al. 2012) que podem influenciar na detecção dos norovírus em alimentos por estas técnicas como a baixa

eficiência dos procedimentos de extração e concentração viral e a presença de inibidores nas reações moleculares (FAO/WHO 2008).

Estudos utilizando técnicas moleculares apresentam grande variação no que diz respeito aos iniciadores (*primers*) de cadeia utilizados para detecção dos norovírus em moluscos bivalves (Nishida et al., 2007; Kittigul et al., 2016; Fusco et al., 2019; Keller et al., 2019). Trabalhos envolvendo a amplificação nucleotídica parcial das regiões A, B, C e D do genoma do vírus são comumente reportados na literatura. As regiões escolhidas são denominadas: região A (o gene RpRd na ORF 1), região B (extremidade 3' da ORF 1), região C (5' terminal da ORF 2) e região D (3' da ORF 2) (Kojima et al., 2002; Vinjé et al., 2004; Zheng et al., 2006; Siebenga et al., 2009). Estudos colaborativos internacionais demonstraram que, os *primers* desenvolvidos para amplificar a região da polimerase da ORF1 (região conservada) apresentaram melhores resultados (Vinjé et al., 2003; Vinjé et al., 2004; Vinjé, 2015).

Apesar de rápidas e sensíveis, as técnicas moleculares clássicas, dissociadas da cultura celular, não fornecem resultados referentes à infecciosidade viral, pois os laudos baseados simplesmente na detecção dos genomas virais, podem ser alarmantes e sem real significado epidemiológico, já que os vírus podem se encontrar inativados (Charles et al., 2009). Dessa forma, diferentes estratégias, como o uso de corantes intercalantes têm sido adotadas para prever a infecciosidade das partículas virais (Kim & Ko, 2012; Sanchez et al., 2012; Blanco et al., 2016). Essa abordagem baseia-se na capacidade dos corantes, como o propídio de monoazida (PMA), de penetrar apenas no capsídeo dos norovírus que estão danificados ou com a sua estrutura alterada. Essa condição permite que o genoma viral intercale covalentemente com o corante após passar por um sistema de fotoativação e incubação no escuro e então, o ácido nucléico não é detectado nos ensaios subsequentes de RT-qPCR, sugerindo que aquela partícula viral não esteja infecciosa (Figura 10) (Randazzo et al., 2016; Fuster et al., 2016; Falco et al., 2017; Randazzo et al., 2018).

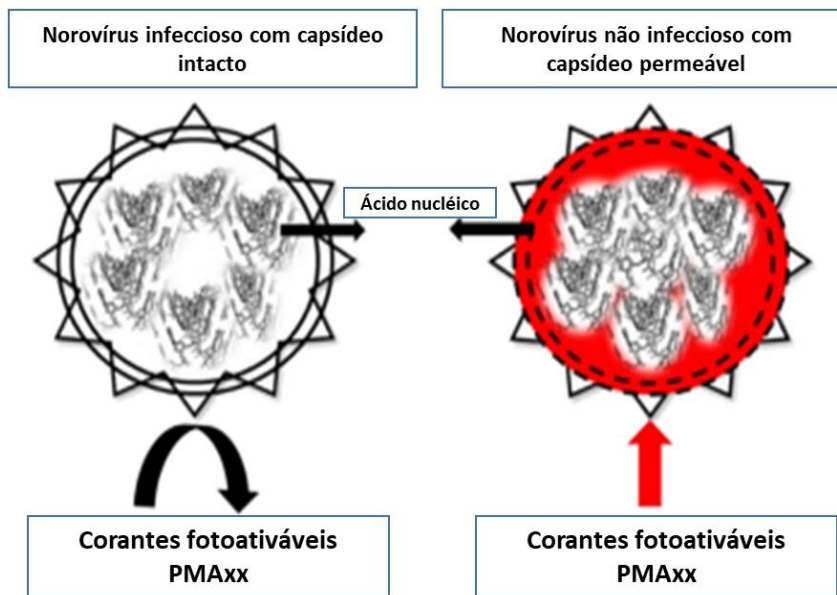


Figura 11: Mecanismo de identificação da partícula viral infecciosa por RT-qPCR. No ensaio, corantes fotoativáveis entram no capsídeo permeável dos norovírus não-infecciosos e interagem com o ácido nucleico do vírus. Adaptado de Gyawali e colaboradores (2019).

Devido a diversidade genética dos norovírus o monitoramento da emergência de novas variantes e recombinantes é uma ferramenta essencial na saúde pública. Portanto, novas técnicas foram desenvolvidas para regiões mais variáveis do genoma viral, afim de realizar a genotipagem dos norovírus circulantes. Com esta finalidade o sequenciamento das região B (ORF1) e C (ORF2) é utilizado como padrão para a caracterização molecular e estudos filogenéticos dos norovírus (Zheng et al., 2006; Vinjé, 2015). A importância de determinar os genótipos dos norovírus em amostras clínicas e ambientais é auxiliar nas investigações epidemiológicas, determinar a fonte comum de contaminação e descartar os surtos de gastroenterites que podem estar equivocadamente relacionados (La Bella et al., 2017).

## 2) Justificativa

Os norovírus são a causa mais comum de gastroenterite aguda em todo mundo e podem ser transmitidos por alimentos contaminados devido a sua baixa dose infecciosa. Uma das causas de infecção de origem alimentar por esses vírus é o consumo de moluscos crus ou mal cozidos (Le Guyader et al., 2006). Esses animais são capazes, através da sua atividade de filtração alimentar, de acumular em seus tecido patógenos virais presentes nos ambientes aquáticos poluídos.

Existem vários estudos mostrando a presença dos norovírus nas áreas de cultivo de moluscos bivalves e a principal fonte de contaminação são as águas residuais (Atmar & Estes, 2001; La Bella et al., 2017; Keller et al., 2019). Portanto, se faz necessário a adoção de medidas higiênico-sanitárias que assegurem a ausência destes patógenos. A Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que dispõe sobre a classificação e diretrizes das águas destinadas à aquicultura utiliza como padrões de qualidade da água os indicadores bacteriológicos e parâmetros físico-químicos, não levando em consideração a presença de vírus (Brasil,2005).

Durante o processo de depuração dos moluscos há uma diferença entre a eliminação de patógenos bacterianos e virais, pois são necessárias em média seis horas para eliminar 90% das bactérias e cerca de 96 horas para a eliminação de vírus entéricos, demonstrando que ausência de patógenos bacterianos não garante uma qualidade sanitária do molusco ou do ambiente aquático no qual são cultivados (Corrêa, 2010). Portanto, a detecção do genoma viral dos norovírus por métodos moleculares como a RT-qPCR nesses animais é fundamental, visto que os estudos sobre estes vírus são limitados pelas dificuldades associadas à propagação deles em cultura de células (Atmar & Estes, 2001).

No Brasil o cultivo de ostras e mexilhões ocorre principalmente na região sul, sendo esta a principal produtora nacional de moluscos bivalves e com várias pesquisas sobre a presença de patógenos virais nestes animais (Pilloto et al., 2019; Souza et al., 2018; Corrêa et al., 2012). Entretanto, existem outros estados costeiros que apresentam o cultivo de moluscos bivalves, como é o caso do Rio de Janeiro, maior produtor da região sudeste, porém não há estudos sobre a qualidade das áreas de cultivo em relação aos patógenos virais incluindo os norovírus.

Arraial do Cabo apresenta dois fatores relevantes que influenciam diretamente na pesca: uma singular projeção oceânica em relação ao litoral e presença do fenômeno da

ressurgência (Rodrigues, 2011). Essa região apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento do cultivo de moluscos (Lavinias et al., 2008). O município possui uma importância histórica no desenvolvimento de tecnologias relacionadas à maricultura no Brasil, uma vez que foi o pioneiro nas pesquisas de cultivo de moluscos e peixes marinhos (Poli, 2004; Marenzi et al., 2008). Esse fato sucedeu com o início das atividades do Projeto Cabo Frio, iniciado pelo então diretor do Instituto de Pesquisa da Marinha (IEAPM, 2003). Esse projeto teve início em novembro de 1971 e tinha como objetivo a criação de uma instituição destinada a apoiar e executar estudos do mar e de seus recursos oceanográficos e biológicos, estimulando a produção natural e promovendo a produção controlada de peixes, crustáceos e moluscos.

O cultivo de moluscos bivalves na cidade beneficia diretamente as famílias que vivem da renda gerada pela venda, porém principalmente no período de alta temporada o município recebe um grande fluxo de turistas de modo que as condições de saneamento ficam comprometidas favorecendo a contaminação das praias onde são cultivados os moluscos. Portanto, a segurança sanitária dos mariscos no município é importante devido ao grande consumo de ostras e mexilhões na região.

### **3) Objetivos**

#### **3.1) Objetivo geral**

Avaliar a disseminação de norovírus em moluscos bivalves das praias da cidade de Arraial do Cabo por ferramentas moleculares.

#### **3.2) Objetivos específicos**

- ✓ Detectar e quantificar norovírus GI e GII em ostras e mexilhões de três praias da cidade de Arraial do Cabo, RJ, por *One step* RT-qCPR.
- ✓ Caracterizar os norovírus detectados pelo sequenciamento direto dos produtos da PCR que amplificam as regiões B da ORF 1 e C da ORF 2 por RT-PCR.
- ✓ Investigar a diversidade genética dos norovírus em moluscos bivalves através da clonagem molecular seguida de sequenciamento.
- ✓ Comparar as sequências de nucleotídeos dos norovírus identificados nos moluscos bivalves de Arraial do Cabo (RJ) com sequências disponíveis no GenBank.
- ✓ Avaliar a infecciosidade dos norovírus detectados utilizando tratamento com propídio de monoazida.

### **4) Material e métodos**

#### 4.1) Área de estudo e amostragem

A cidade de Arraial do Cabo está situada ao extremo leste do estado do Rio de Janeiro, na Região dos Lagos. Ela cobre uma área de 152.305 km<sup>2</sup>, possui cerca de 28.000 habitantes e a maior parte do Produto Interno Bruto (PIB) local está associada ao turismo e à pesca (IBGE, 2010). As principais modalidades de pesca em Arraial do Cabo ocorrem tanto “à beiras de praias e encostas” (sem embarcação ou com embarcação a remo – canoas) como em “mar aberto” (Britto, 1999).

O município tem um litoral recortado por várias praias, enseadas e costões rochosos. As praias localizadas na área central são: Prainha, Praia do Forno, Praia dos Anjos e Praia Grande. Mais ao norte está a Praia do Pontal, ao leste estão as Prainhas, no continente, e Praia da Ilha (ou Praia do Farol), na Ilha de Cabo Frio. A oeste, em continuação à Praia Grande, está a Praia da Massambaba, que chega até Monte Alto e Figueira (distritos de Arraial do Cabo). Atividades de pesca e mergulho subaquático são frequentes nessas praias ao longo do ano (INEA, 2017).

No verão, especialmente entre dezembro e fevereiro, a cidade recebe um elevado número de turistas de diversas regiões do Brasil e América Latina, atingindo, no pico, um total de 300.000 habitantes temporários. Devido à alta densidade populacional nesse período, juntamente com a falta de infraestrutura local, um grande volume de esgoto não tratado é lançado nas águas costeiras, afetando o ambiente marinho e a saúde da população (Silva, 2004). Em janeiro de 2019, as praias do Forno, do Farol e dos Anjos sofreram graves danos ambientais e foram classificadas como impróprias para banho devido ao descarte direto de esgoto (Jusbrasil, 2019). Dentro desse contexto, o grande impacto ambiental na cidade afeta os moluscos bivalves, pois eles são retirados diretamente das encostas das praias onde são cultivados e a contaminação desses locais interfere diretamente na qualidade e no controle higiênico-sanitário desses animais.

Amostras de moluscos bivalves, ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões *Perna-perna*, foram coletadas em três áreas de cultivo de mariscos da cidade de Arraial do Cabo. Os pontos de coleta selecionados foram: Praia dos Anjos, localizada entre as praias de Forno e Atalaia, Praia do Farol, localizada na ilha de Cabo Frio, com acesso controlado pela Marinha do Brasil, e Praia do Forno, localizada entre as praias da Prainha e Anjos (Figura 12). Os mexilhões são cultivados nas três regiões, porém as ostras somente na praia do Forno.



Figura 12: Cidade de Arraial do Cabo (RJ) e os pontos de coleta de moluscos bivalves. Praia dos Anjos (A1), Praia do Farol (A2) e Praia do Forno (A3). Adaptado de Google Earth. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

Um monitoramento de 16 meses foi realizado nas três áreas de cultivo de mexilhões *Perna-perna* e ostras *Crassostrea gigas* onde cada amostra é equivalente à doze animais da mesma espécie. De março de 2018 a junho de 2019, as amostras de bivalves foram coletadas mensalmente, exceto durante a alta temporada de verão (meses de dezembro a março), quando foram realizadas coletas quinzenalmente. Essas amostras foram mantidas a 4 °C durante o transporte para o laboratório, onde foram processadas imediatamente ou armazenadas a -80 °C.

#### **4.2) Preparo de extratos de glândulas digestivas, concentração viral e controle interno**

A concentração dos vírus presentes nas glândulas digestivas foi realizada de acordo com o método descrito na ISO 15216-1: 2017 revisada (Anonymous 2017). Os tecidos digestivos dos moluscos bivalves foram dissecados e homogeneizados utilizando o *Tissue Ruptor* (Qiagen). Aproximadamente  $2,0 \pm 0,2$  g de cada amostra foram inoculados com 10  $\mu$ L ( $6,8 \times 10^5$ /ml) de bacteriófago PP7, usado como controle interno do processo, e em seguida foi adicionado 2 mL de solução de proteinase K (100  $\mu$ g/mL, Invitrogen). As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 5 min e incubadas a 37 °C sob agitação



constante (320 rpm) por 60 min. Em seguida, foram submetidas a uma segunda etapa de incubação a 60 °C por 15 min. Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas a  $3000 \times g$  por 5 min e, ao final do processo, o sobrenadante ( $\pm 2,5$  mL) foi coletado, aliquotado e armazenado a -80 °C até a extração do ácido nucléico viral.

#### **4.3) Extração do ácido nucleico viral**

Dois métodos de extração foram empregados para extração do RNA viral do concentrado de tecido digestivo das amostras.

O primeiro método foi o kit comercial *QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, CA, EUA), que é baseado na extração do ácido nucléico em 4 etapas (lise, ligação, lavagem e eluição) usando coluna de sílica. Primeiramente, um total de 140  $\mu$ L do concentrado viral foi incubado com o tampão AVL, contendo tiocianato de guanidina, em temperatura ambiente por 10 min para inativação de RNAses e lise da partícula viral. O tampão AVL contém RNA transportador que melhora a ligação do RNA viral à membrana de sílica e limita a sua possível degradação. Após a incubação, todo o volume foi adicionado à coluna contendo a membrana de sílica para que ocorresse a adsorção do ácido nucléico. A coluna foi centrifugada a 20.000g por 1min. Posteriormente, foram realizadas duas etapas de lavagem com os tampões AW1 e AW2, contendo cloridrato de guanidina, para que os possíveis contaminantes fossem removidos. Por fim, o RNA viral foi eluído em 60 $\mu$ L de tampão de eluição AVE.

O segundo método de extração do RNA viral foi com o kit *NucleoMag<sup>®</sup> RNA Virus Extraction Kit* (Macherey-Nagel, Dueren, Alemanha), que é baseado na propriedade que o ácido nucléico tem de se ligar em superfícies como as *beads* (esferas) magnéticas para que a adsorção do RNA ocorra. Em resumo, 500  $\mu$ L do concentrado foi incubado a 56°C por 10 min com uma solução contendo proteinase K e tampão de lise com tiocianato de guanidina. Em seguida, todo o volume foi incubado em placa de extração de 24 cavidades contendo tampão de ligação e esferas magnéticas, nas quais os ácidos nucléicos adsorveram. Após sucessivas lavagens com diferentes tampões fornecidos pelo fabricante, e com o auxílio de uma placa magnética acoplada embaixo da placa de extração, os ácidos nucléicos foram eluídos em 100  $\mu$ L de tampão de eluição.

Após a extração pelos dois métodos, o RNA viral foi armazenado a -80°C até sua utilização. Cada lote de extrações de ácidos nucléicos incluiu um controle negativo (água estéril) e um controle positivo para norovírus.

