

REVISÃO

<https://doi.org/10.22239/2317-269x.00928>

Norovírus em alimentos

Norovirus in foods

Isabelle da Silva Luz*

Marize Pereira Miagostovich

RESUMO

Introdução: Os norovírus (NoV) são importantes agentes causadores de gastroenterite de origem alimentar, com surtos associados ao consumo de frutas, vegetais folhosos, moluscos bivalves e alimentos de *delicatessen*. O aumento da importância epidemiológica destes vírus tem sido demonstrado pelo estabelecimento de redes laboratoriais de vigilância em diversos continentes. As infecções por NoV se tornaram mais conhecidas especialmente com a consolidação do mercado de navios de cruzeiros no país a partir de 2004. **Objetivo:** Este estudo tem como objetivo apresentar avanços relacionados à pesquisa de NoV em alimentos, destacando características deste patógeno e estratégias para sua detecção nestas matrizes. **Método:** Foi realizada uma revisão integrativa, pelo levantamento de artigos científicos com o objetivo de tratar dos principais aspectos de NoV. **Resultados:** Foi realizada uma ampla revisão da literatura, com a descrição dos principais resultados presentes na literatura consultada e a discussão de aspectos como doenças transmitidas por alimentos (DTA), vírus como contaminantes de alimentos, estabilidade e desinfecção, surtos de origem alimentar associados aos NoV, alimentos associados à contaminação por NoV, métodos de concentração e detecção de NoV em alimentos, estudos de avaliação de risco e prevenção e controle. **Conclusões:** Os registros de envolvimento de NoV em surtos de origem alimentar e a crescente diversidade genética destes vírus reforçam a necessidade de vigilância laboratorial e epidemiológica sobretudo nos países em desenvolvimento, como o Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Norovírus; Alimentos; Surtos de Doenças; Gastroenterite; Métodos; Vigilância Sanitária

ABSTRACT

Introduction: Noroviruses (NoV) are important causative agents of foodborne gastroenteritis outbreaks associated with the consumption of fruits, leafy vegetables, bivalve molluscs and delicatessen foods. The establishment of laboratory surveillance networks in different continents has demonstrated increased epidemiological importance of those viruses. In Brazil, the NoV infection is considered an important public health issue with socioeconomic burden, but the investigation of these viruses in foodborne outbreaks is still restricted to research laboratories. NoV infections have become more known especially with the consolidation of the cruise ship market in the country since 2004. **Objective:** This study aims to present advances related to NoV research in foods, highlighting features of this pathogen and strategies for its detection in these matrices. **Method:** An integrative review, collecting scientific articles with the objective of dealing with the main aspects of NoV, was carried out. **Results:** A broad literature review was performed, describing the main results in the literature and discussing aspects such as foodborne diseases, viruses as food contaminants, stability and disinfection, foodborne outbreaks associated with NoV, food associated with NoV contamination, NoV concentration and detection methods in food, risk assessment studies and prevention and control. **Conclusions:** records of foodborne outbreaks associated with NoV and the increasing genetic diversity of these viruses reinforce the need for laboratory and epidemiological surveillance, especially in developing countries, such as Brazil.

KEYWORDS: Norovirus; Foods; Disease Outbreaks; Gastroenteritis; Methods; Sanitary Surveillance

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

* E-mail: isabelle.luz@ioc.fiocruz.br
belleluz@gmail.com

Recebido: 06 fev 2017
Aprovado: 23 maio 2017



INTRODUÇÃO

Descrito pela primeira vez na década de 1970 com o uso de imunomicroscopia eletrônica¹, os vírus Norwalk, como eram conhecidos os norovírus (NoV), tiveram sua importância epidemiológica reconhecida somente a partir da década de 1990 com o advento de técnicas moleculares de clonagem e sequenciamento nucleotídico, que permitiram a produção de insumos para diagnóstico^{2,3,4,5,6}. Atualmente, os NoV são reconhecidos como os principais agentes causadores de surtos e casos esporádicos de gastroenterite aguda de origem não bacteriana em humanos^{7,8,9,10}.

O impacto das infecções por NoV nos países industrializados é evidente pelo número de redes de vigilância epidemiológica estabelecidas nos diferentes continentes. Plataformas eletrônicas como *Noronet* (Holanda), *Food-borne Viruses in Europe* (União Europeia), *Hospital Norovirus Outbreak Reporting Tool* (Inglaterra), *Episurv* (Nova Zelândia), *OzFoodNet* (Austrália), *Calicinet* e *National Outbreak Reporting System* (Estados Unidos) vêm promovendo a integração entre laboratórios pelo compartilhamento de dados epidemiológicos e moleculares provenientes de surtos, fornecendo informações sobre a circulação de genótipos e o surgimento de novas variantes^{11,12,13,14}. Nestes países, onde o diagnóstico é bem estabelecido, os NoV são responsáveis por mais de 200.000 mortes/ano, principalmente de crianças menores de 5 anos de idade⁹.

No Brasil, as infecções por NoV se tornaram mais conhecidas especialmente com a consolidação do mercado de navios de cruzeiros no país a partir da temporada de 2004/2005 (<http://www.abremar.com.br/down/fgv2015.pdf>), uma vez que é comum a ocorrência de surtos de gastroenterites nestes ambientes^{10,15,16,17,18}. Adicionalmente, diversos estudos realizados no país vêm demonstrando o impacto das infecções por NoV em diferentes populações incluindo surtos, casos esporádicos, pacientes hospitalizados, assim como a ocorrência de infecções assintomáticas e casos associados a quadros de diarreia persistente^{19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32}. A disseminação ambiental dos NoV em diferentes matrizes aquáticas no país também tem sido demonstrada com concentrações atingindo $1.5E+04 - 0.3E+05$ (GC)/L em amostras de esgoto bruto^{33,34,35,36,37,38,39,40}.

Em relação às gastroenterites de origem alimentar, que se encontram no grupo de doenças transmitidas por alimentos (DTA), os NoV foram associados a 38 surtos (0,9%) de um total de 9.719 casos notificados pelo Ministério da Saúde (MS) no período de 2000-2014⁴¹. Em mais de 10.000 surtos de gastroenterites associados à contaminação alimentar relatados nos últimos anos, mais da metade não possui um agente etiológico definido. Assim, como na maioria dos países, a determinação de surtos de origem alimentar associados com NoV baseia-se em investigações epidemiológicas e testes laboratoriais realizados com amostras clínicas de indivíduos envolvidos nestes surtos⁴².

A detecção de NoV humano em alimentos é dificultada pela complexidade da matriz alimentar e pela presença de baixos níveis de partículas de vírus, o que resulta em subnotificação de surtos^{43,44}. Esta revisão tem como principal objetivo apresentar os NoV como os principais agentes virais associados a surtos de gastroenterite de

origem alimentar, descrevendo suas características gerais e os avanços relacionados à pesquisa destes vírus em matrizes alimentares.

MÉTODO

Este estudo, elaborado como uma revisão integrativa, foi conduzido segundo metodologia descrita por Sobral e Campos⁴⁵, pelo levantamento de artigos científicos com o objetivo de tratar dos principais aspectos de NoV a partir do consumo de alimentos contaminados, bem como infecções relacionadas. A pesquisa de literatura científica foi realizada por consulta à base de dados PubMed (empregando palavras-chave como: *norovirus on foods, methodologies for norovirus on foods, norovirus review*) e do MS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Doenças transmitidas por alimentos (DTA)

DTA é um termo genérico aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, atribuída à ingestão de alimentos ou água contaminados. No entanto, sintomas digestivos não são as únicas manifestações dessas doenças, uma vez que infecções extraintestinais em diferentes órgãos e sistemas, de acordo com o agente envolvido, também possam ocorrer. Além de bactérias e toxinas, as DTA podem também ser causadas por substâncias tóxicas, parasitas e vírus⁴⁶.

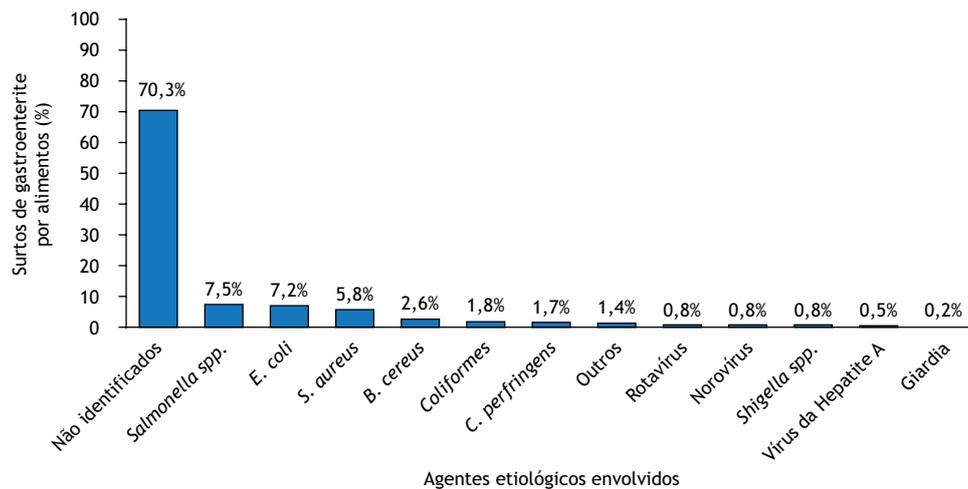
O perfil epidemiológico das DTA no Brasil ainda é pouco conhecido. Somente alguns estados e/ou municípios dispõem de informações estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes^{46,47}. Há ainda casos de DTA que não são notificados às autoridades sanitárias, uma vez que muitos patógenos alimentares causam sintomatologia branda e o paciente não busca auxílio médico⁴⁸.

