

REVISION

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

Norovírus em alimentos

Norovirus in foods

Isabelle da Silva Luz*

Marize Pereira Miagostovich

RESUMEN

Introducción: Los norovirus (NoV) son importantes agentes causantes de gastroenteritis de origen alimentario, con brotes asociados al consumo de frutas, vegetales de hoja, moluscos bivalvos y alimentos de delicatessen. El aumento de la importancia epidemiológica de estos virus ha sido demostrado por el establecimiento de redes de laboratorio de vigilancia en diversos continentes. Las infecciones por NoV se hicieron más conocidas especialmente con la consolidación del mercado de buques de cruceros en el país a partir de 2004. **Objetivo:** Este estudio tiene como objetivo presentar avances relacionados con la investigación de NoV en alimentos, destacando características de este patógeno y estrategias para su detección en estas matrices. **Método:** Se realizó una revisión integrativa, por el levantamiento de artículos científicos con el objetivo de tratar los principales aspectos de NoV. **Resultados:** Se realizó una amplia revisión de la literatura, con la descripción de los principales resultados presentes en la literatura consultada y la discusión de aspectos como enfermedades transmitidas por alimentos (DTA), virus como contaminantes de alimentos, estabilidad y desinfección, brotes de origen alimentario asociados a los NoV, alimentos asociados a la contaminación por NoV, métodos de concentración y detección de NoV en alimentos, estudios de evaluación de riesgos y prevención y control. **Conclusiones:** Los registros de involucramiento de NoV en brotes de origen alimentario y la creciente diversidad genética de estos virus refuerzan la necesidad de vigilancia de laboratorio y epidemiológica sobre todo en los países en desarrollo, como Brasil.

PALABRAS CLAVE: Norovirus; Alimentos; Brotes de Enfermedades; Gastroenteritis; Métodos; Vigilancia Sanitaria

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. 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

Recibido: 06 fev 2017
Aprobado: 23 maio 2017



INTRODUCCIÓN

Descrito por primera vez en la década de 1970 con el uso de inmuno-microscopía electrónica¹, los virus Norwalk, como eran conocidos los norovirus (NoV), tuvieron su importancia epidemiológica reconocida solamente a partir de la década de 1990 con el advenimiento de técnicas moleculares de clonación y secuenciación nucleotídica, que permitieron la producción de insumos para diagnóstico^{2,3,4,5,6}. Actualmente, los NoV son reconocidos como los principales agentes causantes de brotes y casos esporádicos de gastroenteritis aguda de origen no bacteriano en humanos^{7,8,9,10}.

El impacto de las infecciones por NoV en los países industrializados es evidente por el número de redes de vigilancia epidemiológica establecidas en los diferentes continentes. Las plataformas electrónicas como *Noronet* (Países Bajos), *Food-borne Viruses in Europe* (Unión Europea), el *Hospital Norovirus Outbreak Reporting Tool* (Inglaterra), *Episurv* (Nueva Zelanda), *OzFoodNet* (Australia), *Calicinet* y *National Outbreak Reporting System* (Estados Unidos) promoviendo la integración entre laboratorios por el intercambio de datos epidemiológicos y moleculares provenientes de brotes, proporcionando informaciones sobre la circulación de genotipos y el surgimiento de nuevas variantes^{11,12,13,14}. En estos países, donde el diagnóstico está bien establecido, los NoV son responsables de más de 200.000 muertes/año, principalmente de niños menores de 5 años de edad⁹.

En Brasil, las infecciones por NoV se hicieron más conocidas especialmente con la consolidación del mercado de buques de cruceros en el país a partir de la temporada de 2004/2005 (<http://www.abremar.com.br/down/fgv2015.pdf>), ya que es común la aparición de brotes de gastroenteritis en estos ambientes^{10,15,16,17,18}. Adicionalmente, diversos estudios realizados en el país vienen demostrando el impacto de las infecciones por NoV en diferentes poblaciones incluyendo brotes, casos esporádicos, pacientes hospitalizados, así como la ocurrencia de infecciones asintomáticas y casos asociados a cuadros de diarrea persistente^{19,20,21,22,23, 24,25,26,27,28,29,30,31,32}. La diseminación ambiental de los NoV en diferentes matrices acuáticas en el país también ha sido demostrada con concentraciones que alcanzan $1.5E + 04 - 0.3E + 05$ (GC) / L en muestras de alcantarillado bruto^{33,34,35,36,37,38,39, 40}.