#### 4.4) Detecção e quantificação de norovírus e do controle interno (PP7)

Os norovírus genogrupos I e II e bacteriófago PP7 foram detectados por *One step* RT-qPCR, de acordo com os protocolos descritos por Kageyama et al., (2003) e Rajal et al., (2007) respectivamente. Em cada reação de 25µL de volume final, foram utilizados 13,5 µL do kit SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR (Invitrogen, CA, EUA), contendo os reativos necessários para a reação da PCR, e a enzima de transcrição reversa Taq SuperScript® III Platinum® necessária para que ocorra a transcrição do RNA viral da amostra para cDNA. Foram acrescentados à mistura de reação da qPCR os iniciadores e sondas (Tabela 3) na concentração final de 10µM.

Tabela 3: Iniciadores e sondas utilizados para a detecção de norovírus:

Vírus	Iniciadores / Sondas	Sequências (5' - 3')	Amplicons (pb)	Finalidade	Referências
Norovírus GII	COG2 – F (+)	CARGARBCNATGTTYAG RTGGATGAG	98	RT-qPCR	Kageyama et al. (2003)
	COG2 – R (-)	TCGACGCCATCTTCATTC ACA			
	RING2	TGGGAGGGCGATCGCAA TCT			
Norovírus GI	COG1 – F (+)	CGYTGGATGCGNTTYCA TGA	85	RT-qPCR	Kageyama et al. (2003)
	COG1 – R (-)	CTTAGACGCCATCATCA TTYAC			
	RING1	AGATYGGCATCYCCTGT CCA			
Norovírus GII	Mon 431 (+)	TGGACIAGRGGICCYAAY CA	214	PCR Convencional/ Sequenciamento	Beuret et al. (2002) Kojima et al. (2002)
	G2SKR (-)	CCRCCNGCATRHCCRTTR TACAT	557		
PP7	247F (+)	GTTATGAACCAATGTGG CCGTTAT		RT-qPCR	Rajal et al. (2007)
	320R (-)	CGGGATGCCTCTGAAAA AAG			
	247p	TCGGTGGTCAACGAGGA ACTGGAAC			

As amostras foram analisadas em duplicatas e com RNA sem diluição e diluído 1:10, para minimizar a presença de inibidores. Controles negativos, consistindo apenas dos reagentes sem adição de ácidos nucleicos provenientes das amostras, foram utilizados em cada reação. Curvas padrão de DNA sintético (gBlock® Gene Fragment, Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA) em diferentes e conhecidas concentrações de cópias genômicas ( $10^6$ – $10^0$  cópias genômicas/reação) contendo a região alvo de qPCR para cada vírus e PP7 foram usadas (Fumian et al., 2016), de modo que os genomas contidos nas amostras analisadas foram quantificados baseados em valores de Ct obtidos com as

diluições do bloco gênico (curva padrão) e os valores de Ct das amostras testadas. Todas as reações foram realizadas em placas de 96 cavidades (MicroAmp, Applied Biosystems, CA, EUA) e no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, CA, EUA).

As condições de reação para norovírus e PP7 foram as seguintes: 50 °C por 60 min para transcrição reversa, um ciclo de desnaturação a 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação de 95 °C por 15s para desnaturação e 60 °C por 1 min para hibridização dos iniciadores e extensão. As amostras que apresentaram uma curva sigmoïdal característica e um *cycle threshold* (Ct) < 40 foram consideradas positivas. A quantificação de norovírus e do bacteriófago PP7 foram expressas em número de cópias genômicas/grama de tecido digestivo (CG/g).

Todos os reagentes da RT-qPCR foram adicionados em sala livre de ácidos nucleicos e em outra sala foi acrescentado o RNA viral (5 µL), totalizando o volume final da reação (25 µL).

#### **4.5) Avaliação da eficiência de recuperação viral**

Para avaliar a eficiência de recuperação viral nas amostras de moluscos bivalves, o bacteriófago PP7 foi inoculado em três amostras do estudo, uma de ostra e duas de mexilhões. Cada amostra foi separada em duas frações de 2g de tecido digestivo. Uma das frações foi inoculada com  $1,8 \times 10^5$  de PP7 e a outra utilizada como controle negativo. As amostras (inoculadas e controles) foram submetidas simultaneamente à extração de RNA pelo método de extração com *beads* magnéticas (item 4.3) e a quantificação de RNA por RT-qPCR como descrito no item 4.4. O experimento foi realizado em triplicata em dois dias diferentes. Para este fim, o método de extração que usa coluna de sílica não foi utilizado por apresentar uma baixa eficiência.

As taxas de recuperação de PP7 foram estimadas em percentual, baseando-se no número de cópias genômicas de PP7 recuperadas após processamento de cada amostra em relação ao número de cópias genômicas inoculadas.

#### **4.6) Caracterização molecular dos norovírus nas amostras de bivalves**

Para a caracterização molecular e genotipagem dos norovírus detectados nas amostras dos bivalves, duas abordagens foram utilizadas: o sequenciamento direto de *amplicons* e a clonagem molecular seguida de sequenciamento.

Para o sequenciamento direto, as amostras positivas para norovírus GII que apresentaram Ct < 25 foram submetidas a *One-step* RT-PCR convencional utilizando iniciadores para amplificação de 557 pares de base (pb) da região de junção B e C do genoma viral (Tabela 3). A reação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 5 µL de RNA viral com as seguintes condições de ciclagem: 42°C por 30 min para transcrição reversa, desnaturação inicial a 95°C por 15 min, 40 ciclos de desnaturação (95°C por 30 segundos), hibridização de *primers* (50°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto), e extensão final à 72°C por 10 min.

Para o sequenciamento, foram escolhidas amostras que apresentaram produtos com banda única amplificada. Estes foram purificados usando o kit ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems, CA, EUA) ou o kit de purificação QIAquick *Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), seguindo as recomendações dos fabricantes. As reações de sequenciamento foram realizadas com os mesmos iniciadores da amplificação e Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, CA, EUA) no equipamento ABI Prism 3730xL (Applied Biosystems, CA, EUA) da Plataforma Institucional de Sequenciamento da FIOCRUZ.

A clonagem molecular foi aplicada para aumentar as chances de detectar diferentes genótipos de norovírus GII possivelmente presentes em uma mesma amostra. Para isso, *amplicons*, obtidos na reação de *One-step* RT-PCR descrita acima, das amostras selecionadas para o sequenciamento direto, foram submetidos a clonagem em kit TOPO® TA Cloning (Invitrogen). Posteriormente, o plasmídeo contendo o inserto foi transformado em uma célula hospedeira quimicamente competente (*Escherichia coli*) e, após as etapas de incubação no gelo, choque térmico (42 °C por 70 seg) e agitação (220 rpm) em estufa a 37°C por 1 hora, plaqueou-se a bactéria em uma placa de meio Luria-Bertani (LB) ágar e ampicilina (100µg/ mL) para crescimento e seleção das colônias. Entre 8 e 10 colônias isoladas foram coletadas de cada placa, cultivadas *overnight* à 37°C em 4 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100µg/ mL). Em seguida, 2,5 µL do material foram submetidos diretamente à amplificação por RT-PCR convencional para verificar a presença de banda específica para norovírus. As amostras que apresentaram a banda na altura específica (557 pb) foram sequenciadas na Plataforma Institucional de Sequenciamento da FIOCRUZ conforme descrito para o sequenciamento direto.

#### **4.7) Análise filogenética**

A análise do cromatograma do resultado do sequenciamento e as sequências consensuais foram obtidas utilizando o programa *Geneious Prime* (Biomatters Ltd, Auckland, Nova Zelândia), e os genótipos de norovírus foram atribuídos com base no novo sistema de nomenclatura (Chhabra et al., 2019) utilizando a ferramenta de genotipagem online Noronet (Duizer et al., 2008).

Dois conjuntos de dados de sequência foram construídos, um considerando a região que codifica RdRp (ORF1 parcial) e o outro incluindo a região de codificação do capsídeo (ORF2 parcial). Sequências comparáveis contendo sobreposição de ORF1 / ORF2 para diferentes genótipos de norovírus foram obtidas do banco de dados GenBank – *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A análise filogenética foi realizada para ambos os conjuntos de dados, incluindo sequências comparáveis de diferentes genótipos de norovírus. Árvores filogenéticas foram construídas usando o software de análise genética molecular (MEGA versão 7.0) (Kumar et al., 2015) e o método de reconstrução neighbor-joining. A matriz de distâncias genéticas foi estabelecida usando o modelo Kimura dois-parâmetros e 2000 réplicas de auto inicialização para suporte de ramificação (Kimura, 1980).

#### **4.8) Tratamento com PMAxx™ nos moluscos bivalves contaminados**

Para investigar a integridade da capsídeo viral, como método alternativo para avaliar a infecciosidade viral, as amostras positivas para norovírus GII apresentando Ct < 25 no RT-qPCR foram tratadas com PMA segundo metodologia descrita por Randazzo et al., 2018. O concentrado viral destas amostras foi dividido em duas frações de 100µL. A primeira fração foi tratada com 100µM de Propídio de monoazida (PMAxx™) e Triton 100-X a 0,5% (Fisher-Scientific) e a segunda fração foi tratada apenas com Triton 100-X a 0,5%. As frações foram incubadas no escuro à temperatura ambiente por 30 min à 150 rpm e, em seguida, expostas a 2 ciclos de 15 min de foto-ativação usando um aparelho fotoativador (PMA-Lite LED Photolysis Device) com uma incubação escura, em temperatura ambiente, de 15 min entre esses ciclos (Randazzo et al., 2018). Posteriormente, o RNA viral de ambas as frações foi extraído com o kit *NucleoMag® RNA Virus Extraction* e o RT-qPCR foi realizado para quantificação de norovírus como descrito anteriormente nos itens 4.3 e 4.4, respectivamente. A eficácia do pré-tratamento com PMAxx™ foi estimada comparando o número de cópias genômicas/grama de tecido digestivo obtido das frações tratadas e não tratadas.

#### **4.9) Análises estatísticas**

Todas as análises foram realizadas empregando o GraphPad Prism 5.0 (EUA). O teste t e o teste U de Mann-Whitney foram utilizados para avaliar, respectivamente, as correlações entre os resultados qualitativos e quantitativos obtidos no estudo. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ .

### **5) Resultados**

Durante o monitoramento de 16 meses, foram coletadas e analisadas 77 amostras de moluscos bivalves nos três pontos de cultivo da cidade de Arraial do Cabo, sendo, 19 amostras de ostras e 58 amostras de mexilhões.

Os norovírus foram detectados em 41,5% (n = 32) das amostras (Tabela 4). O método de extração de RNA por esferas magnéticas (kit *NucleoMag<sup>®</sup> RNA Virus Extraction*) foi o único que permitiu a detecção viral pela RT-qPCR. Nenhuma amostra foi positiva usando o método de extração baseado em coluna de sílica.

Os norovírus GII foram detectados em 29 amostras (37,7%), sendo o genogrupo mais prevalente no estudo. Para este genogrupo, o percentual de detecção do vírus foi semelhante nas amostras de ostras (36,84%) e mexilhões (37,93%), não havendo diferença estatística significativa ( $p \geq 0,05$ ). Tiveram também detecção de norovírus GI em apenas 4 amostras de mexilhões (5,2%) e uma amostra de mexilhão com coinfeção viral (1,3%) (Tabela 4).

Tabela 4: Detecção de Norovírus GI e GII em moluscos bivalves da cidade de Arraial do Cabo durante o período de monitoramento de 16 meses.

Moluscos bivalves	Amostras coletadas (n)	Detecção de norovirus - n (%)			
		GI	GII	GI + GII	Total
Ostras ( <i>Crassostreas gigas</i> )	19	0	7 (36,8)	0	7 (36,8)
Mexilhões ( <i>Perna-perna</i> )	58	3 (5,2)	21 (36,2)	1 (1,7)	25 (43,1)
Total	77	3 (3,9)	28 (36,4)	1 (1,3)	32 (41,5)

Variações de até 5 logs foram observadas nas concentrações virais nas amostras de moluscos (Figura 13). A quantificação mediana de norovírus GI nas amostras de mexilhões foi de  $2,1 \times 10^2$  CG/g, com variação de  $7,5 \times 10^1$  a  $3,8 \times 10^2$  CG/g.

Para norovírus GII, a quantificação mediana nas amostras de ostras foi de  $3,5 \times 10^6$  CG/g com variação de  $2,9 \times 10^4$  a  $3,28 \times 10^7$  CG/g e nas de mexilhões de  $2,8 \times 10^5$  CG/g com variação de  $6,0 \times 10^2$  a  $2,2 \times 10^8$  CG/g. As quantificações da carga viral do genogrupo II foram estatisticamente superiores às observadas para o genogrupo I em mexilhões ( $p = 0,0005$ ). O mesmo foi observado para as amostras de ostras em comparação aos norovírus GI detectados nos mexilhões, apresentando a mesma significância estatística.

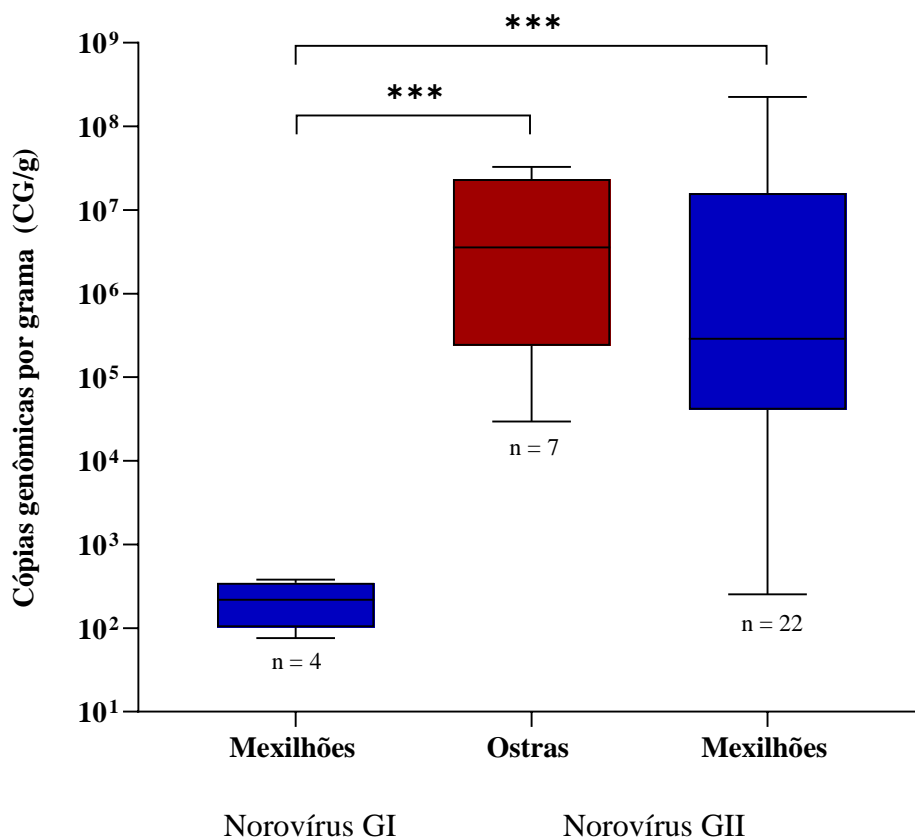


Figura 13: Quantificação de Norovírus GI e GII em amostras de moluscos bivalves coletadas na cidade Arraial do Cabo. \*\*\* diferença estatisticamente significativa.

O bacteriófago PP7, utilizado como controle interno do processo de extração viral, foi detectado em todas as amostras de ostras e mexilhões analisadas. As concentrações variaram de  $3,2 \times 10^4$  a  $5,0 \times 10^6$  CG/g (mediana  $1,1 \times 10^5$  CG/g) para ostras e  $6,6 \times 10^4$  a  $1,0 \times 10^7$  CG/g (mediana  $7,0 \times 10^5$  CG) para mexilhões (Figura 14). A quantificação de PP7 nas amostras de ostras foram estatisticamente inferiores que nas de mexilhões, mostrando diferença significativa na eficiência da extração viral destas amostras ( $p < 0,0001$ ).