Em muitos países, inclusive no Brasil, a descrição de surtos (episódio em que duas ou mais pessoas apresentam doença semelhante após ingerirem alimentos e/ou água da mesma origem notificados) se restringe àqueles que envolvem um maior número de pessoas ou quando a duração dos sintomas é mais prolongada⁴⁹.

A Figura apresenta os principais agentes etiológicos identificados nos surtos de DTA ocorridos no Brasil entre 2007 e 2016, destacando o número de agentes não identificados e o pequeno número de casos associados aos NoV, assim como outros agentes virais (rotavírus e vírus da hepatite A).

Vírus como contaminantes de alimentos

Como vírus de transmissão fecal-oral, os vírus entéricos humanos são importantes contaminantes de água e alimentos, principalmente por serem vírus não envelopados e resistentes a condições adversas, tanto no organismo humano (acidez do estômago) como no ambiente⁵⁰. Assim como os NoV, os vírus da hepatite A



Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (2016)⁴⁷; *dados sujeitos à atualização.

Figura. Surtos de gastroenterite de origem alimentar identificados no Brasil no período de 2007-2016* de acordo com o agente etiológico envolvido.

(HAV) e E (HEV), enterovírus, astrovírus, parvovírus, rotavírus, adenovírus (AdV) 40 e 41, e, mais raramente, coronavírus também são associados a infecções de origem alimentar^{51,52}.

Embora a estabilidade destes vírus nas diferentes matrizes dependa de diversos fatores ambientais, tais como pH, calor e resistência a agentes de limpeza, a baixa dose infecciosa dos NoV (18 partículas de vírus podem causar doença) representa um fator relevante na transmissibilidade destes vírus^{16,53,54,55,56,57}. A ingestão de água ou alimento contaminado constitui a principal via de infecção nestes casos, entretanto a doença associada pode ocorrer indiretamente a partir do contato com fômites contaminados⁵⁸.

Um importante fator a ser considerado na transmissão dos NoV é o grande número de infecções assintomáticas^{59,60,61}. Surtos por NoV frequentemente envolvem a preparação de alimentos por um manipulador no ambiente de serviço de alimentação, em que o contato direto das mãos ou com mão enluvada e limpeza inadequada são identificados como fatores contribuintes comuns⁶². Uma dispersão de vírus por manipuladores de alimentos possui o potencial de contaminação nestes ambientes, onde grandes quantidades de alimento podem ser preparadas em uma área relativamente pequena, envolvendo a interação de vários funcionários⁶³.

Norovírus

Pertencentes ao gênero *Norovirus*, família *Caliciviridae*, os NoV são um grupo de vírus não envelopados, icosaédricos, com aproximadamente 27 a 38 nm de diâmetro, cujo nome deriva da palavra grega *calyx* (cálice), em referência às depressões semelhantes a este formato sobre a superfície do vírus^{64,65}. Estes vírus foram previamente referidos por outros nomes, tais como *small round-structured viruses* e *virus Norwalk-like*⁶⁶.

O genoma consiste de um RNA de cadeia simples polaridade positiva alcançando de 7,3 a 7,5 kb, organizado em três quadros abertos de leitura (*open reading frame* [ORF]) e com uma cauda poli (A) na extremidade 3'^{2,3,67}. A ORF1 codifica uma poliproteína,

a qual é clivada em pelo menos seis proteínas não estruturais, incluindo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); ORF2 e ORF3 codificam respectivamente as proteínas VP1 e VP2 do capsídeo viral⁶⁸.

Devido à diversidade genética do gênero, os NoV são classificados em genogrupos (G) e genótipos (GG) pelo sequenciamento nucleotídico da região genômica completa que codifica para a proteína VP1 do capsídeo⁶⁹. Atualmente, os NoV têm sido classificados em seis genogrupos (GI-GVI), com a proposta de um sétimo⁷⁰, dos quais três (GI, II e IV) infectam humanos⁷¹.

NoV GII.4 tem sido associado com a maior parte de surtos e casos esporádicos ocorridos mundialmente, principalmente devido à emergência de novas variantes que se tornam dominantes a intervalos de 2 a 3 anos⁷². Entretanto, em 2013, o GII.P17 surgiu como um novo genótipo com potencial de evolução similar ao GII.4 alterando a epidemiologia dos NoV no mundo⁷³. A deriva antigênica e a recombinação de *hotspot*, principalmente da região de junção ORF1/ORF2, têm sido relatadas como um mecanismo importante para a evolução de NoV levando ao surgimento de novos vírus^{74,75,76,77,78,79,80}. Várias cepas recombinantes de NoV já foram descritas, de modo que análise de mais de uma região do genoma pode ser importante para a detecção de estirpes únicas ou recombinantes⁸¹.

No Brasil, a diversidade genética dos NoV foi demonstrada pela detecção de diferentes genótipos de genogrupos humanos GI (GI.1-4, GI.7-8), GII (GII.1-9, GII.12-17, GII.20-22, GII.b, GII.g, GII.e) e IV (GIV.1), assim como de variantes de GII.4 e recombinantes (US95_96, Kaisei_2003, Asia_2003, Hunter_2004, Yerseke_2006a, Den Haag_2006b, New Orleans_2009 e Sydney_2012)^{77,82,83,84,85,86}.

A infecção por NoV em humanos é caracterizada como uma infecção gastrointestinal autolimitada com sintomas que incluem náusea, vômito, diarreia, mal-estar, dor abdominal, dores musculares, anorexia, dor de cabeça e febre baixa. Os sintomas



geralmente começam 1 a 2 dias seguintes ao consumo de alimentos ou água contaminados e persistem por 1 a 8 dias⁶⁴.

Investigações de surto têm implicado o vômito como via de transmissão, pela produção de aerossóis que podem ser inalados, ou pela contaminação direta de superfícies^{87,88,89}. A infecção atinge todos os grupos etários, ocorrendo principalmente em ambientes domésticos e institucionais, tais como hospitais, escolas, restaurantes, asilos e cruzeiros marítimos^{60,65,90,91}. A epidemiologia dos NoV é complexa e influenciada por muitos fatores, incluindo imunidade da população, evolução do vírus, sazonalidade, estabilidade do vírus no ambiente e a frequente ocorrência de infecções assintomáticas^{59,60, 61,92,93,94,95}.

Estabilidade e desinfecção

Os NoV permanecem infecciosos após tratamento com desinfetantes comumente utilizados, como álcoois e compostos quaternários de amônio, assim como após aquecimento a uma temperatura de 60°C por 30 minutos, a éter 20% por 18 horas a 4°C e quando expostos a pH 2,7 por três horas à temperatura ambiente⁹⁶. Também podem ser estáveis à inativação após tratamento com 3,75 a 6,25 mg/L de cloro (resíduo de cloro livre de 0,5 a 1,0 mg/L), concentração a qual é encontrada em sistemas de distribuição de água para consumo. Entretanto, as partículas de NoV são inativadas após tratamento com 10 mg/L de cloro. Estudos demonstraram que os NoV são mais resistentes à inativação por cloro do que poliovírus tipo 1, rotavírus humanos (Wa), rotavírus simion (SA11) e bacteriófago F2⁹⁷.

Segundo Mormann et al.⁹⁸, medidas utilizadas pela indústria de processamento de alimentos para fins de conservação e processos utilizados pelos consumidores para preparo e estocagem seriam suficientes para inativar NoV em alimentos contaminados e, assim, a validação das condições de inativação térmica em alimentos específicos tem sido necessária⁹⁹.

Considerando a estabilidade dos NoVs no ambiente, Baert et al.¹⁰⁰ desenvolveram um trabalho de revisão sobre a eficácia de métodos de conservação utilizados para inativação de vírus em alimentos. Os autores sugeriram que métodos de conservação de alimentos tais como aquecimento, processamento por alta pressão hidrostática e irradiação têm sido mais eficazes na inativação de patógenos do que congelamento, refrigeração, atividade de água reduzida, acidificação ou embalagem em atmosfera modificada. Também destacaram a combinação tempo-temperatura e a eficácia variável de sanitizantes sobre a matriz alimentar em relação às cepas virais.

A indisponibilidade de linhagens celulares para replicação de NoV humano em laboratório resultou na utilização de vírus pertencentes ao mesmo gênero como substitutos para prever o comportamento de NoV em estudos de estabilidade em alimentos. Por compartilharem características estruturais e genéticas semelhantes e se propagarem em cultivo celular, o norovírus murino-1 (MNV-1) (genogrupo V) tem sido utilizado nestes estudos^{101,102}. Incluem-se ainda o calicivírus canino (CaCV) utilizado por Rutjes et al.¹⁰³ em amostras de alface e creme,

e o vírus Tulane (TV), um calicivírus que pertence ao gênero *Recovirus*^{93,104}. Em estudo realizado por Wang et al.⁹⁴ foi demonstrado que MNV-1, TV e HAV podem resistir sobre a superfície de sementes de alfafa por um período prolongado (22°C até 50 dias), e estes vírus poderiam contaminar brotos após germinação e serem transferidos para água de irrigação.

