



Deteção de norovírus e vírus da hepatite A em géneros alimentícios

Detection of norovirus and hepatitis A virus in foodstuffs

Anabela Coelho, Rosália Furtado, Cristina Belo Correia, Margarida Saraiva, Maria Antónia Calhau

anabela.coelho@insa.min-saude.pt

Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa/Porto, Portugal.

_Resumo

Em 2014, os dados reportados para a *European Food Safety Authority* (EFSA), evidenciam que o número de surtos causado por vírus foi superior ao causado por *Salmonella* spp. contudo, em 2015, este número diminuiu. A nível mundial e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), entre 2007 e 2015 os vírus foram os principais agentes causais de doenças diarreicas. Com o objetivo de incrementar a sua capacidade de resposta no esclarecimento de surtos de toxinfecção alimentar bem como na vigilância, monitorização e controlo de géneros alimentícios, o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) implementou em 2015 o método de deteção de Norovírus (NoV) genogrupos GI e GII e vírus da Hepatite A (HAV) de acordo com a ISO/TS 15216-2. As amostras analisadas em 2015-2016 incluíram moluscos bivalves, frutos vermelhos, vegetais e superfícies do ambiente de produção/manipulação de alimentos. Em amostras dos moluscos bivalves não depurados foram detetados NoV GI e GII. Surtos de origem alimentar de NoV e HAV são um problema emergente em saúde pública, pelo que as estratégias de controlo deverão orientar-se essencialmente para a vigilância e prevenção da contaminação dos géneros alimentícios mais suscetíveis, identificando e minimizando o impacto dos diversos fatores de risco inerentes ao ambiente de produção, preparação, conservação, distribuição e consumo.

_Abstract

In 2014 the data reported to *European Food Safety Authority* (EFSA), evidenced that the number of foodborne outbreaks caused by viruses was higher than those caused by *Salmonella* spp., but in 2015 this number decreased. At global level and according to the *World Health Organization* (WHO), between 2007 and 2015 viruses were the main diarrhoeal diseases agents. With the objective to contribute to the clarification of foodborne outbreaks of viral origin associated to foodstuffs consumption and to enhance the laboratory capacity, the *Food Microbiology Laboratory of the Food and Nutrition Department*, implemented in 2015 the method for detection of *Norovirus* (NoV) Genogroup I and II and *Hepatitis A Virus* (HAV) according to ISO/TS 15216-2. The samples analysed included bivalve molluscs, soft fruits, vegetables and surfaces of the environment of production/handling of foodstuffs. In samples of bivalve molluscs, not depurated, *Norovirus* GI and GII were detected. Foodborne outbreaks caused by NoV and HAV are a public health emerging problem, and so the control strategies should be oriented essentially to the surveillance and prevention of the contamination of more susceptible foodstuffs, identifying and minimizing the impact of several risk factors inherent to the environment of production, preparation, conservation, distribution and consumption.

_Introdução

O estudo da etiologia das doenças de origem alimentar é complexo, uma vez que apenas uma parte dos casos de doença são reportados às Autoridades de Saúde e muitas das doenças, resultantes da ingestão de um alimento contaminado, podem surgir semanas ou até meses após o consumo do(s) alimento(s), dificultando quer o estabelecimento de umnexo de causalidade alimento-doença, quer a investigação epidemiológica.

No âmbito dos contaminantes biológicos e, em particular, no caso dos vírus, as suas características estruturais e biológicas, a dose infetante, o modo de transmissão, a persistência no ambiente, entre outras, são muito diferentes das dos outros microrganismos habitualmente implicados em surtos de toxinfecções alimentares, dificultando ainda mais a investigação do surto e a identificação do agente causal (1-3).

Em 2008, estudos de avaliação de risco realizados por peritos da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), referem que o conhecimento da fonte de contaminação é fundamental para definir estratégias de intervenção (2, 3).