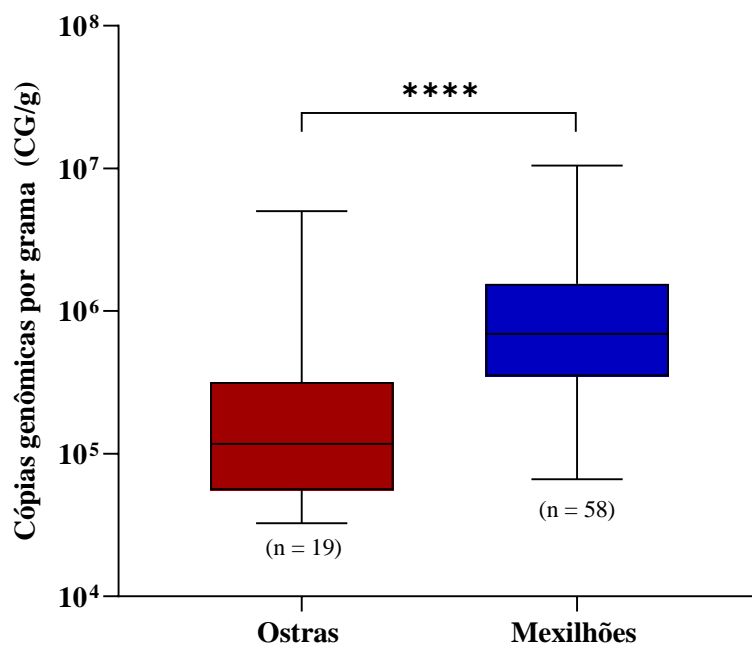


Figura 14: Quantificação de Bacteriófago PP7 como controle interno nas amostras de moluscos bivalves analisadas. \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa.

A eficiência de recuperação viral do método utilizado foi calculada após a inoculação do PP7 nas três amostras do estudo, extração do RNA viral e RT-qPCR. O percentual de recuperação médio foi 23,4%, variando entre 10,3% e 33,3% (Tabela 5). A amostra de ostra apresentou um percentual de recuperação viral inferior que as de mexilhões confirmando que a extração viral nesta espécie de molusco é menos eficiente.

Tabela 5: Taxas de recuperação viral de Bacteriófagos PP7.

<b>Amostras</b>	<b>PP7 inoculado (CG/g*)</b>	<b>PP7 recuperado (CG/ g)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
Mexilhão		$2,4 \times 10^4$	26,7
Mexilhão	$9,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	33,3
Ostra		$9,3 \times 10^3$	10,3

\*CG/g – Cópias genômicas por grama de tecido digestivo

Os norovírus foram detectados em moluscos bivalves ao longo dos 16 meses de coleta, com taxas de detecção de 30% a 60% não sendo possível estabelecer uma sazonalidade viral (Figura 15). Apenas em março de 2018 não houve a detecção do vírus. O mês de fevereiro de 2019 apresentou a maior taxa de detecção de norovírus (62%). Nos

meses de março, maio, e junho de 2019 foram detectadas mais amostras positivas quando comparadas ao ano anterior.

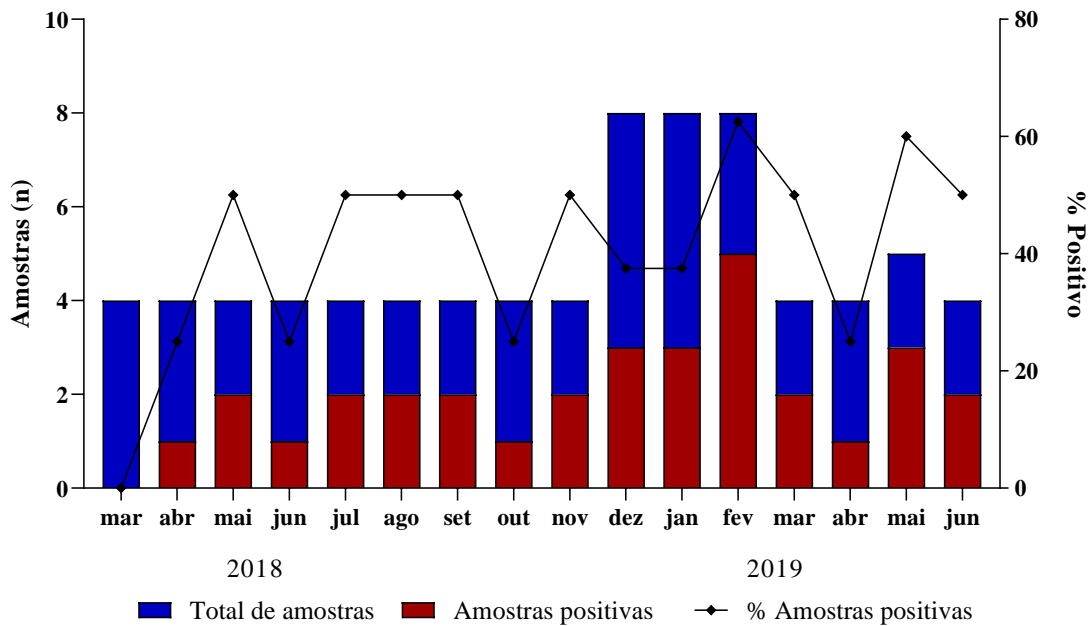


Figura 15: Distribuição mensal de amostras e amostras positivas para norovírus nas praias de Arraial do Cabo durante no período de 16 meses (março de 2018 a junho de 2019).

Apesar da maior detecção de norovírus no verão, não houve diferença estatisticamente significativa de detecção entre as estações do ano ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 16). Houve um aumento de 100% de amostras positivas entre a estação de outono de 2018 ( $n = 3$ ) e a mesma estação em 2019 ( $n = 6$ ).

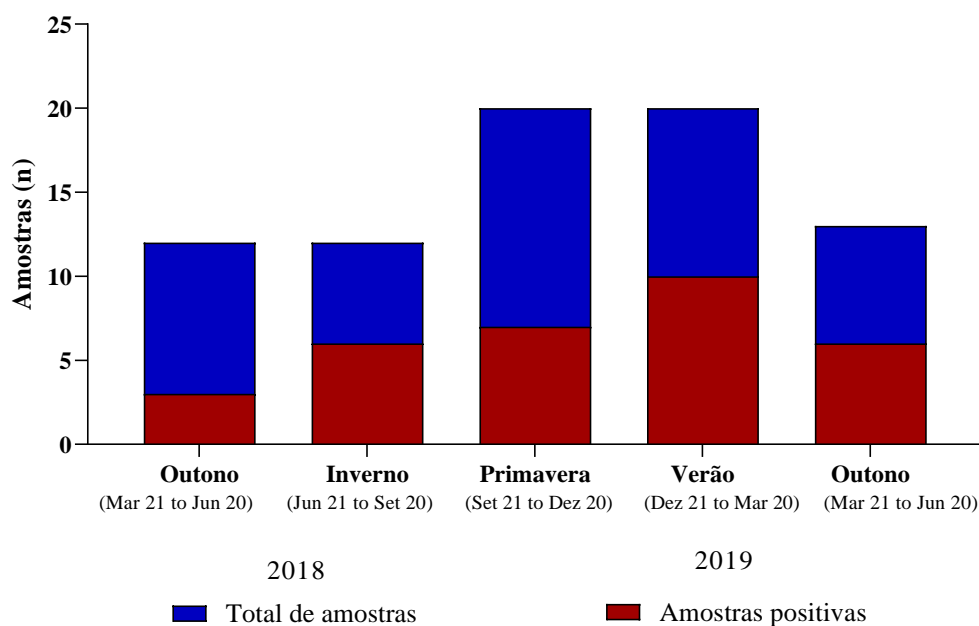


Figura 16: Detecção de Norovírus GI e GII em moluscos bivalves de acordo com as estações do ano (2018-2019).

A contaminação das praias interfere diretamente na possibilidade de bioacumulação de norovírus pelos moluscos bivalves e neste estudo a Praia do Farol apresentou maior detecção viral que as demais praias (57,9%) com prevalência do genogrupo II (90,9%) (Tabela 6). Na Praia do Forno, foram coletadas quarenta amostras e o percentual de detecção de norovírus foi igual nas ostras e nos mexilhões (17,5%). Os norovírus foram detectados em mexilhões das três áreas analisadas, com maior percentual (57,9%) na Praia do Farol, seguido da Praia dos Anjos (38,9%) (Figura 17). O percentual de detecção de norovírus GI nos moluscos foi de 14,2% na Praia dos Anjos e Praia do Forno e de 9,1% na Praia do Farol.

Tabela 6: Frequência de Norovírus GI e GII em moluscos bivalves de acordo com os pontos de coleta no período de 2018-2019.

Áreas de coleta	Total de amostras	Positivas n (%)	Genogrupos Identificados
Praia dos Anjos	18	7 (38,9)	GI, GII
Praia do Forno	40	14 (35)	GI, GII
Praia do Farol	19	11 (57,9)	GII, GI + GII

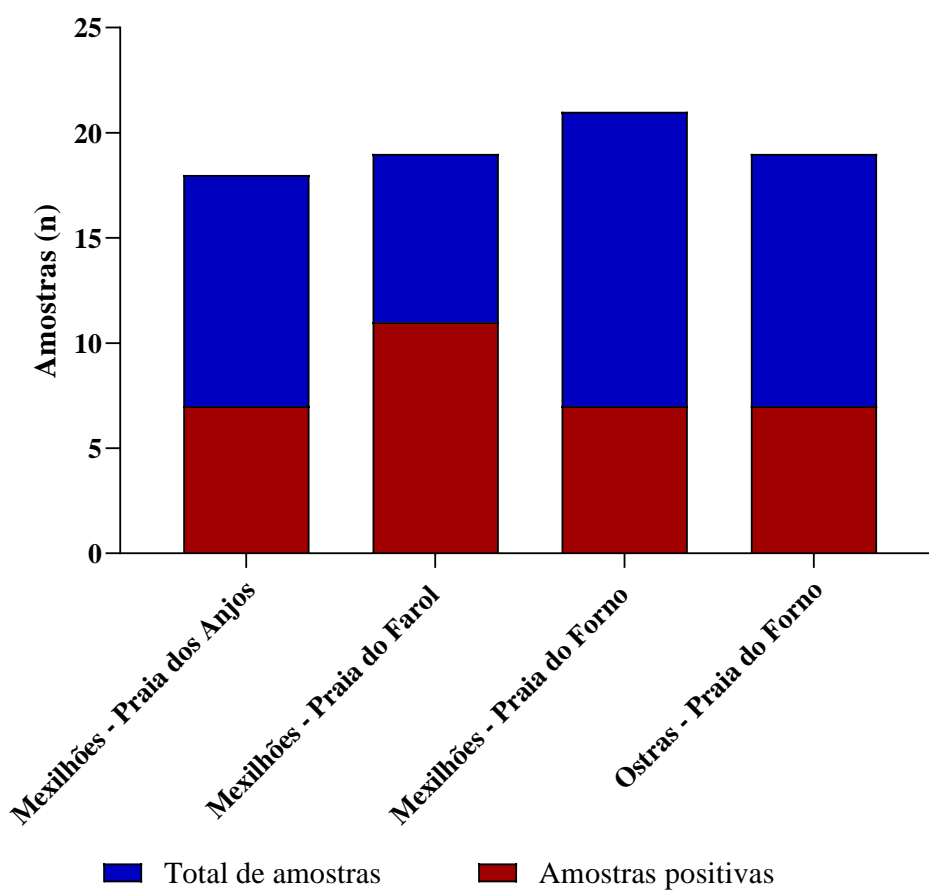


Figura 17: Detecção de Norovírus GI e GII em mexilhões *Perna-perna* e ostras *Crassostrea gigas* de acordo com as áreas de coleta no período de 2018-2019.

### 5.1) Determinação da integridade do capsídeo viral como ferramenta de avaliar a infecciosidade das partículas virais

O tratamento com PMAxx™ foi realizado para avaliar a infecciosidade dos norovírus detectados em moluscos bivalves. No total, foram 16 amostras tratadas sendo 6 de ostras e 10 de mexilhões. Os resultados baseado no número de cópias genômicas por grama de tecido digestivo mostraram uma redução de até 3 logs na quantificação das amostras por RT-qPCR quando tratadas com PMAxx™ em relação às amostras não tratadas (Tabela 7).

Tabela 7: Concentração de Norovirus em amostras de moluscos bivalves com e sem tratamento com PMAxx™.

<b>Amostras</b>	<b>Sem tratamento CG/g*</b>	<b>Tratamento com PMAxx™ CG/g</b>
4104 – ostra	1,47 x 10 <sup>6</sup>	9,94 x 10 <sup>3</sup>
4106 – mexilhão	4,38 x 10 <sup>5</sup>	7,60 x 10 <sup>3</sup>
4347 – mexilhão	1,79 x 10 <sup>6</sup>	8,12 x 10 <sup>3</sup>
4341 – mexilhão	2,08 x 10 <sup>7</sup>	2,85 x 10 <sup>6</sup>
4342 – mexilhão	1,26 x 10 <sup>7</sup>	1,87 x 10 <sup>6</sup>
3866 – ostra	6,68 x 10 <sup>4</sup>	1,06 x 10 <sup>4</sup>
3864 – mexilhão	6,68 x 10 <sup>4</sup>	6,56 x 10 <sup>4</sup>
3868 – ostra	2,61 x 10 <sup>4</sup>	1,42 x 10 <sup>3</sup>
4281 – ostra	6,29 x 10 <sup>7</sup>	3,20 x 10 <sup>6</sup>
4340 – ostra	2,68 x 10 <sup>6</sup>	1,53 x 10 <sup>6</sup>
4431 – mexilhão	9,35 x 10 <sup>4</sup>	4,65 x 10 <sup>4</sup>
4285 – mexilhão	1,40 x 10 <sup>5</sup>	2,72 x 10 <sup>4</sup>
4283 – mexilhão	1,60 x 10 <sup>5</sup>	2,38 x 10 <sup>4</sup>
4279 – ostra	4,47 x 10 <sup>4</sup>	6,21 x 10 <sup>3</sup>
4434 – mexilhão	5,35 x 10 <sup>5</sup>	4,07 x 10 <sup>4</sup>
4346 – mexilhão	9,35 x 10 <sup>4</sup>	1,70 x 10 <sup>4</sup>

\*CG/g – Cópias genômicas por grama de tecido digestivo

A mediana da carga viral foi estatisticamente menor ( $p = 0,0064$ ) em amostras tratadas com PMAxx™ ( $2,5 \times 10^4$  CG/g) quando comparadas com as amostras que não receberam tratamento ( $3,0 \times 10^5$  CG/g) (Figura 18).

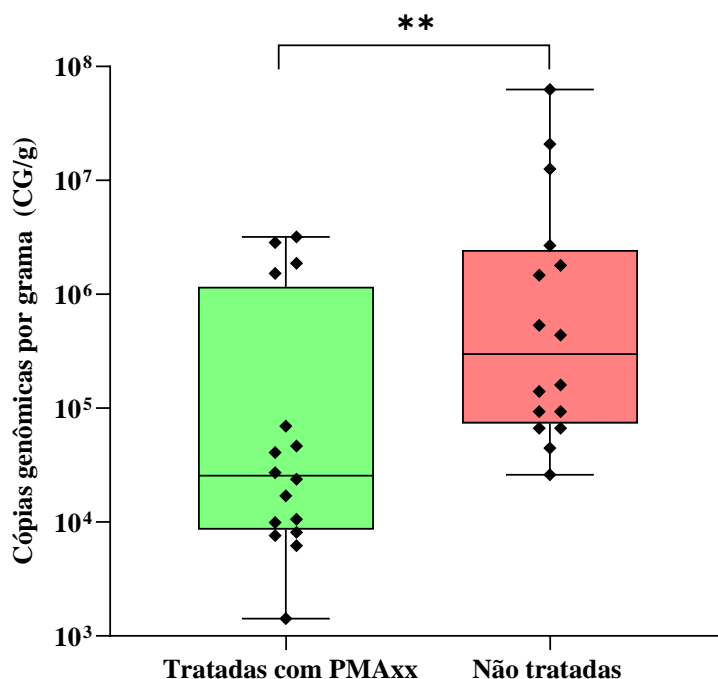


Figura 18: Box-Plot da quantificação de Norovírus em amostras de moluscos bivalves positivas para norovírus com e sem tratamento com PMAxx™. \*\*diferença estatisticamente significativa.