Surtos de origem alimentar associados aos NoV

De acordo com pesquisa de literatura sobre tendências epidemiológicas globais de surtos ocorridos de 1983 a 2011, Matthews et al.¹⁰⁵ observaram que a maioria de infecções por NoV foram transmitidas por rotas de origem alimentar (54%), com segunda posição para transmissão pessoa a pessoa (26%). Entretanto, esta foi uma metanálise de surtos publicados e não necessariamente baseada em dados de vigilância de base populacional. Além disso, taxa de ataque (definida como o número de casos por pessoa exposta) e distribuição de genótipos são fatores relevantes para a investigação de surtos¹⁰⁶.

Para estimar a proporção de infecções de origem alimentar causadas por NoV em uma escala global, Verhoef et al.¹⁴ utilizaram sistemas internacionais múltiplos de vigilância de surtos (*NoroNet*, *Calicinet*, *Episurv*) e revisão sistemática da literatura, e demonstraram que, embora a proporção de surtos causados por NoV GII.4 tenha sido menor do que aqueles associados com outros genótipos, é considerável a contribuição absoluta de surtos de origem alimentar por NoV GII.4 aos custos sociais e econômicos causados por este vírus.

Alimentos associados à contaminação por NoV

Alimentos frescos sujeitos à contaminação ambiental e manipulação¹⁰⁷, tais como frutas, vegetais folhosos¹⁰⁸ e moluscos bivalves¹⁰⁹, são os que apresentam maior risco de contaminação por NoV. Estes alimentos, além de serem consumidos crus, estão sujeitos à manipulação humana considerável e passam por tratamentos sanitários industriais que não garantem a eliminação total do patógeno quando presente¹¹⁰. Itens de *delicatessen* e alimentos prontos para o consumo que não sofrem processamento adicional, tais como sanduíches frios^{111,112}, saladas de vegetais¹¹³ e produtos de confeitaria¹¹⁴, também são comumente associados a surtos.

Frutas e vegetais folhosos

Surtos relacionados a diversos tipos de produtos, incluindo frutas frescas cortadas, alface, tomates, melões, saladas, cebolas verdes, morangos, framboesas e salsa foram atribuídos a NoV humano^{115,116,117}. Vários surtos implicados no consumo de produtos frescos foram conhecidos ou suspeitos, devido à contaminação no campo, sugerindo que a água de irrigação seria uma via de contaminação^{93,118}.

Pesquisas anteriores com cultivo hidropônico de alface mostraram que os vírus podem ser internalizados através da raiz e disseminados para as porções aéreas da planta^{93,119}. Verificou-se que o meio de crescimento das plantas desempenha o papel significativo na internalização do patógeno, por absorção pelo sistema radicular¹²⁰.



Nos Estados Unidos (EUA), NoV humano representa mais de 40% das doenças relacionadas a produtos frescos a cada ano^{121,122} e, de acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC), 11,6% dos casos de infecções virais foram causados pelo consumo de vegetais, frutas, bagas, sucos e alimentos mistos em 32 países da Europa, no ano de 2013^{123,124}.

Moluscos bivalves

Moluscos bivalves são classicamente conhecidos pelo alto risco de contaminação microbiológica que apresentam, uma vez que são acumuladores naturais de partículas dispersas na água. Parâmetros bacteriológicos têm sido utilizados como critério regulatório de segurança alimentar para avaliar a contaminação destes alimentos, assim como das águas de cultivo, principalmente após eventos de potencial contaminação fecal¹²⁵.

No entanto, concentrações de *Escherichia coli* e coliformes em ostras e águas de cultivo podem ser reduzidas dentro de alguns dias devido à inativação e eliminação sob influências do ambiente e de marés, o que não ocorre com os vírus¹²⁶. Uma característica de surtos relacionados a esta fonte é sua frequente associação com linhagens múltiplas de vírus observadas tanto em pacientes infectados como no alimento envolvido¹²⁷.

A maior parte dos surtos por NoV associados a moluscos bivalves são ligados ao consumo de ostras, porque estas são comumente consumidas cruas, embora alguns surtos tenham sido ligados a ostras cozidas¹²⁸. Estudos prévios relataram ainda que ostras congeladas importadas foram atribuídas a surtos de gastroenterite por NoV na Austrália e nos EUA^{129,130}.

Tanques para depuração de ostras têm sido utilizados para redução de contaminação bacteriana, entretanto, procedimentos de depuração padrão são ineficazes para contaminantes virais, conforme demonstrado pelos altos níveis de NoV detectados em ostras comercialmente distribuídas na Itália e EUA^{131,132}. Em ostras artificialmente contaminadas e depuradas, AdV humano foram detectados até 168 h e MNV-1 até 96 h de depuração, com quantificação viral variando de 3,2E + 05 CG/g a 4,4E + 07 CG/g para AdV e de 3,5E + 04 CG/g a 2,9E + 06 CG/g para MNV-1 após 14 dias de análise¹³³.

Um estudo realizado no Reino Unido em 2011 demonstrou que 76,2% (n = 844) de amostras coletadas nas áreas de produção de ostras apresentaram resultados positivos para NoV GI e/ou GII¹³⁴. Em um surto de gastroenterite associado ao consumo de ostras em um restaurante, também no Reino Unido, NoV GI e GII foram detectados em concentrações < 100 cópias/g (limite teórico de detecção do ensaio é 13 cópias/g de glândula digestiva da amostra) e 1.736 cópias/g, respectivamente¹³⁵.

No Brasil, NoV GI foram detectados em *Crassostera gigas* cultivadas em viveiros marinhos por 14 dias, com concentrações de 1,2 E + 06 CG/g, e NoV GII na água do mar, com concentrações de 7,5 E + 13 CG/g¹³⁶. Em investigações posteriores, NoV não foram encontrados por Souza et al.¹³³ em ostras naturalmente contaminadas.

Itens de delicatessen e alimentos prontos para o consumo

Método para detecção de NoV foi avaliado por Stals et al.¹³⁷ em alimentos prontos para o consumo, tais como amostras de salada *penne*, sopas, sanduíches e refeições compostas, encontrando que a recuperação de NoV GI e GII foi influenciada pelo nível de inóculo viral e pelo tipo de alimento. Além disso, MNV-1 foi avaliado com sucesso como controle de processo pela mesma metodologia de detecção.

Em um surto de gastroenterite por NoV, Malek et al.¹³⁸ encontraram que o consumo de carnes de *delicatessen* resultou em 137 pessoas doentes, em 13 viagens de *rafting* independentes durante um período de um mês, e a mesma sequência do vírus foi encontrada em amostras fecais obtidas de pessoas que participaram de cinco viagens diferentes.

No Brasil, foram identificados NoV GI.1 em amostra de manteiga com ervas e NoV GII.4 em amostras de queijo e molho branco contaminadas naturalmente, relacionadas a um surto de gastroenterite aguda num navio de cruzeiro¹⁵. Ainda neste estudo, o sequenciamento parcial do gene da RNA polimerase mostrou a presença de linhagens GII.4, confirmando trabalhos prévios que descrevem a incidência e distribuição deste genótipo no mundo inteiro⁷⁴, incluindo o Brasil^{21,139}.

Métodos de concentração e detecção de NoV em alimentos

De acordo com Baert et al.¹¹⁴, três categorias de alimentos são consideradas quando se elegem metodologias de concentração e detecção de vírus: alimentos ricos em água e carboidratos (frutas e vegetais); ricos em proteína e gordura (produtos prontos para o consumo) e moluscos bivalves, devido à acumulação e concentração de partículas virais e outros patógenos no sistema digestivo⁶⁷.

As etapas requeridas para a detecção de vírus nestas matrizes incluem 1) concentração e purificação de vírus, 2) extração de ácido nucleico, 3) detecção, e (d) confirmação¹⁴⁰. A concentração de partículas virais para um volume menor de amostra é a etapa mais crítica do processo e particularmente necessária devido aos baixos níveis de vírus que possam ocorrer nas matrizes^{137,141,142}. Durante a concentração dos vírus, moléculas tais como polissacarídeos, proteínas e ácidos graxos são removidas para prevenir a inibição da extração de RNA subsequente e detecção molecular^{143,144}.

Protocolos de eluição-concentração, baseados na recuperação das partículas virais da superfície do alimento utilizando um tampão apropriado seguido por concentração dos vírus eluídos incluem precipitação por polietileno glicol (PEG), ultracentrifugação, ultrafiltração, imunocaptação e separação catiônica. Diferentes metodologias apresentam taxas de recuperação viral influenciadas pela concentração de inóculo e pelo tipo de alimento analisado¹³⁷.

A eficiência destes métodos tem sido avaliada em diversos estudos com o objetivo de fornecer informações sobre recuperação viral. Em pesquisa realizada por Summa et al.¹⁴⁵, amostras de alface, presunto e framboesas foram contaminadas artificialmente com NoV GII, para comparação de quatro métodos de



recuperação viral baseados em técnicas de ultrafiltração, separação imunomagnética, ultracentrifugação e precipitação por PEG. Ultracentrifugação produziu maiores eficiências de recuperação em alface e presunto, enquanto a precipitação por PEG gerou maior rendimento de recuperação de NoV em framboesas.