En cuanto a las gastroenteritis de origen alimentario, que se encuentran en el grupo de enfermedades transmitidas por alimentos (DTA), los NoV se asociaron a 38 brotes (0,9%) de un total de 9.719 casos notificados por el Ministerio de Salud (MS) período 2000-2014⁴¹. En más de 10.000 brotes de gastroenteritis asociados a la contaminación alimentaria reportados en los últimos años, más de la mitad no posee un agente etiológico definido. Así, como en la mayoría de los países, la determinación de brotes de origen alimentario asociados con NoV se basa en investigaciones epidemiológicas y pruebas de laboratorio realizadas con muestras clínicas de individuos involucrados en estos brotes⁴².

La detección de NoV humano en alimentos es dificultada por la complejidad de la matriz alimentaria y por la presencia

de bajos niveles de partículas de virus, lo que resulta en subnotificación de brotes^{43,44}. Esta revisión tiene como principal objetivo presentar los NoV como los principales agentes virales asociados a brotes de gastroenteritis de origen alimentario, describiendo sus características generales y los avances relacionados con la investigación de estos virus en matrices alimentarias.

MÉTODO

Este estudio, elaborado como una revisión integrativa, fue conducido según metodología descrita por Sobral y Campos⁴⁵, por el levantamiento de artículos científicos con el objetivo de tratar los principales aspectos de NoV a partir del consumo de alimentos contaminados, así como infecciones relacionadas. La investigación de literatura científica fue realizada por consulta a la base de datos PubMed (empleando palabras clave como: *norovirus on foods, metodologías para norovirus on foods, norovirus review*) y del MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

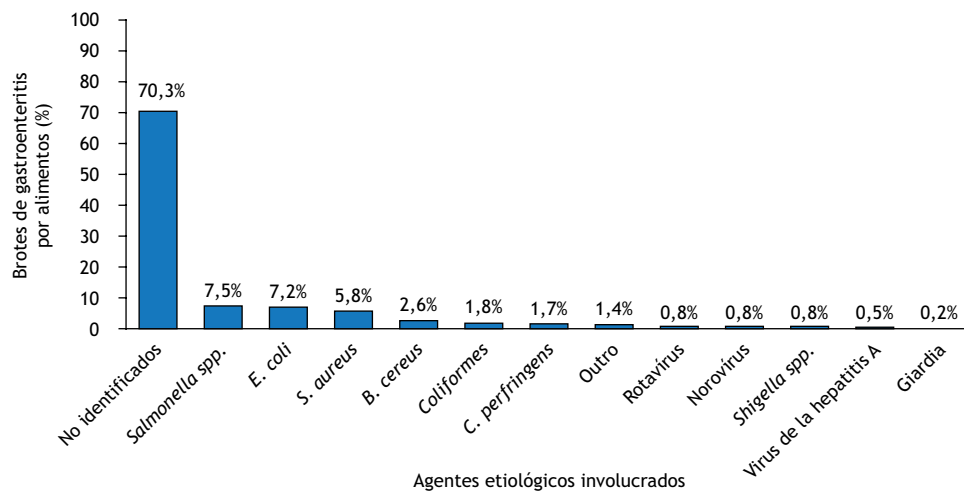
Enfermedades transmitidas por alimentos (DTA)

DTA es un término genérico aplicado a un síndrome generalmente constituido de anorexia, náuseas, vómitos y / o diarrea, acompañada o no de fiebre, atribuida a la ingestión de alimentos o agua contaminados. Sin embargo, los síntomas digestivos no son las únicas manifestaciones de estas enfermedades, ya que las infecciones extraintestinales en diferentes órganos y sistemas, según el agente involucrado, también pueden ocurrir. Además de bacterias y toxinas, las DTA también pueden ser causadas por sustancias tóxicas, parásitos y virus⁴⁶.

El perfil epidemiológico de las DTA en Brasil todavía es poco conocido. Sólo algunos estados y / o municipios disponen de informaciones estadísticas y datos sobre los agentes etiológicos más comunes, alimentos frecuentemente implicados, población de mayor riesgo y factores contribuyentes^{46,47}. Hay todavía casos de DTA que no son notificados a las autoridades sanitarias, ya que muchos patógenos alimentarios causan sintomatología blanda y el paciente no busca auxilio médico⁴⁸.

En muchos países, incluso en Brasil, la descripción de brotes (episodio en que dos o más personas presentan enfermedad similar después de ingerir alimentos y / o agua del mismo origen notificados) se restringe a aquellos que involucran a un mayor número de personas o cuando la duración de los síntomas son más prolongados⁴⁹.

La Figura presenta los principales agentes etiológicos identificados en los brotes de DTA ocurridos en Brasil entre 2007 y 2016, destacando el número de agentes no identificados y el pequeño número de casos asociados a los NoV, así como otros agentes virales (rotavirus y virus de la hepatitis A).