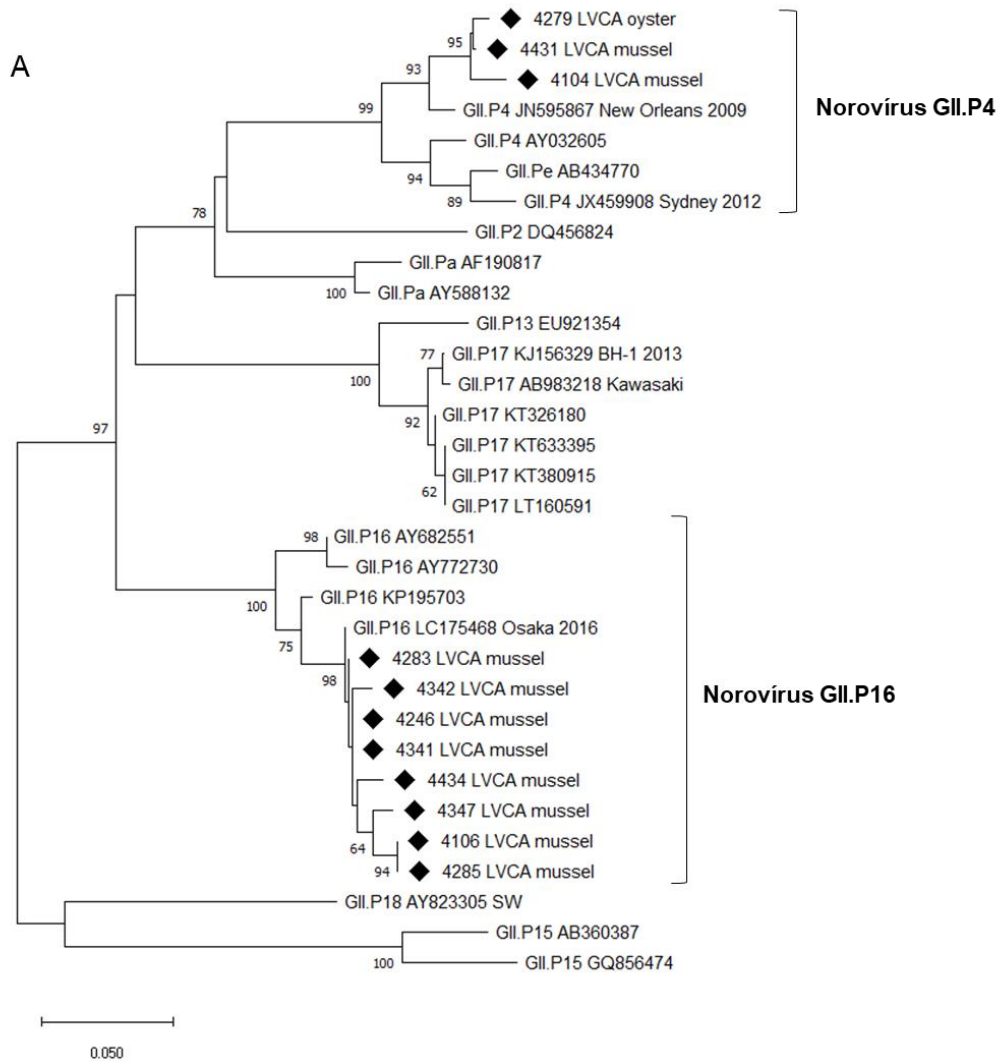
## 5.2) Caracterização genética dos norovírus

Os genótipos dos norovírus foram caracterizados pelo sequenciamento direto em 34,4% (11/32) das amostras positivas. Pela amplificação da junção das ORFs1-2, as análises foram feitas separadamente com o objetivo de identificar os genótipos para a região da polimerase (ORF1) e a região do capsídeo (ORF2). Pelo *Norovirus Genotyping Tool*, *NoroNet*, 8 amostras foram caracterizadas como GII.2[P16] e três amostras como GII.4[P4] (Tabela 8).

Tabela 8: Número de amostras de ostras e mexilhões positivas para norovírus caracterizadas e as cepas identificadas nos moluscos das praias de Arraial do Cabo.

Molusco Bivalve	Genótipos (Número de amostras, n)	
	2018	2019
Ostras ( <i>Crassostreas gigas</i> )	GII.4[P4] (n= 1)	-
Mexilhões ( <i>Perna -perna</i> )	GII.2[P16] (n= 3)	GII.2[P16] (n= 5)
	GII.4[P4] (n= 1)	GII.4[P4] (n= 1)

Esses resultados foram confirmados na construção de árvores filogenéticas dos genes da região da polimerase e do capsídeo. O genótipo GII.2[P16] foi o mais detectado nas amostras sequenciadas (72,7%) nos dois anos de estudo (2018 e 2019) (Figura 19). Entre essas onze amostras, a identidade de nucleotídeos variou de 92% a 99%.





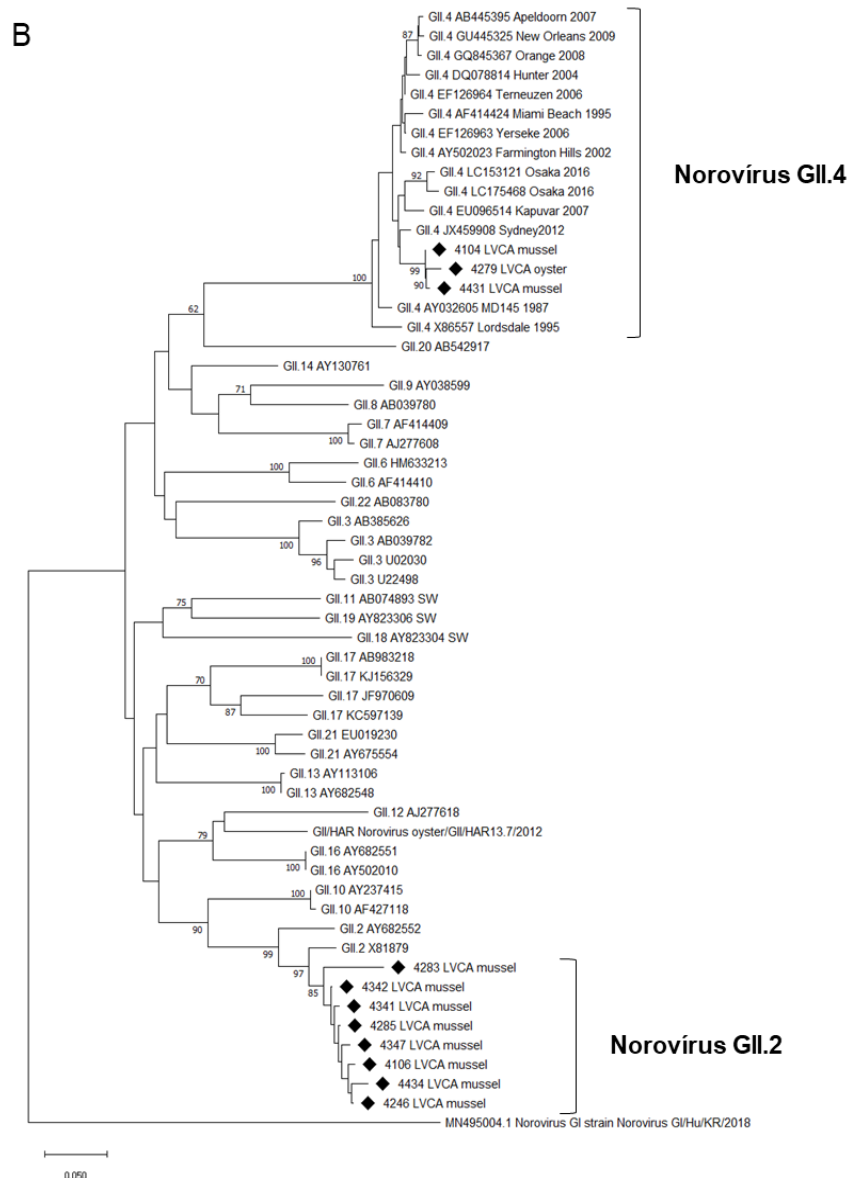


Figura 19: Análise filogenética dos norovírus baseada nas sequências da região da polimerase (A) e da VP1 (B). Cepas de referências de norovírus GI e GII foram nomeadas de acordo com o GenBank com seus respectivos números de acessos. As cepas GII.4, GII.2, GII.P16 e GII.P4 encontradas nas amostras de ostras e mexilhões estão marcadas com diamante cheio. A barra de escala na parte inferior da árvore indica a distância. Valores de auto-inicialização (2000 réplicas) são mostrados nos nós de ramificação e valores abaixo de 60% não são mostrados.

### 5.3) Clonagens das amostras positivas para norovírus

Para a clonagem, foram utilizados *amplicons* de três amostras de mexilhões positivas para norovírus GII que foram também usados no sequenciamento direto. Após a etapa de transformação em bactérias competentes e crescimento em placa de meio LB sólido contendo ampicilina, foram obtidas colônias brancas com possíveis clones do inserto. Nove destas colônias foram submetidas a PCR e posteriormente sequenciadas. As sequências dos clones obtidos das três amostras foram submetidas ao *BLAST* e caracterizadas utilizando o *Norovirus Genotyping Tool, Noro Net*. Todos os clones agruparam com o genótipo GII.2[P16], também detectado nestas amostras de mexilhões pelo sequenciamento direto do *amplicon*. A identidade nucleotídica entre as sequências dos clones obtidos variou de 99,1% a 99,8%.

## 6) Discussão

Atualmente, os norovírus estão entre os principais agentes causadores de doença de veiculação alimentar, principalmente pelo consumo de moluscos bivalves. A contaminação dos moluscos e de suas áreas de produção por esse patógeno representa um desafio importante para a indústria de aquicultura atualmente em expansão e para o consumo desses bivalves sem riscos à saúde da população (Lowther et al., 2010; 2012; Hassard et al., 2017). O presente estudo investigou pela primeira vez a presença e os níveis de contaminação de norovírus em ostras e mexilhões coletados em Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, durante 2018 e 2019. A região é importante devido ao desenvolvimento do cultivo de moluscos pelos pescadores locais que devem atender a um conjunto de normas que visam à qualidade e ao controle higiênico-sanitário dos animais cultivados (Brasil, 2012).

Os resultados de detecção de norovírus obtidos pela RT-qPCR demonstraram que 41,5% das amostras foram positivas. O percentual de detecção de norovírus nos mexilhões (43,1%) foi maior que o encontrado nas amostras de ostras (36,8%). O norovírus tem sido detectado em moluscos bivalves em vários países do mundo. Na Inglaterra, percentuais altos de norovírus foram detectados em ostras cultivadas dentro de um estuário impactado por descargas de esgoto (Campos et al., 2015; Farkas et al., 2018). No Japão, Iritani e colaboradores (2014) demonstraram a sua alta prevalência (68,9%) em amostras de ostras cruas ou malcozidas destinadas ao consumo. Estudos realizados na Itália nos últimos anos demonstraram taxas de detecção viral similares ao nosso estudo, variando de 34,4% a 51,5% (Pepe et al., 2012; Suffredini et al., 2011; 2012). Num estudo realizado por Polo e colaboradores (2015) durante 18 meses em um estuário na região da Galícia, Espanha, considerado a principal área de produção de bivalves da Europa, foi determinada a prevalência de norovírus e vírus da hepatite A em quatro espécies de moluscos bivalves estudadas, onde foi encontrado uma taxa de detecção de 55,4% com pelo menos um vírus detectado, sendo os norovírus os mais prevalentes. No Brasil, em um estudo realizado por Keller e colaboradores (2019) a taxa de detecção de norovírus foi de 66,7% em moluscos bivalves da baía de Vitória (ES) e 54% dos mexilhões estavam contaminados com o vírus.

Em relação a prevalência dos genogrupos de norovírus, nossos resultados confirmaram a maior circulação de GII (37,7%) em relação ao GI (5,2%) nas amostras

estudadas. Este percentual de norovírus GII foi semelhante ao do estudo feito por Fusco e colaboradores (2019) com moluscos bivalves de áreas costeiras do sudeste da Itália detectando o genogrupo em 39,7% das amostras. Vilariño e colaboradores (2009) demonstraram a prevalência de norovírus em 61% das amostras de moluscos coletadas num estuário situado na Galícia, Espanha sendo o genogrupo II com percentual de 53,7%. Prevalência similar (49,4%) foi encontrada também por Manso & Romalde (2013a) na mesma região, que destacou no estudo a maior estabilidade do GII em ambientes aquáticos. Terio e colaboradores (2014) encontraram norovírus GII em 82% dos moluscos da lagoa de Butrint, Albânia. Em contraste, existem alguns estudos realizados com bivalves de diferentes países que demonstraram a maior detecção de norovírus GI em comparação com GII (Le Guyader et al., 2012; Kittigul et al. 2016; Tunyakittaveeward et al., 2019).

Como relatado por Maalouf e colaboradores (2011), os ligantes presentes nos tecidos dos bivalves podem ter influência na eficiência de bioacumulação de diferentes genogrupos/genótipos de norovírus e pode ser uma das hipóteses entre a diferença no percentual de detecção de GI e GII nos bivalves. Contudo, outros fatores também podem ter influência no percentual de detecção dos genogrupos de norovírus nos bivalves, como a epidemiologia do vírus nos casos de gastroenterite aguda na população local, a persistência dos genótipos no meio ambiente e a carga viral excretada pela população infectada (Chan et al., 2006; Le Guyader et al., 2012; Atmar et al. 2018; Farkas et al., 2018). Em nosso estudo, a maior taxa de detecção de norovírus GII pode ser explicada pela maior prevalência desse genogrupo na população brasileira demonstrada por diversos estudos pelo país (Fioretti et al., 2011; Fumian et al., 2013; 2016; Andrade et al., 2014; 2016). Em um estudo realizado no Japão, Nishida e colaboradores (2007) demonstrou existir uma concordância dos genótipos circulantes na população e dos detectados nas ostras, enfatizando que a contaminação dos bivalves reflete a epidemiologia dos norovírus da população.

Em nosso estudo, utilizamos o bacteriófago PP7 como um controle interno para monitorar a etapa de extração viral dos moluscos bivalves e verificar a eficiência da recuperação viral. A eficiência do processo de extração foi confirmada pela detecção do bacteriófago PP7 através da RT-qPCR em 100% das amostras testadas. Os valores de PP7 em cópias genômicas foi estatisticamente menor nas amostras de ostras ( $1,1 \times 10^5$  CG/g) que nas de mexilhões ( $7,0 \times 10^5$  CG/g) ( $p < 0,0001$ ), sugerindo que nas ostras há uma

baixa eficiência da extração viral. O percentual de recuperação viral variou entre 11,4% e 29,2% e a amostra de ostra apresentou o menor valor de PP7 recuperado ( $2,0 \times 10^4$  CG/g). Partindo do pressuposto que o título de PP7 inoculado em cada amostra foi igual, é provável que substâncias e compostos inibidores da PCR estejam mais presentes nos concentrados de ostras que nos de mexilhões, o que possivelmente justificaria a diferença nos valores de cópias genômicas de PP7 encontrada nos moluscos, além de sugerir a sua interferência na detecção dos norvírus nestas amostras.

Desde a década de 1990, tem sido relatado que a presença de inibidores em amostras ambientais, incluindo polissacarídeos e compostos orgânicos, são interferentes para técnicas moleculares, como a RT-qPCR, (Atmar et al., 1993). Para isso, os testes foram conduzidos com material genético diluído e diferentes métodos de extração. A composição orgânica dos tecidos dos bivalves foi relevante durante a extração do RNA viral, uma vez que norvírus não foram detectados em nenhuma amostra quando utilizado o kit da Qiagen baseado em colunas de sílica. O excesso de fibra e gordura presente nos tecidos pode bloquear a coluna de sílica, diminuindo a eficiência da extração, o que já foi descrito também por Tunyakittaveeward e colaboradores (2019). Assim, os dados corroboram com a ISO 15216-1:2017 que indica o uso de kits de extração com *beads* magnéticas para facilitar a adsorção do ácido nucléico evitando a sua perda durante o processo.

A carga viral é um fator importante devido a capacidade de bioacumulação de partículas virais pelos moluscos bivalves, e neste presente estudo a quantificação da mediana da carga viral de norvírus GII presente nas amostras de ostras ( $3,5 \times 10^6$  CG/g) e mexilhões ( $2,5 \times 10^5$  CG/g) foi estatisticamente maior que a de norvírus GI presente nas amostras de mexilhões ( $2,1 \times 10^2$  CG/g). Em um estudo de três anos em locais de produção de mariscos na região sul da Itália, a concentração média de norvírus GII foi de  $1,1 \times 10^6$  CG/g superando os valores de todas as amostras positivas para norvírus GI, e três amostras apresentaram concentrações superiores a  $10^7$  CG/g de tecido digestivo (Fusco et al., 2019). Lowther e colaboradores (2018) demonstraram que a carga viral de GII (1802 CG/g) foi duas vezes maior que a de GI (586 CG/g) em ostras coletadas em pontos de venda de cidades do Reino Unido. Sugere-se que a maior concentração de norvírus GII em moluscos bivalves ocorre em função de uma maior afinidade desses vírus aos receptores presentes nos tecidos desses animais, o que poderia influenciar na

capacidade de bioacumulação seletiva para este genogrupo, além das condições ambientais em que eles são cultivados (Comelli et al., 2008; Suffredini et al. 2011).