Outros métodos, inicialmente descritos para concentração de NoV a partir de diferentes matrizes aquáticas, têm sido adaptados para recuperação destes vírus em matrizes alimentares. A utilização de métodos comuns para diferentes matrizes pode ser útil na investigação de surtos, na qual são disponibilizadas amostras de origem diversa. O método de concentração por filtração em membranas carregadas negativamente descrito para recuperação de NoV a partir de água do mar¹⁴⁶ foi adaptado para amostras de alface fresca e queijo minas pela eluição direta destes alimentos^{147,148,149}.

O método de floculação orgânica utilizando leite desnatado¹⁵⁰ também foi adaptado com sucesso para recuperação de vírus a partir de morangos¹⁵¹. Quando comparado com métodos de precipitação por PEG e filtração com membranas carregadas negativamente, demonstrou porcentagem de recuperação de 2,5 e 32 vezes maior do que as demais metodologias, respectivamente. Floculação orgânica é um método considerado de baixo custo, pois utiliza apenas um passo na concentração das amostras, economizando tempo e reagentes. A Tabela apresenta um resumo das taxas de recuperação viral obtidas com estas metodologias, em estudos realizados no Brasil.

A extração de RNA é a segunda etapa na estratégia para detecção de NoV. Protocolos de extração envolvem (1) lise do capsídeo viral e (2) isolamento de RNA⁶⁷. Entretanto, técnicas de extração direta de RNA viral envolvem tratamento do produto alimentar pela eluição viral com um reagente baseado em isotiocianato de guanidina/fenol, seguido por purificação do RNA extraído. Extração direta de RNA foi aplicada em alimentos compostos por proteína e/ou gordura, com 1 a 10² unidades de NoV detectados, que foram recuperados em 10 g a 30 g de hambúrguer, peru, *roast beef*, *penne*, *tagliatelle* e presunto de *delicatessen*^{114,152,153}.

A primeira descrição detalhada do emprego de metodologias moleculares para esclarecimento de surtos de origem alimentar foi descrita nos EUA a partir da detecção de NoV em presunto contaminado¹¹¹. Metodologias moleculares de transcrição reversa seguidas de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) são utilizadas para detecção e quantificação de NoV. O método quantitativo RT-qPCR, que incorpora uma sonda marcada com

fluorescência ou corante fluorescente especificamente intercalado na mistura de reação, tem sido o mais recomendado devido a sua sensibilidade, especificidade e rapidez¹⁵⁴.

Entretanto, esta metodologia baseada em uma curva padrão requer calibração cuidadosa e oferece quantificação relativa com variações interlaboratoriais¹⁵⁵. Como a detecção de pequenas concentrações virais são a regra para matrizes alimentares, a interpretação dos resultados deve seguir critérios bem estabelecidos¹⁴⁰.

Apesar da sensibilidade, o ensaio molecular apresenta limitações por não fornecer dados de infecciosidade, podendo ser o RNA detectado proveniente de uma partícula viral íntegra ou ser uma molécula residual¹⁵⁶. Recentemente, procedimentos de pré-tratamento e/ou utilização de corantes que se intercalam em RNA e DNA, como o propídio monoazida (PMA) em metodologias moleculares, têm sido utilizados para detecção e determinação de infecciosidade de NoV humano^{157,158}, ocorrendo amplificação apenas dos genomas virais de partículas íntegras, ou seja, infecciosas^{159,160}.

Outra questão importante na detecção de NoV a partir de matrizes alimentares é a utilização de vírus como controle interno de processo. MNV-1, Mengovírus (linhagem MC₀), calicivírus felino (FCV) e bacteriófagos como MS2 e PP7^{148,161} são exemplos de vírus que têm sido utilizados com sucesso^{135,162,163,164,165,166}, sendo os bacteriófagos mais acessíveis para produção em laboratórios de microbiologia de alimentos¹⁶⁷.

Após detecção viral, outra etapa fundamental é a caracterização molecular dos NoV pelo sequenciamento nucleotídico do genoma. O sequenciamento completo da ORF2 que codifica o gene da proteína VP1 do capsídeo viral (1.600 pares de base) é utilizado como padrão para a caracterização molecular de genótipos e estudos filogenéticos⁷¹. Entretanto, o sequenciamento parcial desta região do genoma tem sido utilizado para caracterização rápida dos genótipos pela utilização de iniciadores que têm como alvo regiões menores da ORF2, denominadas C (extremidade 5' da ORF2) e D (extremidade 3' da ORF2)^{168,169,170}.

Para a caracterização molecular de variantes de GII.4, Vega et al.¹⁷¹ desenvolveram um protocolo de amplificação que utiliza iniciadores que têm como alvo a região codificante do subdomínio P2 da proteína VP1 do capsídeo viral, uma vez que grande parte das mutações que diferenciam genótipos e variantes ocorrem nessa região. Atualmente, a caracterização

Tabela. Eficiências de recuperação de NoV em alimentos.

Métodos de concentração viral	Amostras de alimentos	Eficiências médias de recuperação de NoV (%)	Referências
Filtração com membranas carregadas negativamente	Queijo	6,0-56,3	147
	Alface	5,2-72,3	
Filtração com membranas carregadas negativamente	Alface	3,5-32,0	149
Filtração com membranas carregadas negativamente	Alface	0,06-0,67	148
Floculação orgânica	Morango	1,29-41,37	151



molecular dos NoV é facilitada pelo *National Institute for Public Health and the Environment* (RVMI) que disponibiliza a ferramenta *Norovirus Genotyping Tool version 1.0* de genotipagem automática pela inserção de sequências nucleotídicas do genoma nesta plataforma¹⁷².

Em 2013, Especificações Técnicas (TS) desenvolvidas pelo Comitê Europeu de Normalização [(CEN)/TC 275/WG 6] e aprovadas pela Organização Internacional para Padronização (ISO) estabeleceram metodologias padronizadas para detecção de NoV e HAV (ISO/TS 15216-1, 2013 e ISO/TS 15216-2, 2013) em categorias de alimentos de alto risco, representando um avanço significativo para os estudos de virologia de alimentos⁵¹.

Estudos de avaliação de risco

Avaliação de risco microbiano quantitativo (QMRA) tem se tornado uma ferramenta valiosa para caracterizar riscos de doença de origem alimentar associados com patógenos, entretanto, parte considerável dos estudos são relacionados a agentes bacterianos^{173,174,175}. Em relação a NoV, modelos de QMRA foram desenvolvidos para avaliar o risco de NoV em água de consumo¹⁷⁶ e água de recreação^{177,178}. Em alimentos, estudos de QMRA para NoV são limitados e concentrados na contaminação inicial de produção fresca^{179,180,181}.

Uma revisão sobre estudos de avaliação de risco microbiológico em água e segurança de produtos frescos revelou que os vírus apresentaram estimativas de risco mais elevadas em comparação a agentes bacterianos. Vegetais folhosos foram identificados como o produto de maior preocupação, quando comparados com diferentes gêneros alimentícios¹⁸².

No entanto, um estudo realizado por Stals et al.¹¹² apresentou modelo quantitativo de exposição a NoV com foco na transmissão potencial durante a preparação de sanduíches. Eles encontraram que uma única dispersão de NoV por manipulador de alimento poderia causar níveis médios de 43 ± 18 , 81 ± 37 e 18 ± 7 partículas de NoV presentes nos sanduíches, mãos e superfícies de trabalho, respectivamente.

Prevenção e controle

O diagnóstico laboratorial rápido é uma ferramenta importante para direcionar o controle de surtos por NoV pela escolha de práticas de intervenção e controle apropriados, tais como protocolos de limpeza e desinfecção, isolamento, agrupamento de pacientes baseado nos sintomas, exclusão de funcionários sintomáticos ou manipuladores de alimentos ou, em última instância, fechamento de estabelecimentos¹⁸³.

O controle da contaminação de alimentos, água, superfícies ambientais e fômites, assim como a higiene adequada de manipuladores de alimentos é fundamental na redução da transmissão⁶⁵. No caso de manipuladores de alimentos infectados é recomendado o afastamento por no mínimo 3 dias após a resolução dos sintomas. Adultos e crianças infectados devem se manter afastados das atividades escolares e de trabalho pelo mesmo período de tempo e, em caso de surtos, o funcionamento de

estabelecimentos como navios de cruzeiro, *resorts*, acampamentos e restaurantes deve ser interrompido a fim de evitar a exposição de uma nova população de susceptíveis¹⁸⁴. Superfícies contaminadas após episódios de vômito ou diarreia devem ser desinfetadas com solução de hipoclorito a 5%-25% ou 1.000 a 5.000 ppm¹⁸⁵.

A significância clínica crescente de infecções por NoV humano sugere a necessidade de uma vacina eficaz, que promoveria o bloqueio de vias de transmissão particularmente para as populações de alto risco, tais como manipuladores de alimentos, militares, pessoas idosas, crianças e indivíduos imunocomprometidos, melhorando assim a segurança alimentar, saúde pública e biodefesa⁴².

O desenvolvimento de vacinas para NoV tem sido direcionado para expressão de proteínas do capsídeo viral como *virus like particles* (VLPs) em diferentes vetores^{97,186,187}. Uma vacina bivalente de ampla cobertura que utiliza VLPs de um consenso de três variantes de NoVGII.4 em combinação com NoVGI.1 está em fase final de testes pelo grupo Takeda Vacinas^{188,189,190}. Apesar dos avanços obtidos, um dos principais desafios no desenho de vacinas é a grande variabilidade genética destes vírus e a substituição de estirpes pandêmicas em intervalos de tempo curtos, como observado para o vírus da influenza A¹⁹¹.