Analisando os dados relativos aos surtos de origem alimentar associados a vírus, reportados para a *European Food Safety Authority* (EFSA), verifica-se que o número de surtos foi muito variável entre 2008 e 2014. Em 2009, foram reportados 1 043 surtos, tendo este número decrescido progressivamente até 2011. A partir de 2011 ocorreu um aumento de 525 para 1 072 surtos em 2014 e, em 2015, voltou a descer para 401 surtos. O número de casos associados a surtos por vírus (14 754) correspondeu a 36,8% dos casos associados a surtos. De referir que em 2015, em 45 destes surtos a evidência foi forte, isto é, foi identificado o alimento específico implicado, responsável



artigos breves_ n. 10

pelo surto. Relativamente ao alimento implicado, os “crustáceos, moluscos bivalves e produtos derivados” foram o veículo alimentar mais frequente (27,8%) e o “manipulador infetado”, “contaminação cruzada” e “ingrediente contaminado não processado”, foram os fatores contributivos associados a estes surtos (4).

De acordo com o relatório da OMS publicado em 2015, relativo ao impacto das doenças de origem alimentar em saúde pública, entre 2007 e 2015 os vírus são os principais agentes causais de doenças diarreicas, com ampla distribuição em todo o mundo. Na Europa, destaca-se como agente mais frequente o Norovírus (NoV) responsável por cerca de 15 milhões de casos de doença (5).

Norovírus (NoV) e Vírus da Hepatite A (HAV) são microrganismos altamente contagiosos, transmitidos habitualmente pela via fecal-oral, no contacto pessoa a pessoa (via mais comum), através de água contaminada (de consumo ou de recreio), do consumo de alimentos crus contaminados ou alimentos insuficientemente cozinhados e/ou alimentos que se contaminaram pelo contacto com superfícies do ambiente de produção alimentar ou a partir de manipuladores infetados.

Em comparação com as formas vegetativas da maioria das bactérias patogénicas, os NoV e os HAV evidenciam uma estabilidade elevada, sendo mais resistentes ao calor, à refrigeração, à congelação, à desidratação, a valores de pH extremos, à luz ultravioleta, a pressão hidrostática elevada e aos agentes

desinfetantes, sobretudo em presença de matéria orgânica. Esta resistência, aliada a uma baixa dose infetante, leva a que possam persistir durante longos períodos (dias a semanas) como contaminantes de um género alimentício e com capacidade para causar doença (3, 6).

Apesar da via de transmissão pessoa a pessoa ser a mais comum, estudos de avaliação do risco efetuados pela OMS, evidenciam a existência de associações bem definidas entre alguns géneros alimentícios e as fontes de contaminação mais frequentemente associadas à transmissão de NoV e HAV por via alimentar (tabela 1).

_Objetivo

No sentido de contribuir para o esclarecimento de surtos de tox infeção alimentar de origem viral associados ao consumo de géneros alimentícios e incrementar a sua capacidade de resposta ao controlo e monitorização, o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) implementou em 2015 o método de deteção de Norovírus genogrupos GI e genogrupos GII e vírus da Hepatite A, de acordo com a ISO/TS 15216-2:2013 (14). Este método foi sujeito a auditoria pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), para acreditação segundo o referencial normativo ISO/IEC 17025:2005 (15), aguardando-se a emissão do Anexo técnico. Apresentam-se os dados obtidos nos ensaios realizados em 2015-2016.

Tabela 1: ⚡ Géneros alimentícios, fonte e local de contaminação mais frequentemente associados à transmissão de NoV e HAV (3, 6-13).

Géneros alimentício	Fonte de contaminação	Local de contaminação
Moluscos bivalves (ostras, amêijoas, berbigões e mexilhões)	Contaminação ambiental, a partir da contaminação por esgotos	Zonas de apanha e cultivo
Frutos e produtos hortícolas consumidos crus (frutos vermelhos e vegetais de folhas verdes)	Água de rega Fertilizantes não tratados Contacto com animais da quinta, domésticos ou selvagens Manipuladores infetados	Fase pré-colheita Fase da colheita Fase pós-colheita
Alimentos prontos para consumo	Superfícies contaminadas (contaminações cruzadas) Tratamento térmico insuficiente	Preparação Distribuição

_Material e métodos

Em 2015 e 2016 foram analisadas 69 amostras para pesquisa de Norovírus genogrupo GI e genogrupo GII e vírus da Hepatite A. As amostras analisadas incluíram moluscos bivalves, frutos vermelhos, vegetais e superfícies do ambiente de produção/manipulação de alimentos. As amostras de géneros alimentícios foram recolhidas em superfícies comerciais, diretamente no produtor ou no local de consumo. Algumas amostras foram analisadas no âmbito do esclarecimento de surtos de toxinfecção alimentar.