Verificamos neste estudo que não houve um padrão sazonal observado nas taxas de detecção de norovírus em moluscos. Os norovírus foram detectados em quase todos os meses de estudo, mas a frequência foi maior nos meses de dezembro a fevereiro. Esse é um período de alta temporada em Arraial do Cabo e há um grande fluxo de turistas na cidade, o que dificulta a manutenção das condições sanitárias ideais. La Bella et al. (2017) em um estudo em Apulia, sudeste da Itália, demonstraram a presença de norovírus em moluscos bivalves em todos os meses, com maior frequência nos meses de dezembro a março. Em um estudo realizado no Reino Unido, Lowther et al. (2018) demonstraram a maior detecção de norovírus (79%) nos moluscos bivalves coletados nos meses de outubro a março quando comparado aos meses de abril a setembro (57%). Como exemplificado acima, nos países de clima temperado é relatada uma sazonalidade marcada da contaminação de norovírus no inverno em amostras de moluscos bivalves (Le Guyader et al., 2000; Lowther et al., 2012; Suffredini et al., 2012). Essa sazonalidade pode ser explicada pois nesses países verifica-se um pico no número de surtos e casos de norovírus na população durante o inverno, o que resulta no maior aporte de vírus para os ambientes aquáticos (Lopman et al., 2012; Siebenga et al., 2009; Chan et al., 2015). Não por acaso que, quando os norovírus foram inicialmente descritos, a doença causada por esses agentes foi designada de doença do vômito de inverno (*winter vomiting disease*) (Kapikian. 1996). Nos países de clima tropical, como o Brasil, sem estações marcadas, os norovírus circulam o ano todo, sem apresentar sazonalidade marcada (Victoria et al., 2007; Ferreira et al., 2010; Andrade et al., 2014; Barreira et al., 2017; Reymao et al., 2018).

Durante o período deste estudo houve, no mês de janeiro, o rompimento de uma tubulação de esgoto causado por um temporal na cidade de Arraial do Cabo que deixou as três praias onde eram realizadas as coletas dos moluscos impróprias para banho (Praia do Farol, Praia dos Anjos e Praia do Forno), justamente no período em que o município recebe o maior fluxo de turista (Jusbrasil, 2019). Essa contaminação pode ter contribuído para o aumento do número de moluscos contaminados por norovírus nos meses de março, maio e junho de 2019 em comparação ao ano anterior, e também pela maior taxa de detecção viral em fevereiro. Mesmo em locais onde o esgoto é tratado antes de ser despejados, durante os eventos de chuvas fortes, a poluição alcança o mar devido ao

escoamento superficial ou transbordamento de esgoto (Sartori & Amancio, 2012; Bigoraj et al., 2014). A contaminação dessas praias também pode ser favorecida por descarga de esgotos de embarcações de barcos e navios utilizados nas atividades turísticas da cidade e para pesca (Moresco et al., 2012).

Outro ponto importante a ser correlacionado com a taxa de detecção de norovírus em moluscos bivalves é a condição de balneabilidade das praias de Arraial do Cabo. O INEA (Instituto Estadual do Ambiente) emite periodicamente boletins que avaliam a qualidade da água para fins de banho e recreação a partir da comparação do nível de contaminação das águas por coliformes termotolerantes e enterococos, segundo os padrões previstos na legislação vigente, a resolução CONAMA nº 274/2000 (Brasil, 2000). Elevados números destas bactérias indicam principalmente a contaminação por esgotos. De acordo com a Resolução nº 357 do CONAMA a média geométrica da densidade de coliformes fecais termotolerantes não deve exceder 43 NMP por 100 mL nas águas salinas de cultivo de moluscos bivalves destinados a alimentação humana (Brasil, 2005). Portanto, a informação no boletim do INEA de que o local está próprio para banho não é suficiente para a liberação de cultivo de moluscos, pois é baseado num valor de densidade média de coliformes termotolerantes inferior a 2500 NMP/100mL. Diante desse fato, algumas praias de Arraial do Cabo apresentaram balneabilidade imprópria nos dois anos de estudo, inclusive a praia dos Anjos, um dos pontos de coleta de moluscos bivalves, que mostrou resultados fora dos padrões estabelecidos durante os meses de janeiro à maio de 2019, corroborando para o maior percentual de amostras positivas para norovírus no período. É importante ressaltar que como as praias do estudo ficam próximas umas das outras, a contaminação das águas marinhas por lançamento de esgoto em uma delas favorece a extensão para as demais, devido ao fluxo de correntes marítimas.

Dados baseados somente na detecção do genoma viral não são suficientes para determinar a infecciosidade dos norovírus e existem poucos métodos disponíveis que permitam inferir o número de partículas infecciosas desses vírus, que não são cultiváveis *in vitro* em sistema de cultivo celular (Kim and Ko, 2012). Recentemente, agentes intercalantes de ácido nucléico, como o PMA, estão sendo utilizados para distinguir partículas virais viáveis e não viáveis com base na integridade do capsídeo viral, pois eles são capazes de se ligar covalentemente ao DNA/RNA viral das partículas comprometidas e bloquear a amplificação por PCR (Nocker et al., 2006; Bae and Wuertz, 2009). Estudos

recentes já indicaram que o tratamento de amostras ambientais com PMA resultou na distinção entre vírus infecciosos e não infecciosos (Parshionikar et al., 2010; Coudray-Meunier et al., 2013; Sanchez et al., 2012).

Este estudo utilizou pela primeira vez no Brasil a metodologia de diferenciação de capsídeos defectivos pelo tratamento com PMAxx™ em amostras de moluscos bivalves para verificar a proporção de partículas infecciosas nas amostras positivas. Uma vez que patógenos virais são rotineiramente detectados em amostras de moluscos destinados ao consumo humano, o tratamento das amostras positivas para norovírus com PMAxx™ auxilia a suprir a escassez de dados referentes à infecciosidade viral, cruciais para as avaliações de risco à saúde humana associadas ao consumo. Fatores ambientais como os raios UV, a temperatura e a turbidez das águas podem influenciar na integridade do capsídeo viral que está associado a permeabilidade do PMA (Oristo et al., 2018). Nossos resultados demonstraram uma diferença significativa na carga viral entre as amostras tratadas com PMAxx™ e as não tratadas em até 3 logs. Em concordância aos resultados obtidos por Randazzo e colaboradores (2018), foi demonstrado uma diferenciação entre os norovírus infecciosos (tratados com PMAxx™) e os inativados (amostras controle sem tratamento). As amostras apresentaram valores distintos de diminuição da carga viral, mostrando a heterogeneidade entre as amostras nas concentrações de partículas intactas e defectivas. Uma explicação para essa diferença, como já foi observado no estudo feito por Randazzo e colaboradores (2018), pode ser a presença de diferentes compostos que podem facilitar ou interferir no desempenho do pré-tratamento com PMAxx™, dependendo das espécies de moluscos, época ou local da colheita. Outros achados similares aos nossos foram relatados por Sanchez e colaboradores (2012) para o vírus da hepatite A inativado pelo calor e por Karim e colaboradores (2015), que demonstrou que o PMA pode ser usado para detectar norovírus potencialmente infeccioso, visto que houve uma redução na detecção do RNA viral por RT-PCR após o tratamento.

O protocolo de tratamento com PMAxx™ para amostras de bivalves utilizado no presente estudo foi baseado no protocolo descrito por Randazzo e colaboradores (2018). Esses autores realizaram pela primeira vez um estudo que avaliou o potencial do pré-tratamento com PMAxx™-Triton para discriminação entre partículas intactas e alteradas de norovírus em amostras de moluscos contaminados naturalmente. Nesse estudo, os autores demonstraram o êxito na distinção entre partículas infecciosas e não infecciosas de norovírus em amostras de moluscos e esgoto. Nos concentrados de ostras, o pré-



tratamento demonstrou uma redução da concentração viral em aproximadamente um log, porém para os moluscos bivalves o pré-tratamento com PMA foi modificado devido à complexidade da matriz (aumento da concentração de PMAxx™ e foto-ativação dupla com período de incubação de 30 min).

Apesar do pré-tratamento PMAxx™-Triton ser um passo importante para interpretar a quantificação de norovírus, esse pré-tratamento ainda enfrenta alguns desafios. Um deles é o fato de que o pré-tratamento com PMAxx™-Triton tenha sido avaliado, na maioria dos estudos, apenas após tratamentos térmicos (Parshionikar et al., 2010; Escudero-Abarca et al., 2014; Moreno et al., 2015). Os vírus em matrizes ambientais podem ser expostos a diferentes mecanismos de inativação, como luz UV, alta pressão, calor ou presença de compostos antivirais. Portanto, o pré-tratamento deve ser avaliado para cada processo de inativação separadamente. Estudos anteriores demonstraram que os efeitos dos corantes intercalantes diferem dependendo do vírus (Fittipaldi et al., 2010; Graiver et al., 2010) e também da estrutura secundária do ácido nucleico que pode afetar a afinidade de ligação do PMA (Kim et al., 2011). Portanto, mais estudos são necessários para estabelecer a eficácia do pré-tratamento com PMA para vírus específicos em várias matrizes alimentares com diferentes tratamentos de inativação viral.

Para a caracterização dos genótipos detectados dos bivalves, foi realizada a análise e comparação das sequências de nucleotídeos da região da polimerase e capsídeo com sequências protótipos na ferramenta de classificação *on line Norovirus Genotyping Tool, NoroNet*. Nesse trabalho, as amostras de norovírus GII foram classificadas como GII.2[P16] em 72,7% e GII.4[P4] em 27,3 % das amostras positivas sequenciadas.

Foram detectados apenas dois genótipos dentre as 11 amostras sequenciadas. O genótipo recombinante GII.2[P16] foi encontrado em oito amostras de mexilhões apresentando uma carga viral entre  $4,8 \times 10^6$  a  $2,8 \times 10^8$  GC/g, e o genótipo GII.4[P4] em duas amostras de mexilhões e uma de ostra com carga viral entre  $1,9 \times 10^7$  a  $3,6 \times 10^8$ . Em um estudo realizado por Cantelli et al. (2019) em amostras fecais de crianças da região metropolitana do Rio de Janeiro foram encontrados 10 genótipos diferentes para norovírus e entre os mais frequentes estavam o GII.2[P16] (9,5%) e o GII.4[P4] (19%). Esses dados sugerem que os genótipos de norovírus detectados em moluscos em nosso estudo podem refletir os que estão circulando na população local.

Os norovírus possuem um grande número de genótipos e diversidade genética (Kroneman et al., 2013; Barclay et al., 2019). Nas últimas décadas, os NoV GII.4 têm sido responsáveis pela maioria dos surtos de gastroenterite por norovírus no mundo (Siebenga et al., 2009; Paula et al., 2018; Zhou et al., 2019; Ge et al., 2020). Os genótipos GII.4 sofrem continuamente diversificação genética/antigênica pelo acúmulo de mutação pontual ou recombinação (Green 2013). No Brasil, o genótipo GII.4 é o mais prevalente nos estudos com amostras clínicas de gastroenterite viral, porém outros genótipos circulam em menor prevalência, como GII.6, GII.3, GII.14, GII.7, GII.8, GII.17, GII.2 e GII.12 (Ferreira et al., 2010; Barreira et al., 2017; Andrade et al., 2018; Bitencurt et al., 2019).

Nesse trabalho, o genótipo GII.4 foi encontrado com menor frequência que GII.2 e exibiu similaridade significativa (99% nucleotídeos idênticos) com a cepa GII.4 Sydney 2012 descrita na Austrália e subsequentemente detectada no Brasil na região sudeste (Volpini et al., 2019). Outro estudo realizado no Brasil demonstrou a alta prevalência do GII.4 em amostras clínicas (52%) (Fumian et al., 2016). O norovírus GII.4 foi detectado em associação com vários genótipos de polimerase, incluindo GII.P4, GII.Pe e GII.P16 (Cantelli et al., 2019).

Os genótipos GII.2 e GII.4 encontrados nas amostras de moluscos desse trabalho emergiram e tornaram-se os mais prevalentes nos surtos de gastroenterite aguda em diferentes países durante 2016-2019 (Niendorf et al., 2017; Barreira et al., 2017; Kittigul et al., 2019). O genótipo GII.2 encontrado nas amostras de bivalves de Arraial do Cabo foi também detectada na Argentina associada com a polimerase GII.P16 (Degiuseppe et al., 2020). No Peru, esse genótipo foi detectado em comunidades rurais em um estudo realizado por Chhabra et al. (2020). Na China, o GII.2 foi detectado em crianças com diarreia e associada à polimerase GII.P16 (Wang et al., 2019). Kittigul et al. (2016) detectou o genótipo GII.2 nas amostras de moluscos coletados dos mercados de Bangkok, Tailândia, sendo geneticamente similar por agrupamento filogenético à cepa de referência GII.2 Melksham, resultado também observado em nosso estudo. No Brasil, a detecção do genótipo GII.2 foi descrito anteriormente em outros estudos (Barreira et al., 2017; Santos et al., 2017; Andrade et al., 2014; Siqueira et al., 2017), porém o genótipo recombinante GII.2[P16] foi descrito pela primeira vez no Brasil no estudo realizado por Cantelli et al. (2019), no estado do Rio de Janeiro.

Tunyakittaveeward et al. (2019) detectou norovírus GII.4 em 30% das amostras de ostras e norovírus GII.2 em 8% das amostras nos mercados da Tailândia. No Vietnã, um estudo feito por Nguyen et al. (2018), com ostras coletadas de uma lagoa que recebe esgoto, mostrou que os genótipos GII.2 e GII.4 foram os mais prevalentes tanto nas amostras de ostras quanto nas de esgoto. Em concordância com o nosso estudo, o genótipo GII.2 apresentou maior similaridade filogenética à cepa descrita na França e o genótipo GII.4 à cepa GII.4 Sydney 2012 descrita na Austrália. La Rosa et al. (2017) observaram uma maior prevalência dos genótipos GII.2 (10%) e GII.4 (72,5%) em áreas de produção de moluscos da região costeira da Itália, assim como La Bella et al. (2017), que demonstraram que os mesmos genótipos de norovírus GII que circulavam nos bivalves foram encontradas nos casos de gastroenterite. No Brasil, genótipo GII.4 já foi detectado em matrizes alimentares envolvidas em um surto de gastroenterite ocorrido em um cruzeiro (Morillo et al., 2010) e em amostras de esgoto bruto do Rio de Janeiro, nas quais foi encontrado em maior prevalência (68,5%) (Fumian et al., 2019). Contudo, esse é o primeiro estudo de detecção e caracterização de norovírus em moluscos bivalves no Rio de Janeiro.

O genótipo GII.2 detectado nesse trabalho nas amostras de moluscos apresentou similaridade significativa (99% nucleotídeos idênticos) à cepa descrita na França. Em um estudo realizado por Victoria et al. (2012) em amostras de águas ambientais da cidade de Florianópolis, a variante GII.2 foi detectada em duas amostras de um riacho poluído e agruparam com a cepa de referência GII.2 Melksham, assim como as amostras do nosso estudo que apresentaram uma identidade sequencial de 97% com essa cepa. Fumian et al. (2019) detectaram a variante GII.2 (5,1%) em esgoto bruto de uma estação de tratamento no Rio de Janeiro coletadas em 2013-2014. O nosso estudo detectou pela primeira vez o genótipo recombinante GII.2[P16] em moluscos bivalves, com um percentual de 72,7% das amostras positivas sequenciadas. Atualmente, as recombinantes GII.2[P16] e GII.4[P4] têm sido amplamente detectadas em casos clínicos no mundo (Lun et al., 2018; Medici et al., 2018; Chen et al., 2018; Wang et al., 2019; Fu et al., 2019). Um estudo realizado por Rosiles-González et al. (2019) detectou norovírus GII.P16 em duas amostras de águas recreacionais com identidade de 99% às sequências de referência da China e da Alemanha. O genótipo GII.P4 detectado em moluscos nesse trabalho apresentou similaridade de 93% com as sequências nucleotídicas da cepa de referência descrita nos Estados Unidos. Henigman et al. (2016) realizou um estudo em locais de

colheita de mexilhões na Eslovênia e detectou norovírus GII.P4 em 75% das amostras com identidade nucleotídica de 99% entre elas.