CONCLUSÕES

Os registros de envolvimento de NoV em surtos de origem alimentar e a crescente diversidade genética destes vírus reforçam a necessidade de vigilância laboratorial e epidemiológica sobretudo nos países em desenvolvimento, como o Brasil, onde não somente a detecção direta de vírus de amostras de alimentos naturalmente contaminados, assim como o diagnóstico, ainda são restritos aos laboratórios de pesquisa. Diferentes metodologias de eluição-concentração apresentam grande variabilidade nas taxas de recuperação viral dificultando a recuperação dos NoV em diferentes matrizes.

O estabelecimento do diagnóstico de NoV nos Laboratórios Centrais dos estados (Amazonas, Bahia, Ceará, Pará, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo) que estão na rota da temporada de cruzeiros pelo Programa Nacional de Fortalecimento da Vigilância Sanitária que atua nos Portos, Aeroportos e Fronteiras, publicado em 6 de dezembro de 2012, representa um grande avanço na capacidade de esclarecimento de surtos no país, facilitado pela edição da norma ISO/TS 15216 (2013) que, padronizando metodologias de concentração e detecção viral, harmoniza o diagnóstico facilitando a criação de uma rede nacional de diagnóstico de NoV que contribua para determinação do real impacto das infecções por NoV no país. Adicionalmente, a evolução rápida e contínua desses vírus requer um sistema de vigilância ativo que identifique genótipos circulantes e prevalentes que possam auxiliar no estabelecimento de uma eventual vacina no país. Neste contexto, é indispensável o estabelecimento de uma rede de vigilância epidemiológica integrada em todo território nacional.



REFERÊNCIAS

1. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, Thornhill TS, Kalica AR, Chanock RM. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol.* 1972;10(5):1075-81.
2. Jiang X, Graham DY, Wang K, Estes MK. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science.* 1990;250(4987):1580-3.
3. Jiang X, Wang M, Wang K, Estes MK. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology.* 1993;195(1):51-61. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1345>
4. Ando T, Mulders MN, Lewis DC, Estes MK, Monroe SS, Glass RI. Comparison of the polymerase region of small round structured virus strains previously classified in three antigenic types by solid-phase immune electron microscopy. *Arch Virol.* 1994;135(1-2):217-26. <https://doi.org/10.1007/BF01309781>
5. Hardy ME, Estes MK. Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes.* 1996;12(3):287-90. <https://doi.org/10.1007/BF00284649>
6. Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(1):15-37. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.1.15-37.2001>
7. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(1):7-15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
8. Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(4):786-814. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x>
9. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(8):725-30. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4)
10. Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):134-64. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14>
11. Duizer E, Kroneman A, Siebenga J, Verhoef L, Vennema H, Koopmans M et al. Typing database for noroviruses. *Eurosurveill.* 2008;13(19):1-2.
12. Yu Y, Cai H, Hu L, Lei R, Pan Y, Yan S, et al. Molecular epidemiology of oyster-related human noroviruses and their global genetic diversity and temporal-geographical distribution from 1983 to 2014. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(21):7615-24. <https://doi.org/10.1128/AEM.01729-15>
13. Tavoschi L, Severi E, Niskanen T, Boelaert F, Rizzi V, Liebana E et al. Food-borne diseases associated with frozen berries consumption: a historical perspective, European Union, 1983 to 2013. *Eurosurveill.* 2015;20(29):21193. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.29.21193>
14. Verhoef L, Hewitt J, Barclay L, Ahmed SM, Lake R, Hall AJ, et al. Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999-2012. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(4):592-9. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141073>
15. Gabbay YB, Siqueira, JAM, Lima ICG, Teixeira DM, Aragão GC, Barbagelata LS, et al. Norovirus outbreak in a cruise ship along the Brazilian coast, March 2011. *Rev Pan-Amaz Saúde.* 2011;5(1):43-51. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232014000100005>
16. 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;4(3):124-9. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9085-x>
17. Bert F, Scaioli G, Gualano MR, Passi S, Specchia ML, Cadeddu C, et al. Norovirus outbreaks on commercial cruise ships: a systematic review and new targets for the public health agenda. *Food Environ Virol.* 2014;6(2):67-74. <https://doi.org/10.1007/s12560-014-9145-5>
18. Morillo SG, Luchs A, Cilli A, Ribeiro CD, Carmona RCC, Timenetsky MCST. Norovirus GII. Pe genotype: tracking a foodborne outbreak on a cruise ship through molecular epidemiology, Brazil, 2014. *Food Environ Virol.* 2017;9(2):142-8. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9272-2>
19. Victoria M, Carvalho-Costa FA, Heinemann MB, Leite JP, 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(7):602-6. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3180618bea>
20. Soares CC, Santos N, Beard RS, Albuquerque MC, Maranhão AG, Rocha LN et al. Norovirus detection and genotyping for children with gastroenteritis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(8):1244-6. <https://doi.org/10.3201/eid1308.070300>
21. Nakagomi T, Correia JB, Nakagomi O, Montenegro FM, Cuevas LE, Cunliffe NA et al. Norovirus infection among children with acute gastroenteritis in Recife, Brazil: disease severity is comparable to rotavirus gastroenteritis. *Arch Virol.* 2008;153(5):957-60. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0060-7>
22. Campos GS, Moreau VH, Bandeira A, Barberino G, Almeida PF, Amador DM et al. Molecular detection and genetic diversity of norovirus in hospitalized young adults with acute gastroenteritis in Bahia, Brazil. *Arch Virol.* 2008;153(6):1125-9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0078-x>
23. Ribeiro LR, Giuberti RS, Barreira DM, Saick KW, Leite JP, Miagostovich MP et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(2):201-6. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000200013>



24. Ferreira MS, Xavier MP, Fumian TM, Victoria M, Oliveira SA, Pena LH et al. Acute gastroenteritis cases associated with noroviruses infection in the state of Rio de Janeiro. *J Med Virol.* 2008;80(2):338-44. <https://doi.org/10.1002/jmv.21059>
25. Andreasi MS, Cardoso D, Fernandes SM, Tozetti IA, Borges AM, Fiaccadori FS et al. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(7):741-4. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000700020>
26. Ferreira MS, Victoria M, Carvalho-Costa FA, Vieira CB, Xavier MP, Fioretti JM et al. Surveillance of norovirus infections in the state of Rio de Janeiro, Brazil 2005-2008. *J Med Virol.* 2010;82(8):1442-8. <https://doi.org/10.1002/jmv.21831>
27. Barreira DM, Ferreira MS, Fumian TM, Checon R, de Sadovsky AD, Leite JP et al. Viral load and genotypes of noroviruses in symptomatic and asymptomatic children in Southeastern Brazil. *J Clin Virol.* 2010;47(1):60-4. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.11.012>
28. Ferreira MS, Cubel Garcia RC, Xavier MP, Ribeiro RL, Assis RM, Mota MC et al. Genotyping of gastroenteric viruses in hospitalised children: first report of norovirus GII.21 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(8):1064-7. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800017>
29. Ferreira MS, Xavier MP, Tinga AC, Rose TL, Fumian TM, Fialho AM et al. 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):e33754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033754>
30. Raboni SM, Damasio GA, Ferreira CE, Pereira LA, Nogueira MB, Vidal LR et al. Acute gastroenteritis and enteric viruses in hospitalised children in southern Brazil: aetiology, seasonality and clinical outcomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(4):428-35. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140066>
31. Oliveira DMM, Souza M, Fiaccadori FS, Santos HCP, Cardoso DDP. Monitoring of Calicivirus among day-care children: evidence of asymptomatic viral excretion and first report of GI.7 Norovirus and GI.3 Sapovirus in Brazil. *J Med Virol.* 2014;86(9):1569-75. <https://doi.org/10.1002/jmv.23791>
32. Amaral MS, Estevam GK, Penatti M, Lafontaine R, Lima IC, Spada PK et al. The prevalence of norovirus, astrovirus and adenovirus infections among hospitalised children with acute gastroenteritis in Porto Velho, state of Rondônia, western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(2):215-21. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140381>
33. Miagostovich MP, Ferreira FF, Guimarães FR, Fumian TM, Diniz-Mendes L, Luz SL et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(2):375-82. <https://doi.org/10.1128/AEM.00944-07>
34. Victoria M, Guimarães FR, Fumian TM, Ferreira FF, Vieira CB, Shubo T et al. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 2010;8(1):158-65. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.012>
35. Prado T, Silva DM, Guilayn WC, Rose TL, Gaspar AM, Miagostovich MP. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Res.* 2011;45(3):1287-97. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.012>
36. Vieira CB, Mendes AC, Guimarães FR, Fumian TM, Leite JP, Gaspar AM et al. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(6):778-84. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000600012>
37. Moresco V, Viancelli A, Nascimento MA, Souza DS, Ramos AP, Garcia LA, et al. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. *Mar Pollut Bull.* 2012;64(1):40-8. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.10.026>
38. Prado T, Guilayn WC, Gaspar AM, Miagostovich MP. The efficiency of concentration methods used to detect enteric viruses in anaerobically digested sludge. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(1):77-83. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100013>
39. Victoria M, Fumian TM, Rocha MS, Dalmao F, Leite JP, Girones R et al. Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. *J Appl Microbiol.* 2014;117(4):1210-18. <https://doi.org/10.1111/jam.12592>
40. Prado T, Gaspar AM, Miagostovich MP. Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods. *Braz J Microbiol.* 2014;45(1):343-9. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100049>
41. Ministério da Saúde (BR), Secretaria da Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. *Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos - VE-DTA.* São Paulo: Ministério da Saúde; 2014.
42. Dicaprio E, Ma Y, Hughes J, Li J. Epidemiology, prevention, and control of the number one foodborne illness: human norovirus. *Infect Dis Clin North Am.* 2013;(27):651-74. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.05.009>
43. Le Guyader FS, Neill FH, Dubois E, Bon F, Loisy F, Kohli E et al. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *Int J Food Microbiol.* 2003;87(1-2):107-12. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00058-8)
44. Li D, Baert L, Xia M, Zhong W, Jiang X, Uyttendaele M. Effects of a variety of food extracts and juices on the specific binding ability of norovirus GII.4 P particles. *J Food Prot.* 2012;75(7):1350-4. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-002>
45. Sobral FR, Campos CJG. Utilização de metodologia ativa no ensino e assistência de enfermagem na produção nacional: revisão integrativa. *Rev Esc Enferm USP.* 2012;46(1):208-18. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342012000100028>



46. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2010.
47. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2016.
48. Forsythe SJ. Microbiology of safe food. 2a ed. Oxford: Willey-Blackwell; 2010.
49. Carmo GMI, Oliveira AA, Dimech CP, Santos DA, Almeida MG, Berto LH et al. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 -2004. Bol Eletr Epidemiol. 2005;5(6):1-7.
50. Cuellar JL, Meinhoevel F, Hoehne M, Donath E. Size and mechanical stability of norovirus capsids depend on pH: a nanoindentation study. J Gen Virol. 2010;91:2449-56. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021212-0>
51. Hennechart-Collette C, Martin-Latil S, Guillier L, Perelle S. Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water. Int J Food Microbiol. 2015;2(202):57-65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.029>
52. Richards GP, Cliver DO, Greening GE. Foodborne viruses. In: Salfinger Y, Tortoello ML. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2nd ed. Washington, DC: American Public Health Association; 2015. Chapter 44.
53. Appleton H. Control of food-borne viruses. Br Med Bull. 2000;56(1):172-83. <https://doi.org/10.1258/0007142001902879>
54. Koopmans M, Bonsdorff CH, Vinjé J, Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. FEMS Microbiol Rev. 2002;26(2):187-205. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00610.x>
55. Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. Int J Food Microbiol. 2004;90(1):23-41. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00169-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00169-7)
56. Bozkurt H, D'Souza DH, Davidson PM. Thermal inactivation kinetics of human norovirus surrogates and hepatitis A virus in turkey deli meat. Appl Environ Microbiol. 2015;14:4850-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.00874-15>
57. Lee M, Seo DJ, Seo J, Oh H, Jeon SB, Ha SD et al. Detection of viable murine norovirus using the plaque assay and propidium-monoazide-combined real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. J Virol Methods. 2015;221:57-61. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.018>
58. Knight A, Haines J, Stals A, Li D, Uyttendaele M, Knight A et al. A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. Int J Food Microbiol. 2016;216:40-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.015>
59. Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, Lopman B. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. Epidemiol Infect. 2010;138(10):1454-8. <https://doi.org/10.1017/S0950268810000439>
60. Nicolay N, McDermott R, Kelly M, Gorby M, Prendergast T, Tuite G et al. Potential role of asymptomatic kitchen food handlers during a food-borne outbreak of norovirus infection, Dublin, Ireland, March 2009. Eurosurveill. 2011;16(30):pii: 19931.
61. Jeong AY, Jeong HS, Lee JS, Park YC, Lee SH, Hwang IG et al. Occurrence of norovirus infections in asymptomatic food handlers in South Korea. J Clin Microbiol. 2013;51(2):598-600. <https://doi.org/10.1128/JCM.01856-12>
62. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multisite outbreak of norovirus associated with a franchise restaurant -Kent County, Michigan, May 2005. MMWR. 2006;55(14):395-7.
63. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Codex Alimentarius. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses on food. Rome: FAO; 2012[acesso 31 jan 2016]. (CAC/GL 79-2012). Disponível em: http://www.codexalimentarius.org/download/standards/13215/CXG_079e.pdf
64. Grove SF, Lee A, Lewis T, Stewart CM, Chen H, Hoover DG. Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes. J Food Prot. 2006;69(4):957-68. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.4.957>
65. Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. N Engl J Med. 2009;361(18):1776-85. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804575>
66. Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, Clarke IN. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. Science. 1993;259(5094):516-9. <https://doi.org/10.1126/science.8380940>
67. Stals A, Mathijs E, Baert L, Botteldoorn N, Denayer S, Mauroy A et al. Molecular detection and genotyping of noroviruses. Food Environ Virol. 2012;4(4):153-67. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9092-y>
68. Gao Z, Liu B, Huo D, Yan H, Jia L, Du Y et al. Increased norovirus activity was associated with a novel norovirus GII.17 variant in Beijing, China during winter 2014-2015. BMC Infect Dis. 2015;15(1):574. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1315-z>
69. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology 2006;346(2):312-23. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.015>
70. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. J Clin Microbiol. 2015;53(2):373-81. <https://doi.org/10.1128/JCM.01535-14>
71. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G et al. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. Arch Virol. 2013;158(10):2059-68. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1708-5>
72. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007. J Infect Dis. 2009;200(5):802-12. <https://doi.org/10.1086/605127>



73. Han J, Ji L, Shen Y, Wu X, Xu D, Chen L. Emergence and predominance of norovirus GII.17 in Huzhou, China, 2014-2015. *Virol J.* 2015;12(1):139. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0370-9>
74. Bull RA, Hansman GS, Clancy LE, Tanaka MM, Rawlinson WD, White PA. Norovirus recombination in ORF1/ORF2 overlap. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(7):1079-85. <https://doi.org/10.3201/eid1107.041273>
75. Chhabra P, Walimbe AM, Chitambar SD. Molecular characterization of three novel intergenotype norovirus GII recombinant strains from western India. *Virus Res.* 2010;147(2):242-6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.11.007>
76. Mahar JE, Kirkwood CD. Characterization of norovirus strains in Australian children from 2006 to 2008: prevalence of recombinant strains. *J Med Virol.* 2011;83(12):2213-9. <https://doi.org/10.1002/jmv.22215>
77. Fumian TM, Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, Siqueira JA, Soares LS, et al. Detection of a novel recombinant strain of norovirus in an African-descendant community from the Amazon region of Brazil in 2008. *Arch Virol.* 2012;157(12):2389-92. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1428-2>
78. Arana A, Cilla G, Montes M, Gomariz M, Pérez-Trallero E. Genotypes, recombinant forms, and variants of norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009-2012. *PLoS One.* 2014;9(6):e98875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098875>
79. White PA. Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(8):741-5. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12746>
80. Hernandez J, Silva LD, Sousa Junior EC, Lucena MS, Soares LS, Mascarenhas JD et al. Analysis of uncommon norovirus recombinants from Manaus, Amazon region, Brazil: GII.P22/GII.5, GII.P7/GII.6 and GII.Pg/GII.1. *Infect Genet Evol.* 2016;39:365-71. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.007>
81. Vinjé J, Green J, Lewis DC, Gallimore CI, Brown DW, Koopmans MP. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Arch Virol.* 2000;145(2):223-41. <https://doi.org/10.1007/s007050050020>
82. Andrade JS, Rocha MS, Carvalho-Costa FA, Fioretti JM, Xavier MP, Nunes ZM et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.024>
83. Fioretti JM, Ferreira MS, Victoria M, Vieira CB, Xavier MP, Leite JP et al. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(8):942-47. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000800008>
84. Fioretti JM, Bello G, Rocha MS, Victoria M, Leite JP, Miagostovich MP. Temporal dynamics of norovirus GII.4 variants in Brazil between 2004 and 2012. *PLoS One.* 2014;9(3):e92988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092988>
85. Fumian TM, Leite JP, Rocha MS, Andrade JS, Fioretti JM, Assis RM et al. 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;(228):123-9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.11.008>
86. Siqueira JA, Bandeira RS, Justino MC, Linhares AC, Gabbay YB. Characterization of novel intragenotype recombination events among norovirus pandemic GII.4 variants. *Infect Genet Evol.* 2016;(44):361-6. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.07.037>
87. Lopman B, Gastañaduy P, Park GW, Hall AJ, Parashar UD, Vinjé J. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Curr Opin Virol.* 2012;2(1):96-102. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.11.005>
88. Repp KK, Keene WE. A point-source norovirus outbreak caused by exposure to fomites. *J Infect Dis.* 2012;205(11):1639-41. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis250>
89. Petrignani M, Beek J, Borsboom G, Richardus JH, Koopmans M. Norovirus introduction routes into nursing homes and risk factors for spread: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Hosp Infect.* 2015;89(3):163-78. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.015>
90. Hall AJ, Wikswo ME, Pringle K, Gould LH, Parashar UD. Vital signs: foodborne norovirus outbreaks - United States, 2009-2012. *MMWR.* 2014;63(22):491-5.
91. Vivancos R, Keenan A, Sopwith W, Smith K, Quigley C, Mutton K et al. Norovirus outbreak in a cruise ship sailing around the British Isles: investigation and multi-agency management of an international outbreak. *J Infect.* 2010;60(6):478-85. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.03.018>
92. Ramani S, Atmar RL, Estes MK. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014;30(1):25-33. <https://doi.org/10.1097/MOG.000000000000022>
93. Hirneisen KA, Kniel KE. Comparing human norovirus surrogates: murine norovirus and Tulane virus. *J Food Prot.* 2013;(76):139-43. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-216>
94. Wang Q, Hirneisen KA, Markland SM, Kniel KE. Survival of murine norovirus, Tulane virus, and hepatitis A virus on alfalfa seeds and sprouts during storage and germination. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(22):7021-27. <https://doi.org/10.1128/AEM.01704-13>
95. Baert L, Uyttendaele M, Stals A, VAN Coillie E, Dierick K, Debevere J et al. Reported foodborne outbreaks due to noroviruses in Belgium: the link between food and patient investigations in an international context. *Epidemiol Infect.* 2009;137(3):316-25. <https://doi.org/10.1017/S0950268808001830>