Dado que habitualmente os vírus estão presentes nas matrizes alimentares em número muito baixo e que estas podem conter substâncias que interferem com os métodos de deteção, é necessário efetuar previamente um procedimento de extração e/ou concentração das partículas virais (específico para cada matriz alimentar) para obter extratos livres das substâncias inibidoras e que vão servir de substrato para o procedimento de deteção do RNA viral. A eficiência da extração é avaliada pela contaminação das amostras com um vírus sintético de controlo (ex. vírus Mengo), com características físicas e químicas semelhantes ao vírus alvo, mas geneticamente distinto e pela sua extração em simultâneo (2, 14).

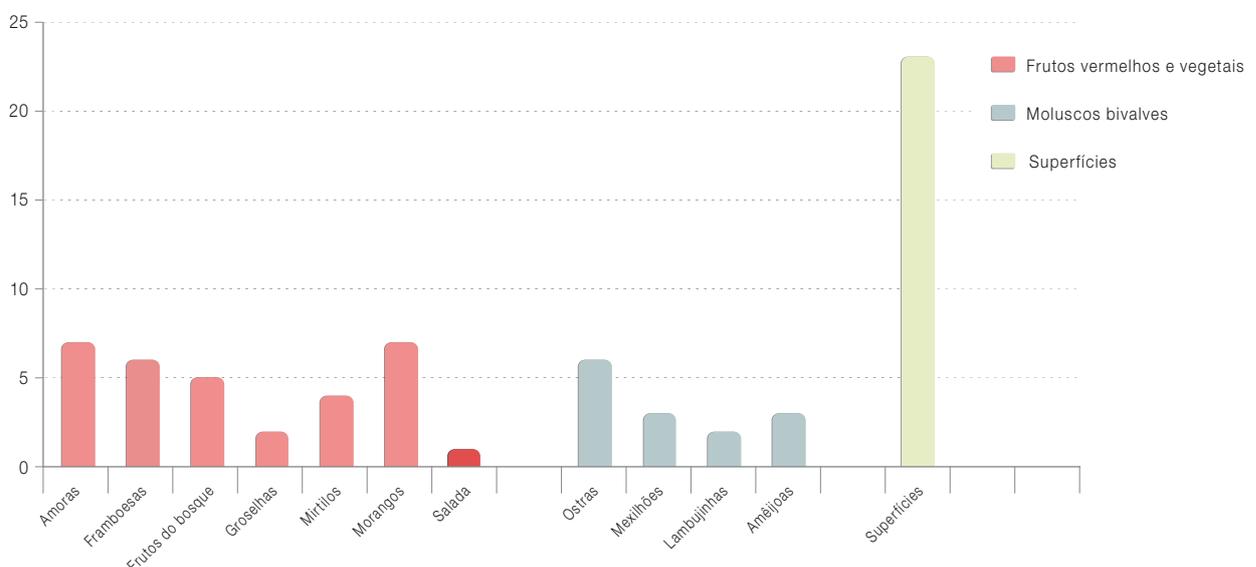
Nos frutos vermelhos e vegetais, a extração dos vírus foi efetuada por eluição com agitação, seguida de concentração por precipitação com solução de Polietilenoglicol e Cloreto de Sódio (PEG/NaCl). Nos moluscos bivalves, onde o tecido digestivo representa cerca de 1/10 do peso total do animal, a extração dos vírus das glândulas digestivas foi efetuada pela ação de digestão enzimática da proteinase K. Nas superfícies, os vírus foram removidos por esfregaço, seguido de eluição em solução tampão (2, 14).

Reação de transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real foi efetuada no equipamento *Applied 7500 Fast Real Time PCR System*.

_Resultados e discussão

As 69 amostras analisadas incluíam: 32 frutos vermelhos/vegetais (1 amostra suspeita de estar implicada num surto de toxinfecção alimentar), 14 moluscos bivalves (2 amostras suspeitas de estarem implicadas num surto de toxinfecção alimentar) e 23 superfícies (relacionadas com a investigação de 3 surtos de toxinfecção alimentar). O total de amostras de géneros alimentícios e os tipos de matrizes analisados estão ilustrados no gráfico 1.

Gráfico 1: Amostras de géneros alimentícios (n=69) e tipos de matrizes.



artigos breves_ n. 10

Gráfico 2 Resultados da deteção de Norovírus GI e GII em géneros alimentícios e em esfregaços de superfícies (n=69).