A vigilância epidemiológica dos norovírus em amostras ambientais é essencial devido à alta variabilidade do genoma viral e a clonagem molecular é uma ferramenta que permite identificar a diversidade de genótipos presente numa amostra ambiental (Zhou et al., 2016). Em nosso estudo, observamos que 100% das sequências foram classificadas como GII.2[P16] após a clonagem. Um problema enfrentado no estudo foi que, dentre as 3 amostras clonadas, só foram obtidos 9 clones devido a dificuldade no crescimento das colônias. A pequena quantidade de clones pode ser uma explicação da exclusividade genotípica do nosso achado. O nosso estudo não encontrou uma diversidade de genótipos nas amostras de moluscos clonadas, porém o genótipo detectado foi o mesmo encontrado pelo sequenciamento direto, o que confirma a circulação deste genótipo nas amostras clonadas.

Nosso estudo avaliou pela primeira vez a disseminação de norovírus em ostras e mexilhões coletados nas praias da cidade de Arraial do Cabo, RJ, em que os resultados revelaram uma alta frequência e carga viral desses vírus, demonstrando que essas áreas não são adequadas para o cultivo e comércio de moluscos bivalves. Os genótipos virais encontrados podem refletir os que estão circulando na população local e contaminaram o meio ambiente devido ao lançamento de esgoto não tratado nas praias dessa região. Uma vez que esses animais são frequentemente consumidos crus nesses locais e estão envolvidos em surtos de gastroenterite, a vigilância e o aumento de pesquisas dos vírus entéricos em moluscos bivalves pode ser uma estratégia eficaz para a proteção da saúde do consumidor.

## 7) Conclusões

- Os moluscos bivalves da região de Arraial do cabo estão contaminados com norovírus.
- Os norovírus foram detectados em quase metade das amostras de bivalves coletadas.
- O kit de extração viral com *beads* magnéticas é mais eficiente na recuperação do RNA dos norovírus nas amostras de ostras e mexilhões estudadas.
- O genogrupo GII foi o mais prevalente e apresentou uma carga viral maior que o genogrupo GI.
- A praia do Farol apresentou maior percentual de detecção de norovírus que as demais áreas de coleta.
- Não foi encontrado um padrão de sazonalidade durante o período de estudo, porém o mês de fevereiro de 2019 apresentou o maior percentual de amostras positivas.
- Os norovírus foram detectados com maior frequência e concentração nas amostras de mexilhões quando comparadas com as ostras.
- O tratamento com PMAxx reduziu a carga viral nas amostras tratadas, permitindo diferenciar entre os norovírus potencialmente infecciosos e não-infecciosos.
- A caracterização molecular demonstrou a circulação dos genótipos GII.4[P4] e GII.2[P16] nos moluscos bivalves.
- A clonagem molecular não mostrou uma diversidade genética nas amostras de moluscos bivalves, uma vez que apenas o genótipo GII.2[P16] foi detectado.

## 8) Referências Bibliográficas

Ahmed S M, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 2014; 14,725–730.

Alfano-Sobsey E, Sweat D, Hall A, Breedlove F, Rodriguez R, Greene S, Pierce A, Sobsey M, Davies M, Ledford SL. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiology and Infection* 2012; v. 140, p. 276-282.

Allen, K. The transmission of typhoid by sewage polluted oysters. *Rep Am Public Health Assoc* 1899; 25, 154–165.

Andrade JSR, Fumian TM, Leite JPG, de Assis MR, Fialho AM, Mouta S, Santiago CMP, Miagostovich MP. Norovirus GII.17 Associated with a Foodborne Acute Gastroenteritis Outbreak in Brazil, 2016. *Food Environ Virol.* 2018 Jun;10(2):212-216.

Andrade Jda S, Rocha MS, Carvalho-Costa FA, Fioretti JM, Xavier Mda P, Nunes ZM, Cardoso J, Fialho AM, Leite JP, Miagostovich MP. Noroviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, 2004-2011. *J Clin Virol.* 2014;61(3):345-52.

Anonymous. Microbiology of the food chain—Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR—Part 1: Method for quantification. ISO 15216-1:2017. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization G, (ed.), 2017.

Appleton H. Virus-like particles in winter vomiting disease. *Lancet* 1977; v. 309, n. 8008, p.409-11.

Atmar RL, Metcalf TG, Neill FH, Estes MK. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(2):631-5

Atmar RL and Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001; v. 14, n. 1, p.15-37

Atmar RL and Estes M.K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. *Gastroenterol Clin North Am* 2006; 35, 275–290.

Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, Graham DY. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008; v.14, p.1553-57.

Atmar R. L. Noroviruses: State of the art. *Food and Environmental Virology* 2010; 2(3), 117–126.

Atmar RL, Ramani S, Estes MK. Human noroviruses: recent advances in a 50-year history. *Curr Opin Infect Dis* 2018;31(5):422-432.

- Bae S. and Wuertz S. Discrimination of viable and dead fecal Bacteroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Appl Environ Microb* 2009; 75, 2940–2944.
- Baggi F, Demarta A, Peduzzi R. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Research in Microbiology*. 2001 Oct 152 (8), 743–751.
- Barclay L, Cannon JL, Wikswo ME, Phillips AR, Browne H, Montmayeur AM, Tatusov RL, Burke RM, Hall AJ, Vinjé J. Emerging Novel GII.P16 Noroviruses Associated with Multiple Capsid Genotypes. *Viruses*. 2019 Jun 8; 11(6).
- Barreira DMPG, Fumian TM, Tonini MAL. Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. *PLoS One* 2017; 12:e0189504
- Batz M.B, Hoffmann S.A, Morris J.G. Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations with the Greatest Burden on Public Health. Emerging Pathogens Institute, University of Florida 2011.
- Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet* 2018; v. 392, n. 10142, p. 175-186.
- Beecham J. A Literature review on particle assimilation by molluscs and crustaceans. Cefas Environment Report UK, CEFAS, 2008.
- Bellou M, Kokkino S P, & Vantarakis A. Shellfish-borne viral outbreaks: A systematic review. *Food and Environmental Virology* 2013; 5(1), 13–23.
- Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK. The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *J Virol* 2003; v. 77, p.11603-15.
- Bigoraj, E., Kwit, E., Chrobocińska, M., & Rzeżutka, A. Occurrence of norovirus and hepatitis A virus in wild mussels collected from the Baltic Sea. *Food and Environmental Virology* 2014; 6(3), 207–212.
- Bitencurt ELR, Siqueira JAM, Medeiros TB, Bandeira RDS, de Souza Oliveira D, de Paula Souza E Guimarães RJ, da Silva Soares L, Macarenhas JDP, Teixeira DM, Silva RSU, Loureiro ECB, de Moraes Silva MC, da Silva LD, Gabbay YB. Epidemiological and molecular investigation of norovirus and astrovirus infections in Rio Branco, Acre, Northern Brazil: A retrospective study. *J Med Virol*. 2019 Jun; 91(6):997-1007.
- Blanco, A., Guix, S., Fuster, N., Fuentes, C., Bartolome, R., Cornejo, T., Pinto, R.M., Bosch, A., 2017. Norovirus in bottled water associated with gastroenteritis outbreak, Spain. *Emerg. Infect. Dis* 2016; 23, 1531–1534.
- Boehs, G., Villalba, A., Ceuta, LO. and Luz, JR. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira River (Ilhéus, Bahia, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology* 2010; vol. 103, p. 43-47

Borghetti N. R. B, Ostrensky A, Borghetti J. R. Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais 2003; 129 p.

Bosch A, Xavier AF, Pintó R.M. Human pathogenic viruses in the marine environment. In: Belkin; Colwell (Eds). *Ocean and health: Human pathogenic viruses in the marine environment*. New York. Springer 2009; p.109-131..

BRASIL. Resolução 274 de 29 de novembro de 2000. CONAMA (Conselho Nacional do Ambiente). Ministério do Ambiente. Diário Oficial 23 da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2000.

BRASIL. Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001. ANVISA, Ministério da Saúde, Governo Federal, Brasil., 2001.

BRASIL. Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. CONAMA, Ministério do Meio Ambiente, Governo Federal, Brasil, 2005.

BRASIL. Instrução Normativa Interministerial N° 7, de 8 de maio de 2012-Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), estabelece os procedimentos para a sua execução e dá outras providências. Ministério da Pesca e Aquicultura, Governo Federal, Brasil, 2012.

Britto R C C. Modernidade e tradição: construção da identidade social dos pescadores de Arraial do Cabo, RJ. Niterói: EdUFF, 1999; 265 p.

Bruggink LD, Marshall JA. Molecular and epidemiological features of GIIB norovirus outbreaks in Victoria, Australia, 2002–2005. *J Med* 2009; v. 81, n. 9, p.1652–60.

Bruggink LD, Marshall JA. Altered patterns of norovirus GII.b recombinant forms in gastroenteritis outbreaks in Victoria, Australia, 2002–2005 compared to 2006–2011. *J Med Virol* 2011; v. 85, n. 8, p.1433–43.

Bull Ra, Tanaka M, White P. Norovirus recombination. *J Gen Virol* 2007; v.12, p. 3347-59.

Campos C J A, Avant J, Gustar N, Lowther J, Powell, A. Fate of human noroviruses in shellfish and water impacted by frequent sewage pollution events. *Environmental Science and Technology* 2015; 49, 8377–8385.

Cantelli CP, da Silva MFM, Fumian TM, da Cunha DC, Andrade JDSR, Malta FC, da Silva E Mouta Junior S, Fialho AM, de Moraes MTB, Brasil P, Miagostovich MP, Leite JPG. High genetic diversity of noroviruses in children from a community-based study in Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2018. *Arch Virol*. 2019 May; 164(5):1427-1432.

Cao S, Lou Z, Tan M, Chen Y, Liu Y, Zhang Z, Zhang XC, Jiang X, Li X, Rao Z. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 2007; v. 81, p.5949-57.

Chan MC, Sung JJ, Lam RK, Chan PK, Lee NL, Lai RW, and Leung WK. Fecal viral load and norovirus-associated gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2006; 12, 1278–1280.



- Chan MC, Leung TF, Chung TW, Kwok AK, Nelson EA, Lee N, Chan PK. Virus Genotype Distribution and Virus Burden in Children and Adults Hospitalized for Norovirus Gastroenteritis, 2012-2014, Hong Kong. *Sci Rep*. 2015; Jun 17;5: 11507.
- Charles KJ, Shore J, Sellwood J, Laverick M, Hart A, Pedley S. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *Journal of Applied Microbiology* 2009; v.106, p.1827-1837.
- Chen R, Neill JD, Estes MK, Prasad BV. X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; v. 23, p. 8048-53.
- Chen C, Yan JB, Wang HL, Li P, Li KF, Wu B, Zhang H. Molecular epidemiology and spatiotemporal dynamics of norovirus associated with sporadic acute gastroenteritis during 2013-2017, Zhoushan Islands, China. *PLoS One*. 2018 Jul 18;13(7)
- Cheng PK, Wong DK, Chung TW and Lim WW. Norovirus contamination found in oysters worldwide. *JMed Virol* 2005; 76, 593–597.
- Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, Wang Q, White PA, Katayama K, Vennema H, Koopmans MPG, Vinjé J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J Gen Virol* 2019; v. 100, n. 10, p. 1393-06.
- Chhabra P, Rouhani S, Browne H, Yori PP, Salas MS, Olortegui MP, Moulton LH, Kosek MN, Vinjé J. Homotypic and heterotypic protection and risk of re-infection following natural norovirus infection in a highly endemic setting. *Clin Infect Dis*. 2020 Jan 9. pii: ciaa019
- Codex Alimentarius. Code of practice for fish and fishery products. Food and Agriculture Organization / World Health Organization 2005. Retrieved 11-12-2014. From [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org).
- Comelli H L, Rimstad E, Larsen S, & Myrmet M. Detection of norovirus genotype I.3b and II.4 in bioaccumulated blue mussels using different virus recovery methods. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 127(1–2), 53–59.
- Corrêa, A. Vírus entéricos em moluscos bivalves: estudos sobre a desinfecção de ostras e água do mar em um sistema de depuração. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2010.
- Corrêa Ade A, Rigotto C, Moresco V, Kleemann CR, Teixeira AL, Poli CR, Simões CM, Barardi CR. The depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated with hepatitis A virus and human adenovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Feb; 107(1):11-7.
- Costa STPD, Fumian TM, Lima ICG, Siqueira JAM, Silva LDD, Hernández JDM, Lucena MSS, Reymão TKA, Soares LDS, Mascarenhas JDP, Gabbay YB. High prevalence of norovirus in children with sporadic acute gastroenteritis in Manaus, Amazon Region, northern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Jun;112(6):391-395.

- Coudray-Meunier C, Fraisse A, Martin-Latil S, Guillier L, Perelle S. Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus combining dyes and surfactants with RT-qPCR. *BMC Microbiol* 2013; 13, 216.
- Darra Mair LW. The aetiology of enteric fever in Belfast in relation to water supply, sanitary circumstances, and shellfish. *Proc R Soc Med* 1909; 187–242.
- Day JM, Ballard LL, Duke MV, Scheffler BE, Zsak L. Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. *Virology* 2010;7:313.
- De Bruin E, Duizer E, Vennema H, Koopmans MP. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006 Nov;137(2):259-64.
- De Graaf M, van Beek J, Koopmans MP. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Jul;14(7):421-33.
- Degiuseppe JJ, Barclay L, Gomes KA, Costantini V, Vinjé J, Stupka JA. Molecular epidemiology of norovirus outbreaks in Argentina, 2013-2018. *J Med Virol*. 2020 Jan 25.
- Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN. Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *J Gen Virol* 1995; v. 76, p. 2349-55.
- Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Formal S, Buscho RF, Kasel JA, Chaves RP, Hornick R, Chanock RM. Transmission of acute infectious nonbacterial gastroenteritis to volunteers by oral administration of stool filtrates. *J Infect Dis* 1971; v.123, p.307-12.
- Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA, Hornick R, Chanock RM. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; v. 140, p.578-83.
- Dolin R, Reichman RC, Roessner KD, Tralka TS, Schooley RT, Gary W, Morens D. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. *J Infect Dis* 1982; v. 146, p.184-9.
- Donaldson EF. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nature reviews. Microbiology* 2010; v. 8, n. 3, p. 231–41.
- Doré B, Keaveney S, Flannery J, Rajko-Nenow P. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. *Eurosurveillance* 2010; 15, 1–4.
- Dorow, R. Coordenação e governança: um estudo de caso na cadeia de malacocultura da grande Florianópolis. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios, Programa de PósGraduação em Agronegócios, Porto Alegre. 236p. 2013.
- Duizer E, Kroneman A, Siebenga J, Verhoef L, Vennema H, Koopmans M; FBVE network. Typing database for noroviruses. *Euro Surveill*. 2008 May 8;13(19).
- EFSA. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal* 2011; 9(7), pp.1–96.

El Moqri N, El Mellouli F, Hassou N, Benhafid M, Abouchoaib N, Etahiri S. Norovirus Detection at Oualidia Lagoon, a Moroccan Shellfish Harvesting Area, by Reverse Transcription PCR Analysis. *Food Environ Virol.* 2019 Sep;11(3):268-273.

Epagri. Síntese informativa da produção de moluscos (mexilhões, ostras e vieiras) comercializada em 2017 no Estado de Santa Catarina. 2018. Disponível em: <[http://docweb.epagri.sc.gov.br/website\\_epagri/Cedap/Estatistica-Sintese/Sintese-informativa-da-maricultura-2017.pdf](http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_epagri/Cedap/Estatistica-Sintese/Sintese-informativa-da-maricultura-2017.pdf)>. Acesso em 15 de janeiro de 2020.

Escudero-Abarca, B.I., Rawsthorne, H., Goulter, R.M., Suh, S.H., Jaykus, L.A. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: more heat resistant than previously believed? *Food Microbiol* 2014; 41, 91–95.

Falco I, Randazzo W, Gomez-Mascaraque L, Aznar R, Lopez-Rubio A., Sanchez G. Effect of (–)-epigallocatechin gallate at different pH conditions on enteric viruses. *LWT Food Sci. Technol* 2017; 81, 250–257.

FAO/WHO. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. *Microbiological Risk Assessment Series* 2008; 14(1726-5274), pp.1–151.

FAO. Food and Agriculture Organization. The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Rome: 2016. 243 p

FAO. 2017. Global aquaculture production dataset 1950–2015 (FishstatJ). Available at: [www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/](http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/)

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma 2018.

Farias, H. Qualidade higiênico-sanitária na cadeia produtiva de ostras, *Crassostrea* sp., cultivadas na Baía de Guaratuba, PR, Brasil. Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2008.

Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol* 2008; 82:5408–5416.

Farkas K, Cooper DM, McDonald JE, Malham SK, de Rougemont A, Jones DL. Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. *Sci Total Environ* 2018; 634:1174–1183.