Fuente: Adaptado de Ministerio de Salud (2016) 47; * datos sujetos a la actualización.

Figura. Brotos de gastroenteritis de origen alimentario identificados en Brasil en el período 2007-2016 * de acuerdo con el agente etiológico involucrado.

Virus como contaminantes de alimentos

Como virus de transmisión fecal-oral, los virus entéricos humanos son importantes contaminantes de agua y alimentos, principalmente por ser virus no envueltos y resistentes a condiciones adversas, tanto en el organismo humano (acidez del estómago) como en el ambiente⁵⁰. Los virus de la hepatitis A (HAV) y E (HEV), enterovirus, astrovirus, parvovirus, rotavirus, adenovirus (ADV) 40 y 41, y, más raramente, coronavirus también se asocian a infecciones de origen alimentario^{51, 52}.

Aunque la estabilidad de estos virus en las diferentes matrices depende de diversos factores ambientales tales como pH, calor y resistencia a agentes de limpieza, la baja dosis infecciosa de los NoV (18 partículas de virus pueden causar enfermedad) representa un factor relevante en la transmisibilidad de estos virus^{16, 53,54,55,56,57}. La ingestión de agua o alimento contaminado constituye la principal vía de infección en estos casos, sin embargo la enfermedad asociada puede ocurrir indirectamente a partir del contacto con los hábitos contaminados⁵⁸.

Un importante factor a ser considerado en la transmisión de los NoV es el gran número de infecciones asintomáticas^{59,60,61}. Los brotes por VN a menudo implican la preparación de alimentos por un manipulador en el ambiente de servicio de alimentación, en el que el contacto directo de las manos o con mano enguantada y limpieza inadecuada son identificados como factores contribuyentes comunes. Una dispersión de virus por manipuladores de alimentos posee el potencial de contaminación en estos ambientes, donde grandes cantidades de alimento pueden ser preparadas en un área relativamente pequeña, involucrando la interacción de varios funcionarios⁶³.

Norovirus

Pertenecen al género *Norovirus*, familia *Caliciviridae* los NoV son un grupo de virus no envasados, icosaédricos, con aproximadamente 27 a 38 nm de diámetro, cuyo nombre deriva de la

palabra griega *calyx* (cáliz), en referencia a las depresiones semejantes a este formato sobre la misma, superficie del virus^{64,65}. Estos virus se mencionaron previamente por otros nombres, tales como *small round-structured viruses* e *virus Norwalk-like*⁶⁶.

El genoma consiste en un ARN de cadena simple polaridad positiva que alcanza de 7,3 a 7,5 kb, organizado en tres cuadros abiertos de lectura (ORF) y con una cola poli (A) en el extremo 3'^{2, 3,67}. La ORF1 codifica una poliproteína, que se divide en al menos seis proteínas no estructurales, incluida la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp); ORF2 y ORF3 codifican respectivamente las proteínas VP1 y VP2 de la cápside viral⁶⁸.

Debido a la diversidad genética del género, los NoV se clasifican en genogrupos (G) y genotipos (GG) por la secuenciación nucleotídica de la región genómica completa que codifica para la proteína VP1 de la cápside⁶⁹. Actualmente, los NoV han sido clasificados en siete genogrupos (GI-GVII)⁷⁰ de los cuales tres (GI, II y IV) infectan humanos⁷¹.

NoV GII.4 ha sido asociado con la mayor parte de brotes y casos esporádicos ocurridos mundialmente, principalmente debido a la emergencia de nuevas variantes que se vuelven dominantes a intervalos de 2 a 3 años⁷². Sin embargo, en 2013, el GII.P17 surgió como un nuevo genotipo con potencial de evolución similar al GII.4 alterando la epidemiología de los NoV en el mundo⁷³. La deriva antigénica y la recombinación de *hotspot*, principalmente de la región de unión ORF1 / ORF2, han sido reportadas como un mecanismo importante para la evolución de NoV llevando al surgimiento de nuevos virus^{74,75,76,77,78,79,80}. Se han descrito varias cepas recombinantes de VN, de modo que el análisis de más de una región del genoma puede ser importante para la detección de cepas únicas o recombinantes⁸¹.

En Brasil, la diversidad genética de los NoV fue demostrada por la detección de diferentes genotipos de genogrupos humanos GI (GI.1-4, GI.7-8), GII (GII.1-9, GII.12-17, GII.20 (GII.1, GII, GII) y IV (GIV.1), así como de variantes de GII.4 y recombinantes



(US95_96, Kaiso_2003, Asia_2003, Hunter_2004, Yerseke_2006a, Den Haag_2006b, New Orleans_2009 y Sydney_2012)^{77,82,83,84,85,86}.