Os resultados obtidos referentes à deteção de NoV GI e NoV GII, estão ilustrados no gráfico 2.

Nos moluscos bivalves foram detetados Norovírus dos grupos GI e GII em 29% das amostras (4/14), todas correspondentes a moluscos que não tinham sido depurados. Destas 4 amostras, 2 correspondiam a ostras colhidas diretamente de uma zona estuarina e 2 a amêijoas colhidas no âmbito do esclarecimento de um surto de toxinfecção alimentar. Nas amostras de frutos vermelhos e vegetais e nas de superfícies não foram detetados Norovírus GI e GII.

No total das 69 amostras analisadas não foi detetada a presença do Vírus da Hepatite A.

Conclusões

Apesar de todos os avanços tecnológicos, concretamente a nível das indústrias do setor alimentar, o risco potencial de aquisição e consumo de determinados géneros alimentícios (molusco bivalves, frutos vermelhos e vegetais e alimentos prontos para consumo) contaminados com vírus, nomeadamente NoV e HAV, é uma realidade.

A probabilidade de contrair a infeção está dependente, entre outros, de fatores ligados ao hospedeiro, das características particulares destes microrganismos e do tipo de géneros alimentícios. Em particular, a resistência do NoV e HAV durante

longos períodos de tempo após a contaminação inicial e o modo de consumo destes alimentos (crus, após tratamento térmico ligeiro ou sem tratamento térmico final) pode contribuir para a persistência desta contaminação em alimentos prontos a comer.

Considerando que a presença de NoV e HAV é um problema emergente em saúde pública, as estratégias de controlo deverão orientar-se essencialmente para a prevenção da contaminação destes tipos de géneros alimentícios, identificando e minimizando o impacto dos diversos fatores de risco inerentes ao ambiente de produção, preparação, conservação, distribuição e consumo.

A monitorização, vigilância e controlo da presença de NoV e HAV nos géneros alimentícios e ambiente, mais frequentemente associados à sua transmissão, poderão contribuir para a verificação e validação dos sistemas de segurança alimentar implementados.

Referências bibliográficas:

- (1) Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science. Summary Report of Joint Scientific FSA/EFSA Workshop on Foodborne Viruses. EFSA supporting publication. 2016; 13(10): EN-1103.
- (2) Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: meeting report. Rome: FAO/WHO, 2008. (Microbiological Risk Assessment Series; 13). www.who.int/foodsafety/publications/micro/Viruses_in_food_MRA.pdf
- (3) Codex Alimentarius Commission. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food (CAC/GL 79-2012). Rome: FAO/WHO, 2012. www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/
- (4) 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 food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal 2016;14(12):4634. www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4634
- (5) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva: World Health Organization, 2015. www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/
- (6) Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Ad hoc Group on Foodborne Viral Infections: an update on viruses in the food chain. London: Food Standards Agency, 2015. www.food.gov.uk/sites/default/files/acmsf-virus-report.pdf
- (7) EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on An update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. EFSA Journal 2011;9(7):2190. www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2190
- (8) Instituto Português do Mar e Atmosfera. Boas práticas para a produção de bivalves – Ria Formosa. Lisboa: IPMA, 2013 www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/institucionais/ipma_manual.boas.praticas_proj.QUASUS.pdf
- (9) Instituto Português do mar e da Atmosfera. FAQ's - Pescas: Classificação das zonas de produção de moluscos bivalves [Em linha]. [consult. 15/12/2016]. www.ipma.pt/pt/educativa/faq/pescas/faqdetail.html?f=/pt/educativa/faq/pescas/faq_0008.html



artigos breves_ n. 10

- (10) Organização Mundial da Saúde; Amorim J, Novais MR, Correia MJF (trad). Cinco chaves para uma alimentação mais segura: manual. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2008. <http://repositorio.insa.pt//handle/10400.18/75>
- (11) Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Code of practice for fish and fishery products (CAC/RCP 52-2003). www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/
- (12) Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Code of hygienic practice for fresh fruits and vegetables (CAC/RCP 53-2003). www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/list-of-standards/en/
- (13) EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. EFSA Journal 2012;10(1):2500. www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2500
- (14) ISO/TS 15216-2:2013 - Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection.
- (15) ISO/IEC 17025: 2005 - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.