Ferreira MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MP, Fioretti JM, Andrade J, Volotão EM, Rocha M, Leite JP, Miagostovich MP. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol.* 2010 Aug;82(8):1442-8.

Ferreira MS, Xavier Mda P, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM, de Assis RM, Carvalho Costa FA, de Oliveira SA, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). *PLoS One.* 2012;7(3).

Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier Mda P, Leite JP, Miagostovich MP. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(8):942-7.

- Fittipaldi M, Rodriguez NJP, Codony F, Adrados B, Penuela GA and Morato J. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *J Virol Meth* 2010; 168, 228–232.
- Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Doré W. 2013. Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. *Water Research*. 2013 Sep; 47 (14), 5222–5231.
- Fu J, Bao C, Huo X, Hu J, Shi C, Lin Q, Zhang J, Ai J, Xing Z. Increasing Recombinant Strains Emerged in Norovirus Outbreaks in Jiangsu, China: 2015-2018. *Sci Rep*. 2019 Dec 27;9(1):20012.
- Fumian TM, Vieira CB, Leite JP, Miagostovich MP. Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health*. 2013; Mar;11(1):110-9.
- Fumian TM, Leite JP, Rocha MS, de Andrade JS, Fioretti JM, de Assis RM, Assis MR, Fialho AM, Miagostovich MP. Performance of a one-step quantitative duplex RT-PCR for detection of rotavirus A and noroviruses GII during two periods of high viral circulation. *J Virol Methods*. 2016 Feb; 228:123-9.
- Fumian TM, Fioretti JM, Lun JH, Dos Santos IAL, White PA, Miagostovich MP. Detection of norovirus epidemic genotypes in raw sewage using next generation sequencing. *Environ Int*. 2019 Feb;123:282-291.
- Fusco G, di Bartolo I, Cioffi B, Ianiro G, Palermo P, Monini M and Amoroso M.G. Prevalence of foodborne viruses in mussels in Southern Italy. *Food Environ Virol* 2017; 9, 187–194.
- Fusco G, Anastasio A, Kingsley DH, Amoroso MG, Pepe T, Fratamico PM, Cioffi B, Rossi R, La Rosa G, Boccia F. Detection of Hepatitis A Virus and Other Enteric Viruses in Shellfish Collected in the Gulf of Naples, Italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2019; Jul 19;16(14).
- Fuster N, Pinto RM, Fuentes C, Beguiristain N, Bosch A, Guix S. Propidiummonoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis a inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. *Water Res* 2016; 101, 226–232.
- Ge L, Chen X, Liu J, Zheng L, Chen C, Luo S, Guo P, Kong J, Song Y, Huo Y. Genomic and biological characterization of a pandemic norovirus variant GII.4 Sydney 2012. *Virus Genes*. 2020 Jan 7.
- Glass PJ, White LJ, Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000; v. 74, p. 6581-91.
- Gordon I, Ingraham HS, Kornis RF. Transmission of epidemic gastroenteritis to human volunteers by oral administration of fecal filtrates. *J Exp Med* 1947; v. 86, p. 409–22.
- Graham DY, Jiang X, Tanaka T, Opekun AR, Madore HP, Estes MK. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J Infect Dis* 1994; v. 170, p. 34-43.

Graiver DA, Saunders SE, Topliff CL, Kelling CL and Bartelt- Hunt SL. Ethidium monoazide does not inhibit RT- PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. *J Virol Meth* 2010; 164, 51– 54.

Green,G . *Caliciviruses: Molecular and Cellular Virology*. Horizon Scientific Press 2010.

Green K. *Caliciviridae: The noroviruses*. In: Knipe DM, Howley PM (editors). *Fields virology* 2013; Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 586–608.

Greenberg HB. Proteins of Norwalk virus. *J Virol* 1981; v. 37, p. 994-99.

Hardy ME and Estes MK. Completion of the Norwalk virus genome sequence *Virus Genes* 1996; v. 12, p. 287-90.

Hardy ME. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Dec 1; 253(1):1-8. Epub 2005 Sep 6. Review.

Hassard F, Sharp J H, Taft H, Le Vay L, Harris JP, McDonald J E. Critical review on the public health impact of norovirus contamination in shellfish and the environment: A UK perspective. *Food Environmental Virology* 2017; 9, 123–141.

Henigman U, Biasizzo M, Vadnjal S, Toplak I, Gombač M, Steyer A, Poljšak Prijatelj M, Ambrožič M, Fonda I, Kirbiš A, Barlič-Maganja D. Molecular characterisation of noroviruses detected in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from harvesting areas in Slovenia. *New Microbiol*. 2015 Apr; 38(2):225-33.

Higuchi Y, Kubo T, Mitsuhashi T, Nakamura N, Yokota I, Komiyama O, Kamimaki I, Yamamoto S, Uchida Y, Watanabe K, Yamashita H, Tanaka S, Iguchi K, Ichimi R, Miyagawa S, Takayanagi T, Koga H, Shukuya A, Saito A. Clinical epidemiology and treatment of febrile and afebrile convulsions with mild gastroenteritis: a multicenter study. *Pediatr Neurol* 2017; v. 67, p. 78–84.

Huang XY, Su J, Lu QC, Li SZ, Zhao JY, Li ML, Li Y, Shen XJ, Zhang BF, Wang HF, Mu YJ, Wu SY, Du YH, Liu LC, Chen WJ, Klena JD, Xu BL. A large outbreak of acute gastroenteritis caused by the human norovirus GII.17 strain at a university in Henan Province, China. *Infect Dis Poverty*. 2017 Feb 1;6(1):6.

Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. *Trends Microbiol* 2004; v. 12, p. 279-87.

IBGE. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Censo 2010. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/>> . Acesso em: 10 dezembro. 2019

IBGE. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal. Censo 2017. Disponível em: < [https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria\\_municipal.html?edicao=22651&t=resultados](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria_municipal.html?edicao=22651&t=resultados) >, Acesso em: 10 dezembro, 2019.

IEAPM. Instituto De Estudos Do Mar Almirante Paulo Moreira. Nossa história: a ressurgência, v. 1, n. 1, p. 3-5, 2003. Disponível em: <<https://www1.mar.mil.br/ieapm/?q=historico>>. Acesso em: 16 junho 2019.

INEA. Instituto Estadual Do Ambiente. Plano de Conservação e Recuperação da Mata Atlântica de Arraial do Cabo. Série Planos da Mata Atlântica 3, 2017.

Iritani N, Kaida A, Abe N, Kubo H, Sekiguchi J, Yamamoto SP, Goto K, Tanaka T, Noda M. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *J. Med. Virol* 2014; 86, 2019–2025

Iwai M, Hasegawa S, Obara M, Nakamura K, Horimoto E, Takizawa T, Kurata T, Sogen, S. Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyoma, Japan (2006 to 2008). *Appl Environ Microbiol* 2009; 75, 1264–1270.

Jiang X, Graham DY, Wang KN, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990; v. 250, p. 1580-83.

Jin M, Wu S, Kong X, Xie H, Fu J, He Y, Feng W, Liu N, Li J, Rainey JJ, Hall AJ, Vinjé J, Duan Z. Norovirus Outbreak Surveillance, China, 2016-2018. *Emerg Infect Dis.* 2020 Mar;26(3):437-445.

Jordan WS Jr, Gordon I, Dorrance WR. A study of illness in a group of Cleveland families. VII. Transmission of acute non-bacterial gastroenteritis to volunteers: evidence for two different etiologic agents. *J Exp Med* 1953; v. 98, p. 461-75.

Jusbrasil. MPF requisita informações sobre retorno de esgoto na Praça de Skate em frente à Praia do Forte (RJ). Disponível em: <<https://mpf.jusbrasil.com.br/noticias/672463211/mpf-requisita-informacoes-sobre-retorno-de-esgoto-na-praca-de-skate-em-frente-a-praia-do-forte-rj?ref=amp>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2019

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol* 2003; 41, 1548-1557.

Kanamori H, Weber DJ, Gergen MF, DiBiase LM, Sickbert-Bennett EE, Rutala WA. Epidemiologic characteristics of health care-associated outbreaks and lessons learned from multiple outbreak investigations with a focus on the usefulness of routine molecular analysis. *Am J Infect Control.* 2018 Aug;46(8):893-898.

Kapikian AZ. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 1972; v. 10, p.1075-81.

Kapikian AZ. Overview of viral gastroenteritis. *Arch Virol Suppl.* 1996;12:7-19. Review

Karim MR, Fout GS, Johnson CH, White KM, Parshionikar SU. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. *J Virol Methods.* 2015; Jul;219:51-61.

Karst SM. Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses.* 2010 Mar;2(3):748-81.

Karst SM, Wobus CE, Goodfellow IG, Green KY, Virgin HW. Advances in norovirus biology. *Cell Host Microbe* 2014; v. 15, n. 6, p. 668-80.

Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino F, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002; v. 299, p. 225-39.

Keller, R., Justino, J. F., & Cassini, S. T. Surveillance of Enteric Viruses and Thermotolerant Coliforms in Surface Water and Bivalves from a Mangrove Estuary in Southeastern Brazil. *Journal of Water and Health* 2019; 11(3), 573–580.

Kim BR, Choi GE, Kim YO, Kim MJ, Song ES, Woo YJ. Incidence and characteristics of norovirus associated benign convulsions with mild gastroenteritis, in comparison with rotavirus ones. *Brain Dev* 2018; v. 40, n. 8, p. 699–706.

Kim K, Katayama H, Kitajima M, Tohya Y. and Ohgaki S. Development of a real- time RT- PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. *Water Sci Technol* 2011; 63, 502–507.

Kim SY and Ko G. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria MS2 and murine norovirus. *Lett. Appl. Microbiol* 2012; 55, 182–188.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980 Dec; 16(2):111-20.

Kingsley SL, Eliot MN, Carlson L, Finn J, Macintosh DL, Suh HH. Proximity of US schools to major roadways: a nationwide assessment, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol* 2014; 24, 253-259.

Kittigul L, Thamjaroen A, Chiawchan S, Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Pombubpa K, & Diraphat P. Prevalence and Molecular Genotyping of Noroviruses in Market Oysters, Mussels, and Cockles in Bangkok, Thailand. *Food and Environmental Virology* 2016; 8(2), 133–140.

Kittigul L, Rupprom K, Che-Arsae M, Pombubpa K, Thongprachum A, Hayakawa S, Ushijima H. Occurrence of noroviruses in recycled water and sewage sludge: emergence of recombinant norovirus strains. *J Appl Microbiol.* 2019 Apr; 126(4):1290-1301.

Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino F B, Shinohara M, Uchida K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *Journal of Virological Methods* 2002; 100(1–2), 107–114.

Koopmans, M. and Duizer, E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol* 2004; 90, 23–41.

Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol* 2013; v. 158, n. 10, p. 2059-68.

- Kubitza, F. Aquicultura no Brasil: principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. *Panorama da Aquicultura*, Rio de Janeiro, 2015 jul; v. 25, n. 150..
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2015.
- L'Homme Y, Sansregret R, Plante-Fortier Étienne, Lamontagne A-M, Ouardani M et al. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes* 2009; 39:66–75.
- La Bella G, Martella V, Basanisi M G, Nobili G, Terio V, & La Salandra G. Food-borne viruses in shellfish: Investigation on norovirus and HAV presence in Apulia (SE Italy). *Food Environmental Virology* 2017; 9,179–186.
- La Rosa G, Della Libera S, Brambilla M, Bisaglia C, Pisani G, Ciccaglione AR, Bruni R, Equestre M, Iaconelli M. Hepatitis E virus (genotype 3) in slurry samples from swine farming activities in Italy. *Food Environ. Virol.* 2017; 9, 219–229.
- Lambden PR, Liu B, Clarke IN. A conserved sequence motif at the 5' terminus of the Southampton virus genome is characteristic of the Caliciviridae. *Virus Genes* 1995; v. 10, p. 149-52.
- Lavinas, A. F.; Villaça, R. C.; Saad, A. M. Evaluation of the growth and mortality of the oysters (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1795) in the sea farm in Arraial do Cabo, RJ. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 2008; v. 34, n. 4, p. 497-504.
- Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, & Pommepuy M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66(8), 3241–3248.
- Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S, Doyle A, Zidane M, Suffredini E, Kohli E, Maddalo F, Monini M, Gallay A, Pommepuy M, Pothier P, Ruggeri FM. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov; 44(11):3878-82
- Le Guyader FS, Krol J, Ambert-Balay K, Ruvoen-Clouet N, Desaubliaux B, Parnaudeau S, Le Saux JC, Ponge A. Comprehensive analysis of a norovirus associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *J Clin Microbiol* 2010; 48, 915–920.
- Le Guyader FS, Atmar RL and Le Pendu J. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Curr Opin Virol* 2012; 2, 103–110.
- Le Mennec C, Parnaudeau S, Rumebe M, Le Saux J, Piquet J, & Le Guyader S F. Follow-up of norovirus contamination in an oyster production area linked to repeated outbreaks. *Food and Environmental Virology* 2017; 9(1), 54–61.
- Lees D. Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol* 2000; 59,81–116.
- Lima, M. N. B. *Biologia Reprodutiva, Crescimento e Cultivo da Ostra-do-Mangue Crassostrea gasar Adanson (1757) (MOLLUSCA: BIVALVIA) em manguezais da Costa Amazônica (Curuçá e São Caetano de Odivelas), Brasil.* 2015. 70 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aquática e Pesca) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.



- Loisy F, Atmar RL, Le Saux JC, Cohen J, Caprais MP, Pommepuy M and Le Guyader FS. Use of rotavirus virus-like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71, 6049–6053.
- López-Campos, G. Detection, Identification, and Analysis of Foodborne Pathogens. In *Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens*. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition 2012; pp. 13–33.
- Lopman B, Gastañaduy P, Park GW, Hall AJ, Parashar UD. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr Opin Virol* 2012; 2: 96–102.
- Lowther JA, Avant JM, Gizynski K, Rangdale RE, Lees DN. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. *J Food Prot.* 2010 Feb; 73(2):305–11.
- Lowther J A, Gustar N E, Powell A L, Hartnell R E, & Lees DN. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78(16), 5812–5817.
- Lowther J A, Gustar NE, Powell AL, O’Brien S, & Lees DN. A one-year survey of norovirus in UK oysters collected at the point of sale. *Food and Environmental Virology* 2018; 10(3), 278–287.
- Lun JH, Hewitt J, Yan GJH, Enosi Tuipulotu D, Rawlinson WD, White PA. Recombinant GII.P16/GII.4 Sydney 2012 Was the Dominant Norovirus Identified in Australia and New Zealand in 2017. *Viruses*. 2018; Oct 9;10(10).
- Lunestad BT, Maage A, Roiha IS, Myrmet M, Svanevik CS, Duinker A. An outbreak of norovirus infection from shellfish soup due to unforeseen insufficient heating during preparation. *Food Environ. Virol* 2016; 8, 231–234
- Lunetta J.E. Fisiologia da reprodução dos mexilhões (*Mytilus perna* - Mollusca Lamellibranchia) *Bol. Fac. Filos. Ciênc. Univ. São Paulo* 1969; 26: 33-111.
- Maalouf H, Schaeffer J, Parnaudeau S. Strain-independent norovirus bioaccumulation in oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; v. 77, p. 3189-3196.
- Mallory ML, Lindesmith LC, Graham RL, Baric RS. GII.4 Human Norovirus: Surveying the Antigenic landscape. *Viruses* 2019; v. 11, n. 2.
- Manso C.F and Romalde J.L. Detection and characterization of hepatitis A virus and norovirus in mussels from Galicia (NW Spain). *Food Environ Virol* 2013a; 5,110–118.
- Manso CF and Romalde JL. Molecular epidemiology of norovirus from patients with acute gastroenteritis in northwestern Spain. *Epidemiol Infect* 2013b; 143,316–324.
- Manso C.F, Monteagudo A. and Romalde J.L. Detection and genotyping of norovirus from clinical and shellfish samples: epidemiological implications. In *Proceedings of the 9th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*, 2014.