96. Dolin R, Blacklow NR, DuPont H, Buscho RF, Wyatt RG, Kasel JA et al. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1972;140:578-83. <https://doi.org/10.3181/00379727-140-36508>
97. Green KY. *Caliciviridae: the noroviruses.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers PA;2007.
98. Mormann S, Dabisch M, Becker B. Effects of technological processes on the tenacity and inactivation of norovirus genogroup II in experimentally contaminated foods. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(2):536-45. <https://doi.org/10.1128/AEM.01797-09>
99. Kingsley DH. High pressure processing and its application to the challenge of virus-contaminated foods. *Food Environ Virol.* 2013;5(1):1-12. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9094-9>
100. Baert L, Debevere J, Uyttendaele M. The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *Int J Food Microbiol.* 2009;131(2-3):83-94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.007>
101. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW 4th. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol.* 2006;80(11):5104-12. <https://doi.org/10.1128/JVI.02346-05>
102. Takahashi M, Takahashi H, Kuda T, Kimura B. Viability and heat resistance of murine norovirus on bread. *Int J Food Microbiol.* 2016;216:127-31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.018>
103. Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, Poel WH, Duijnhoven YT, Roda Husman AM. Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. *J Food Prot.* 2006;69(8):1949-56. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.8.1949>
104. Farkas T, Sestak K, Wei C, Jiang X. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J Virol.* 2008;82(11):5408-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.00070-08>
105. Matthews JE, Dickey BW, Miller RD, Felzer JR, Dawson BP, Lee AS et al. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiol Infect.* 2012;140(7):1161-72. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000234>
106. Xerry J, Gallimore CI, Iturriza-Gómara M, Gray JJ. Tracking the transmission routes of genogroup II noroviruses in suspected food-borne or environmental outbreaks of gastroenteritis through sequence analysis of the P2 domain. *J Med Virol.* 2009;81(7):1298-304. <https://doi.org/10.1002/jmv.21517>
107. Anderson AD, Garrett VD, Sobel J, Monroe SS, Fankhauser RL, Schwab KJ et al. Multistate outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis associated with a common caterer. *Am J Epidemiol.* 2001;154(11):1013-19. <https://doi.org/10.1093/aje/154.11.1013>
108. Grove SF, Suriyanarayanan A, Puli B, Zhao H, Li M, Li D et al. Norovirus cross-contamination during preparation of fresh produce. *Int J Food Microbiol.* 2015;198:43-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.023>
109. Sair AI, D'Souza DH, Moe CL, Jaykus LA. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J Virol Methods.* 2002;100(1-2):57-69. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00397-4](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00397-4)
110. Posada-Izquierdo GD, Pérez-Rodríguez F, López-Gálvez F, Allende A, Gil MI, Zurera G. Modeling growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut lettuce treated with neutral electrolyzed water and under modified atmosphere packaging. *Int J Food Microbiol.* 2014;177(2):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.025>
111. Daniels NA, Bergmire-Sweat DA, Schwab KJ, Hendricks KA, Reddy S, Rowe SM et al. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *J Infect Dis.* 2000;181(4):1467-70. <https://doi.org/10.1086/315365>
112. Stals A, Jacxsens L, Baert L, Van Coillie E, Uyttendaele M. A quantitative exposure model simulating human norovirus transmission during preparation of deli sandwiches. *Int J Food Microbiol.* 2015;196:126-36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.004>
113. Kobayashi S, Natori K, Takeda N, Sakae K. Immunomagnetic capture rt-PCR for detection of norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol Immunol.* 2004;48(3):201-4. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2004.tb03506.x>
114. Baert L, Uyttendaele M, Debevere J. Evaluation of viral extraction methods on a broad range of Ready-To-Eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *Int J Food Microbiol.* 2008;123(1-2):101-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.020>
115. Doyle MP, Erickson MC. Summer meeting 2007: the problems with fresh produce: an overview. *J Appl Microbiol.* 2008;105:317-30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03746.x>
116. Heaton JC, Jones K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J Appl Microbiol.* 2008;104(3):613-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x>
117. Sarvikivi E, Roivainen M, Maunula L, Niskanen T, Korhonen T, Lappalainen M et al. Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. *Epidemiol Infect.* 2012;140(2):260-7. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000379>
118. El-Senousy WM, Costafreda MI, Pintó RM, Bosch A. Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce. *Int J Food Microbiol.* 2013;167(1):74-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.023>



119. Dicaprio E, Ma Y, Purgianto A, Hughes J, Li J. Internalization and dissemination of human norovirus and animal caliciviruses in hydroponically grown romaine lettuce. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(17):6143-52. <https://doi.org/10.1128/AEM.01081-12>
120. Erickson MC. Internalization of fresh produce by foodborne pathogens. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012;3(1):283-310. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101211>
121. Jaykus LA, Escudero-Abarca B. Human pathogenic viruses in food. In: Juneja VK, Sofos JN, editors. *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions.* Washington DC: ASM Press; 2010. p. 218-32.
122. Li J, Predmore A, Divers E, Lou F. New interventions against human norovirus: progress, opportunities, and challenges. *Annu Rev Food Sci Technol* 2012;3:331-52. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101234>
123. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 2015;13(1):3991. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
124. Carducci A, Caponi E, Ciurli A, Verani M. Possible internalization of an enterovirus in hydroponically grown lettuce. *Int J Environ Res Public Health.* 2015;12(7):8214-27. <https://doi.org/10.3390/ijerph120708214>
125. Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S et al. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):3878-82. <https://doi.org/10.1128/JCM.01327-06>
126. Burkhardt W 3rd, Calci KR. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(4):1375-8. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1375-1378.2000>
127. Le Guyader FS, Atmar RL, Le Pendu J. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Curr Opin Virol.* 2012;2(1):103-10. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.029>
128. Alfano-Sobsey E, Sweat D, Hall A, Breedlove F, Rodriguez R, Greene S et al. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol Infect.* 2012;140(2):276-82. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000665>
129. Webby RJ, Carville KS, Kirk MD, Greening G, Ratcliff RM, Crerar SK et al. Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia. *Clin Infect Dis.* 2007;44(8):1026-31. <https://doi.org/10.1086/512807>
130. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Notes from the field: norovirus infections associated with frozen raw oysters - Washington, 2011. *MMWR.* 2012;61(6):110.
131. Terio V, Martella V, Moschidou P, Di Pinto P, Tantillo G, Buonavoglia C. Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiol.* 2010;27(1):29-32. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.005>
132. DePaola A, Jones JL, Woods J, Burkhardt W 3rd, Calci KR, Krantz JA et al. Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(9):2754-68. <https://doi.org/10.1128/AEM.02590-09>
133. Souza DS, Piazza RS, Pilotto MR, Nascimento MA, Moresco V, Taniguchi S et al. Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. *Int J Food Microbiol.* 2013;167(3):337-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.019>
134. Lowther JA, Gustar NE, Powell AL, Hartnell RE, Lees DN. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(16):5812-7. <https://doi.org/10.1128/AEM.01046-12>
135. Baker K, Morris J, McCarthy N, Saldana L, Lowther J, Collinson A et al. An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant, February 2010. *J Public Health (Oxf).* 2011;33(2):205-11. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdq089>
136. Souza DS, Ramos AP, Nunes FF, Moresco V, Taniguchi S, Leal DA et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012;76(2):153-61. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.018>
137. Stals A, Baert L, De Keuckelaere A, Van Coillie E, Uyttendaele M. Evaluation of a norovirus detection methodology for ready-to-eat foods. *Int J Food Microbiol.* 2011;145(2-3):420-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.013>
138. Malek M, Barzilay E, Kramer A, Camp B, Jaykus LA, Escudero-Abarca B et al. Outbreak of norovirus infection among river rafters associated with packaged delicatessen meat, Grand Canyon, 2005. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):31-7. <https://doi.org/10.1086/594118>
139. Aragão GC, Mascarenhas JD, Kaiano JH, de Lucena MS, Siqueira JA, Fumian TM et al. Norovirus diversity in diarrheic children from an African-descendant settlement in Belém, Northern Brazil. *PLoS One.* 2013;8(2):e56608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056608>
140. Moore MD, Goulter RM, Jaykus LA. Human norovirus as a foodborne pathogen: challenges and developments. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2015;6(1):411-33. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015643>
141. Baert L, Mattison K, Loisy-Hamon F, Harlow J, Martyres A, Lebeau B et al. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? *Int J Food Microbiol.* 2011;151(3):261-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.013>