- Manzoni, G.C. Cultivo de mexilhões Perna perna: evolução da atividade no Brasil e avaliação econômica da realidade de Santa Catarina. 257 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2005. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/144142>>.
- Marenzi, A. W. C. et al. O Mexilhão Perna perna (L.): biologia, ecologia e aplicações. Rio de Janeiro: Interciência, 2008; p. 169-181.
- Marks PJ, Vipond IB, Carlisle D, Deakin D, Fey RE, Caul EO. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol Infect* 2000; v. 124, p. 481-87.
- Marks PJ, Vipond IB, Regan FM, Wedgwood K, Fey RE, Caul EO. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidem Inf* 2003; v 131, p. 727-36.
- Mattison, K. & Bidawid, S. *Analytical Methods for Food and Environmental Viruses*, 2009.
- Medici MC, Tummolo F, Martella V, De Conto F, Arcangeletti MC, Pinardi F, Ferraglia F, Chezzi C, Calderaro A. Emergence of novel recombinant GII.P16\_GII.2 and GII.P16\_GII.4 Sydney 2012 norovirus strains in Italy, winter 2016/2017. *New Microbiol*. 2018 Jan;41(1):71-72.
- Mesquita JR, Vaz L, Cerqueira S, Castilho F, Santos R, Monteiro S, Manso CF, Romalde JL. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiol* 2011; 28, 936–941.
- Mikalsen AB, Nilsen P, Frøystad-Saugen M, Lindmo K, Eliassen TM et al. Characterization of a novel calicivirus causing systemic infection in atlantic salmon (*Salmo salar* L.): proposal for a new genus of Caliciviridae. *PLoS One* 2014; 9:e107132.
- Mor SK, Phelps NBD, Ng TFF, Subramaniam K, Primus A et al. Genomic characterization of a novel calicivirus, FHMCV-2012, from baitfish in the USA. *Arch Virol* 2017; 162:3619–3627.
- Moreno L, Aznar R, Sanchez G. Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis a virus in food samples. *Int. J. Food Microbiol* 2015; 201, 1–6.
- Moresco V, Viancelli A, Nascimento M A, Souza DM S, Ramos A P D, Garcia L A T, Simões C M O, Barardi C R M. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 2012; v. 64, p. 40-48.
- Morillo SG, Luchs A, Cilli A, do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky M. Rapid detection of norovirus in naturally contaminated food: foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil, 2010. *Food Environ Virol*. 2012 Sep; 4(3):124-9.
- Nguyen GT, Phan K, Teng I, Pu J, Watanabe T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis in developing countries. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Oct;96; (40):e8139.

- Nguyen GT, Pu J, Miura T, Ito H, Kazama S, Konta Y, Van Le A, Watanabe T. Oyster Contamination with Human Noroviruses Impacted by Urban Drainage and Seasonal Flooding in Vietnam. *Food Environ Virol.* 2018 Mar;10; (1):61-71.
- Niendorf S, Jacobsen S, Faber M, Eis-Hübinger AM, Hofmann J, Zimmermann O, Höhne M, Bock CT. Steep rise in norovirus cases and emergence of a new recombinant strain GII.P16-GII.2, Germany, winter 2016. *Euro Surveill.* 2017 Jan 26;22 (4).
- Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H: Genotyping and quantitation of norovirus in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiol Immunol* 2007; 51:177-184.
- Nocker A, Cheung CY and Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Meth* 2006; 67, 310– 320.
- Okhuysen PC, Jiang X, Ye L, Johnson PC, Estes MK. Viral shedding and fecal IgA response after Norwalk virus infection. *J Infect Dis* 1995; v. 171, p. 566-69.
- Oristo S, Lee HJ, Maunula L. Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PMAxx, benzonase and RNase. *J Appl Microbiol.* 2018; Apr;124 (4):1008-1016.
- Ortega C, Solo-Gabriele HM, Abdelzaher A. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical Estuary. *Marine Pollution Bulletin* 2009; 1-8.
- Parshionikar S, Laseke I, Fout GS. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl. Environ. Microbiol* 2010; 76, 4318–4326.
- Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, Akazawa K, Vinjé J, Parashar UD. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2008; v. 14, p. 1224-31.
- Paula FL, Sardi SI, Tigre DM, Fernandes FMC, Campos GS. ACUTE Gastroenteritis Associated With Norovirus GII.4 Variants. *Arq Gastroenterol.* 2018 Jul-Sep;55(3):264-266.
- Pepe T, Ventrone I, Suffredini E, Ceruso M, Croci L, Anastasio A, Cortesi ML. Norovirus monitoring in bivalve molluscs harvested and commercialized in southern Italy. *J Food Prot* 2012; May;75 (5):976-81.
- Pereira MA, Nunes MM, Nuernberg L. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; v. 61, p. 3656-3660.
- Pilotto, M. R. Aquisição, estabilidade e inativação de vírus entéricos em ostras *Crassostrea gigas*. 2015. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

Pilotto MR, Barardi CRM, Souza DSM. Viral uptake and stability in *Crassostrea gigas* oysters during depuration, storage and steaming. *Marine Pollution Bulletin* 2019; 149.

Pires SM, Fischer-Walker CL, Lanata CF, Devleeschauwer B, Hall AJ, Kirk MD, Duarte AS, Black RE, Angulo FJ. Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. *PloS One* 2015; v. 10, p. 1–17.

Poli, C.R. Aspectos da Biologia de *Nodipecten nodosus*. (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia), nos arredores da Ilha do Arvoredo (Santa Catarina- Brasil) com vistas a utilização na aquicultura, 97 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 1994.

Poli, A.T.B.; Gálvez, A.O.; Oliveira, J.de M. Produtividade aquática em aquicultura. In: Poli, C.R.; Poli, A.T.B.; Andreatta, E.R.; Beltrame, E. (Eds). *Aquicultura: Experiências Brasileiras*. Florianópolis. Multitarefa. 2004; p73- 91.

Polo D, Varela MF, Romalde, JL. Detection and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. *Int. J. Food Microbiol.* 2015; 193, 43–50.

Pommepuy M, Le Guyader FS, Le Saux JC, Guilfoyle F, Doré B, Kershaw S, Lees D, Lowther JA. Reducing microbial risk associated with shellfish in European countries. In *Improving Seafood Product for the Consumer*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd. Børresen 2008; pp 212–245.

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

Purpari G, Macaluso G, Di Bella S, Gucciardi F, Mira F, Di Marco P. Molecular characterization of human enteric viruses in food, water samples and surface swabs in Sicily. *International Journal of Infectious Diseases* 2019; 80, 66–72.

Rajal VB, McSwain BS, Thompson DE, Leutenegger CM, Kildare BJ, Wuertz S. 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 Apr; 41(7):1411-22.

Randazzo W, Lopez-Galvez F, Allende A, Aznar R, Sanchez G. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol* 2016; 229, 1–6.

Randazzo W, Khezri M, Ollivier J, Le Guyader F, Rodríguez-Díaz J, Aznar R, Sánchez G. Optimization of PMAxx pretreatment to distinguish between human norovirus with intact and altered capsids in shellfish and sewage samples. *International Journal of Food Microbiology* 2018; 266, 1-7.

Reimann Ha, Price Ah, Hodges Jh. The cause of epidemic diarrhea, nausea and vomiting (viral dysentery?). *Proc Soc Exp Biol Med* 1945; v. 59, p. 8-9.

Reymão TKA, Fumian TM, Justino MCA, Hernandez JM, Bandeira RS, Lucena MSS, Teixeira DM, Farias FP, Silva LD, Linhares AC, Gabbay YB. Norovirus RNA in serum

associated with increased fecal viral load in children: Detection, quantification and molecular analysis. *PLoS One*. 2018 Jul 2;13 (7):e0199763.

Rippey, S.R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7, 419–425.

Rocha-Pereira J, Van Dycke J, Neyts J. Norovirus genetic diversity and evolution: implications for antiviral therapy. *Curr Opin Virol*. 2016 Oct;20:92-98..

Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinjé J, De Bruin E, Van Duynhoven Y, Koopmans M. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2002 Aug 1;35 (3):246-53.

Rockx B, Baric RS, de Grijns I, Duizer E, Koopmans MP. Characterization of the homo- and heterotypic immune responses after natural norovirus infection. *J Med Virol*. 2005 Nov;77(3):439-46

Rodrigues, M. T. Ressurgência: fenômeno da Vida. *Revista do Meio Ambiente*. v. 41. 2011. Disponível em: <<http://www.portaldomeioambiente.org.br>>. Acesso em: 6 jun. 2019

Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM. Virus hazards from food, water and other contaminates environments. *Federation of European Microbiology Societies* 2012; v. 36, p. 786-814.

Rosa, R. de C. C. Impacto do cultivo de mexilhões nas comunidades pesqueiras de Santa Catarina. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina 1997.

Rosiles-González G, Ávila-Torres G, Moreno-Valenzuela OA, Cháidez-Quiroz C, Hernández-Flores CI, Acosta-González G, Brown JK, Betancourt WQ, Gerba CP, Hernández-Zepeda C. Norovirus and human adenovirus occurrence and diversity in recreational water in a karst aquifer in the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl Microbiol*. 2019 Oct;127(4):1255-1269.

Rupnik A, Keaveney S, Devilly L, Butler F, Doré W. The Impact of Winter Relocation and Depuration on Norovirus Concentrations in Pacific Oysters Harvested from a Commercial Production Site. *Food Environ Virol*. 2018 Sep;10 (3):288-296..

Ruppert, E. E.; Barnes, R. D. Moluscos. In: Ruppert, E. E. (Coord.). *Zoologia dos Invertebrados*. São Paulo: Roca, 1996; p. 412-449.

Salvini-Plawen, L., And G. Steiner. Synapomorphies and plesiomorphies in higher classification of Mollusca. ed. *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford Science Publications, London 1996; Pp. 29-51

Sanchez, G, Elizaquivel P, Aznar, R. Discrimination of infectious hepatitis. 2012.

Santos VS, Gurgel RQ, Cavalcante SM, Kirby A, Café LP, Souto MJ, Dolabella SS, de Assis MR, Fumian TM, Miagostovich MP, Cunliffe NA, Cuevas LE. Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus-vaccinated population in Northeast Brazil. *J Clin Virol*. 2017 Mar;88:33-38.

Sartori, A. G. O., and Amancio, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 2012; 19(2), 83-93

Schaeffer J, Treguier C, Piquet JC, Gachelin S, Cochenne-Laureau N, Le Saux JC, Garry P, Le Guyader FS. Improving the efficacy of sewage treatment decreases norovirus contamination in oysters. *Int J Food Microbiol*. 2018 Dec 2;286:1-5.

Seah EL, Marshall JA, Wright PJ. Open reading frame 1 of the Norwalk-like virus Camberwell: completion of sequence and expression in mammalian cells. *J Virol* 1999; v. 73, p.10531-35.

Secretaria Municipal de Pesca e Aquicultura. Disponível em: <[http://www.angra.rj.gov.br/secretaria\\_spe\\_especiescultivadas.asp?IndexSigla=SPE&vNomeLink=Esp%E9cies%20Cultivadas#.Vv1JRpwrLMw](http://www.angra.rj.gov.br/secretaria_spe_especiescultivadas.asp?IndexSigla=SPE&vNomeLink=Esp%E9cies%20Cultivadas#.Vv1JRpwrLMw)> Acesso em 15 de janeiro de 2020.

Shieh YC, Baric RS, Woods JW, Calci KR. Molecular surveillance of enterovirus and norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Dec;69(12):7130-6 Siebenga JJ, Vennema H, Duizer E, Koopmans MPG. Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4 in the Netherlands, 1994–2005. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13, 144–146.

Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, Halperin T, Rasool NB, Hewitt J, Greening GE, Jin M, Duan ZJ, Lucero Y, O’Ryan M, Hoehne M, Schreier E, Ratcliff RM, White PA, Iritani N, Reuter G, Koopmans M. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. *J Infect Dis*. 2009 Sep 1; 200(5):802-12.

Siqueira JAM, Bandeira RDS, Oliveira DS, Dos Santos LFP, Gabbay YB. Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982-2011) comprehensive study with children from Northern Brazil. *PLoS One*. 2017 Jun 12;12(6).

Silva P.J.A. Onze anos de Produção Pesqueira no Município de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências. Biologia Marinha) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

Simmons G, Greening G, Gao W, & Campbell D. Rawoyster consumption and outbreaks of viral gastroenteritis in New Zealand: evidence for risk to the public’s health. *Australian and New Zealand Journal of Public Health* 2001; 25, 234–240.

Souza DSM, Ramos APD, Nunes FF. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2012; v.76, p. 153-161.

Souza DSM, Piazza RS, Pilotto MR, Nascimento MDAD, Moresco V, Taniguchi S, Leal DAG, Schmidt TC, Cargin-Ferreira E, Bicego MC, Sasaki ST, Montone RC, de Araujo RA, Franco RMB, Bouzon ZL, Bainy ACD, Barardi CRM. Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. *Int. J. Food Microbiol* 2013; 167.

Souza DSM, Dominot AFÁ, Moresco V, Barardi CRM. Presence of enteric viruses, bioaccumulation and stability in *Anomalocardia brasiliana* clams (Gmelin, 1791). *Int J Food Microbiol*. 2018 Feb 2;266:363-371.

- Subasinghe, RP. Aquaculture future: an analysis. *FAO Aquaculture Newsletter* 2014; v. 52, p. 19-23.
- Suffredini E, Pepe T, Ventrone I, & Croci L. Norovirus detection in shellfish using two Real-Time RT-PCR methods. *New Microbiologica* 2011; 34(1), 9–16.
- Suffredini E, Magnabosco C, Civettini M, Rossetti E, Arcangeli G, & Croci L. Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas. *Journal of Applied Microbiology* 2012; 113(3), 686–692
- Tan M and Jiang X. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 2005; v. 79, p. 14017-30.
- Taylor, MB & Nat, PS. Water and foodborne viruses: current developments. *Continuing Medical Education* 2011; 29(5), pp.207–209.
- Terio V, Di Pinto A, Bottaro M, Shehu F, Catella C, & Martella V. Occurrence of norovirus and hepatitis A virus in shellfish. *Albanian Journal of Agricultural Sciences* 2014; 13, 461–465.
- Teuni PF. Norwalkvirus: How infectious is it? *J. Med. Virol* 2008; v. 80, n. 8, p.1468–76.
- Thornhill TS. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 1977; v. 135, p. 20-27.
- Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol.* 2006 Apr;44(4):1405-12
- Tunyakittaveeward T, Rupprom K, Pombubpa K, Howteerakul N, Kittigul L. Norovirus Monitoring in Oysters Using Two Different Extraction Methods. *Food Environ Virol.* 2019 Dec; 11(4):374-382.
- Ueki Y, Sano D, Watanabe T, Akiyama K, Omura T. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.* 2005 Nov;39 (18):4271-80.
- Vega E, Vinjé J. Novel GII.12 norovirus strain, United States, 2009-2010. *Emerg Infect Dis.* 2011 Aug;17(8):1516-8.
- Victoria M, Carvalho- Costa FA, Heinemann MB, Leite JP and Miagostovich M. Prevalence and molecular epidemiology of noroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil, 2004. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26, 602–606.
- Vilariño ML, Le Guyader FS, Polo D, Schaefer J, Kröl J, & Romalde J L. Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *International Microbiology* 2009; 12,145–151

- Vinje J. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch Virol* 2000; v. 145, n. 2, p. 223-41.
- Vinje J, Vennema H, Maunula L, Bonsdorff CHV, Hoehne M, Schreier E. International Collaborative Study to Compare Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection and Genotyping of Noroviruses. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1423-1433
- Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II Noroviruses. *J Virol Meth.* 2004; 116: 109-117.
- Vinje, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2015; 53, 373–381.
- Volpini LPB, Barreira DMPG, Almeida PLDS, Spano LC. An outbreak due to a norovirus GII.Pe-GII.4 Sydney\_2012 recombinant in neonatal and pediatric intensive care units. *J Infect Public Health*, 2019.
- Wang X, Wei Z, Guo J, Cai J, Chang H, Ge Y, Zeng M. Norovirus Activity and Genotypes in Sporadic Acute Diarrhea in Children in Shanghai During 2014-2018. *Pediatr Infect Dis J.* 2019 Nov;38 (11):1085-1089.
- White PA. Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Aug;20(8):741-5.
- Wilson, W.J. Isolation of *B. typhosus* from sewage and shellfish. *Br Med* 1928; 1, 1061–1062.
- Wolf S, Reetz J, Otto P. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Arch Virol* 2011; v. 156, n. 7, p.1143–50.
- Wyn-Jones, A.P. and Sellwood, J. Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol* 2001; 91, 945–962.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006 ; 346: 312-323.
- Zhou N, Lin X, Wang S, Tao Z, Xiong P, Wang H, Liu Y, Song Y, Xu A. Molecular epidemiology of GI and GII noroviruses in sewage: 1-year surveillance in eastern China. *J Appl Microbiol.* 2016 Oct;121 (4):1172-9.
- Zhou H, Wang S, von Seidlein L, Wang X. The epidemiology of norovirus gastroenteritis in China: disease burden and distribution of genotypes. *Front Med.* 2019 Dec 10.