142. Boxman IL, Verhoef L, Dijkman R, Hägele G, Te Loeke NA, Koopmans M. Year-round prevalence of norovirus in the environment of catering companies without a recently reported outbreak of gastroenteritis. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(9):2968-74. <https://doi.org/10.1128/AEM.02354-10>
143. Schwab KJ, McDevitt JJ. Development of a PCR-enzyme immunoassay oligoprobe detection method for *Toxoplasma gondii* oocysts, incorporating PCR controls. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(10):5819-25. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5819-5825.2003>
144. Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396(6):1977-90. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3150-9>
145. Summa M, von Bonsdorff CH, Maunula L. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. *J Virol Methods.* 2012;183(2):154-60. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.04.006>
146. Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(3):1033-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1033-1039.2002>
147. Fumian TM, Leite JP, Marin VA, Miagostovich MP. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. *J Virol Methods.* 2009;155(1):39-43. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.026>
148. Brandão ML, Almeida DO, Bispo FC, Bricio SM, Marin VA, Miagostovich MP. Assessment of microbiological contamination of fresh, minimally processed, and ready-to-eat lettuces (*Lactuca sativa*), Rio de Janeiro State, Brazil. *J Food Sci.* 2014;79(5):M961-6. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12459>
149. Corrêa AA, Miagostovich MP. Optimization of an adsorption-elution method with a negatively charged membrane to recover norovirus from lettuce. *Food Environ. Virol* 2013;5(3):144-9. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9113-5>
150. Calgua B, Mengewein A, Grunert A, Bofill-Mas S, Clemente-Casares P, Hundesa A et al. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *J Virol Methods.* 2008;153(2):79-83. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.08.003>
151. Melgaço FG, Victoria M, Corrêa AA, Ganime AC, Malta FC, Brandão ML et al. Virus recovering from strawberries: evaluation of a skimmed milk organic flocculation method for assessment of microbiological contamination. *Int J Food Microbiol.* 2016;217:14-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.005>
152. Schwab KJ, Neill FH, Fankhauser RL, Daniels NA, Monroe SS, Bergmire-Sweat DA et al. Development of methods to detect "Norwalk-like viruses" (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: application to a food-borne NLV outbreak. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(1):213-8. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.213-218.2000>
153. Boxman IL, Tilburg JJ, te Loeke NA, Vennema H, Boer E, Koopmans M. An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *J Food Prot.* 2007;70(2):504-8. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.504>
154. Höhne M, Schreier E. Detection and characterization of norovirus outbreaks in Germany: application of a one-tube RT-PCR using a fluorogenic real-time detection system. *J Med Virol.* 2004;72(2):312-9. <https://doi.org/10.1002/jmv.10573>
155. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech.* 2004;15(3):155-66.
156. Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect.* 2004;58(1):42-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.04.021>
157. Knight A, Li D, Uyttendaele M, Jaykus LA. A critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity. *Crit Rev Microbiol.* 2013;39(3):295-309. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.709820>
158. Escudero-Abarca BI, Suh SH, Moore MD, Dwivedi HP, Jaykus LA. Selection, characterization and application of nucleic acid aptamers for the capture and detection of human norovirus strains. *PLoS One.* 2014;9(9):e106805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106805>
159. Prevost B, Lucas FS, Ambert-Balay K, Pothier P, Moulin L, Wurtzer S. Deciphering the diversities of astroviruses and noroviruses in wastewater treatment plant effluents by a high-throughput sequencing method. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(20):7215-22. <https://doi.org/10.1128/AEM.02076-15>
160. Sánchez G, Elizaquível P, Aznar R. A single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables. *Int J Food Microbiol.* 2012;152(1-2):9-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.002>
161. Bae J, Schwab KJ. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(2):477-84. <https://doi.org/10.1128/AEM.02095-06>
162. Hennechart-Collette C, Martin-Latil S, Guillier L, Perelle S. Multiplex real-time RT-qPCR for the detection of Norovirus in bottled and tap water using murine norovirus as a process control. *J Appl Microbiol.* 2014;116(1):179-90. <https://doi.org/10.1111/jam.12345>
163. Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Guillier L, Perelle S. Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control. *Int J Food Microbiol.* 2012;157(2):167-73. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.001>



164. Stals A, Baert L, Van Coillie E, Uyttendaele M. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. *Food Microbiol.* 2011;28(1):52-8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.004>
165. Costafreda MI, Bosch A, Pintó RM. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):3846-55. <https://doi.org/10.1128/AEM.02660-05>
166. Uhrbrand K, Myrmet M, Maunula L, Vainio K, Trebbien R, Nørrung B et al. Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *J Virol Methods.* 2010;169(1):70-8. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.06.019>
167. 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;41(7):1411-22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.12.034>
168. Noel JS, Ando T, Leite JP, Green KY, Dingle KE, Estes MK et al. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J Med Virol.* 1997;53(4):372-83. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199712\)53:4<372::AID-JMV10>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199712)53:4<372::AID-JMV10>3.0.CO;2-H)
169. Kojima S, Kageyama T, Fukushi S, Hoshino FB, Shinohara M, Uchida K et al. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods.* 2002;100(1-2):107-14. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00404-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00404-9)
170. Vinjé 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 Methods.* 2004;116(2):109-17. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.001>
171. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Williams K, Lee D, Vinjé J. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(8):1389-95.
172. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H, Peñaranda S, Oberste MS et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol.* 2011;51(2):121-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.03.006>
173. Franz E, Tromp SO, Rijgersberg H, Fels-Klerx HJ. Quantitative microbial risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7, salmonella, and *Listeria monocytogenes* in leafy green vegetables consumed at salad bars. *J Food Prot.* 2010;73(2):274-85. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.2.274>
174. Carrasco E, Pérez-Rodríguez F, Valero A, Garcia-Gimeno R, Zurera G. Risk assessment and management of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat lettuce salads. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2010;9(5):498-512. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00123.x>
175. Sant'Ana AS, Franco BD, Schaffner DW. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. *Food Control.* 2014;42:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.028>
176. Aström J, Petterson S, Bergstedt O, Pettersson TJ, Stenström TA. Evaluation of the microbial risk reduction due to selective closure of the raw water intake before drinking water treatment. *J Water Health.* 2007;5 Suppl 1:81-97. <https://doi.org/10.2166/wh.2007.139>
177. Schoen ME, Ashbolt NJ. Assessing pathogen risk to swimmers at non-sewage impacted recreational beaches. *Environ Sci Technol.* 2010;44(7):2286-91. <https://doi.org/10.1021/es903523q>
178. Soller JA, Schoen ME, Bartrand T, Ravenscroft JE, Ashbolt NJ. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. *Water Res* 2010;44(16):4674-91. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.049>
179. Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(5):3284-90. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3284-3290.2006>
180. Mara D, Sleight A. Estimation of norovirus infection risks to consumers of wastewater-irrigated food crops eaten raw. *J Water Health.* 2010;8(1):39-43. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.140>
181. Kotwal G, Cannon J. Norovirus cross-contamination associated with bare hands and gloves during produce handling. In: IAFP 2013 Annual Meeting; 29-31 jul 2013[acesso 8 dez 2014]; Des Moines, USA. Disponível em: <https://iafp.confex.com/iafp/2013/webprogram/Paper4776.html>
182. De Keuckelaere A, Li D, Deliens B, Stals A, Uyttendaele M. Batch testing for noroviruses in frozen raspberries. *Int J Food Microbiol.* 2015;192:43-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.024>
183. Barclay L, Park GW, Vega E, Hall A, Parashar U, Vinjé J et al. Infection control for norovirus. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(8):731-40. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12674>
184. Patel MM, Hall AJ, Vinjé J, Parashar UD. Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol.* 2009;44(1):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.10.009>
185. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 2008. *MMWR.* 2011;60(35):1197-202.
186. Zhang X, Buehner NA, Hutson AM, Estes MK, Mason HS. Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol J.* 2006;4(4):419-32. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00191.x>



187. El-Kamary SS, Pasetti MF, Mendelman PM, Frey SE, Bernstein DI, Treanor JJ et al. Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibody-secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues. *J Infect Dis.* 2010;202(11):1649-58. <https://doi.org/10.1086/657087>
188. Atmar RL, Bernstein DI, Harro CD, Al-Ibrahim MS, Chen WH, Ferreira J, et al. Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *N Engl J Med.* 2011;365(23):2178-87. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1101245>
189. Treanor JJ, Atmar RL, Frey SE, Gormley R, Chen WH, Ferreira J, et al. A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate - reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults. *J Infect Dis.* 2014;210(11):1763-71. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu337>
190. Bernstein DI, Atmar RL, Lyon GM, Treanor JJ, Chen WH, Jiang X et al. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults. *J Infect Dis.* 2015;211(6):870-8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu497>
191. Vinjé J. A norovirus vaccine on the horizon? *J Infect Dis.* 2010;202(11):1623-5. <https://doi.org/10.1086/657088>

Agradecimentos

MPM (Produtividade em Pesquisa) e ISL (Programa de Pós-doutoramento) são bolsistas CNPq e Capes, respectivamente. Esta revisão está no âmbito das atividades da Fiocruz como Centro Colaborador da OPAS/OMS em Saúde Pública e Ambiental. Os autores informam nenhum conflito de interesse. O uso de nomes comerciais nesta publicação não consiste em endosso de produtos comerciais.

Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Esta publicação está sob a licença Creative Commons Atribuição 3.0 não Adaptada.

Para ver uma cópia desta licença, visite http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt_BR.