La infección por NoV en humanos se caracteriza como una infección gastrointestinal autolimitada con síntomas que incluyen náuseas, vómitos, diarrea, malestar, dolor abdominal, dolores musculares, anorexia, dolor de cabeza y fiebre baja. Los síntomas generalmente empiezan 1 a 2 días después del consumo de alimentos o agua contaminados y persisten por 1 a 8 días⁶⁴.

Las investigaciones de brote han implicado el vómito como vía de transmisión, por la producción de aerosoles que pueden ser inhalados, o por la contaminación directa de superficies^{87,88,89}. La infección afecta a todos los grupos de edad, ocurriendo principalmente en ambientes domésticos e institucionales, tales como hospitales, escuelas, restaurantes, asilos y cruceros marítimos^{60,65,90,91}. La epidemiología de los NoV es compleja e influenciada por muchos factores, incluyendo inmunidad de la población, evolución del virus, estacionalidad, estabilidad del virus en el ambiente y la frecuente ocurrencia de infecciones asintomáticas^{59,60, 61,92,93,94,95}.

Estabilidad y desinfección

Los NoV permanecen infecciosos después del tratamiento con desinfectantes comúnmente utilizados, como alcoholes y compuestos cuaternarios de amonio, así como después de calentamiento a una temperatura de 60 ° C durante 30 minutos, a éter 20% por 18 horas a 4 ° C y cuando están expuestos a pH 2,7 por tres horas a temperatura ambiente⁹⁶. También pueden ser estables a la inactivación después del tratamiento con 3,75 a 6,25 mg / L de cloro (residuo de cloro libre de 0,5 a 1,0 mg / L), concentración que se encuentra en sistemas de distribución de agua para consumo. Sin embargo, las partículas de VN se inactivan después del tratamiento con 10 mg / L de cloro. Los estudios demostraron que los NoV son más resistentes a la inactivación por cloro que el poliovirus tipo 1, los rotavirus humanos (Wa), el rotavirus simion (SA11) y el bacteriófago F2⁹⁷.

Según Mormann et al.⁹⁸, las medidas utilizadas por la industria de procesamiento de alimentos para fines de conservación y los procesos utilizados por los consumidores para preparación y almacenamiento serían suficientes para inactivar NoV en alimentos contaminados y así la validación de las condiciones de inactivación térmica en alimentos específicos ha sido necesaria⁹⁹.

Considerando la estabilidad de los NoV en el medio ambiente, Baert et al.¹⁰⁰ han desarrollado un trabajo de revisión sobre la eficacia de los métodos de conservación utilizados para la inactivación de los virus en los alimentos. Los autores sugirieron que métodos de conservación de alimentos tales como calefacción, procesamiento por alta presión hidrostática e irradiación han sido más eficaces en la inactivación de patógenos que congelación, refrigeración, actividad de agua reducida, acidificación o embalaje en atmósfera modificada. También destacaron la combinación tiempo-temperatura y la eficacia variable de sanitizantes sobre la matriz alimentaria en relación a las cepas virales.

La indisponibilidad de linajes celulares para la replicación de VN humano en laboratorio resultó en la utilización de virus pertenecientes al mismo género como sustitutos para predecir el comportamiento de VN en estudios de estabilidad en alimentos. En el presente estudio se evaluó la relación entre el peso corporal y el peso corporal en el grupo de edad. Se incluyen también el calicivirus canino (CaCV) utilizado por Rutjes et al.¹⁰³ en muestras de lechuga y crema, y el virus Tulane (TV), un calicivirus que pertenece al género Recovirus^{93,104}. En un estudio realizado por Wang et al.⁹⁴ se demostró que MNV-1, TV y HAV pueden resistir sobre la superficie de semillas de alfalfa por un periodo prolongado (22° C hasta 50 días), y estos virus podrían contaminar brotes después de la germinación y ser transferidos para el agua de riego.

Brotos de origen alimentario asociados a los NoV

De acuerdo con la investigación de literatura sobre tendencias epidemiológicas globales de brotes ocurridos de 1983 a 2011, Matthews et al.¹⁰⁵ observaron que la mayoría de infecciones por NoV fueron transmitidas por rutas de origen alimentario (54%), con segunda posición para transmisión persona a persona (26%). Sin embargo, esta fue una metanálisis de brotes publicados y no necesariamente basada en datos de vigilancia de base poblacional. Además, la tasa de ataque (definida como el número de casos por persona expuesta) y la distribución de genotipos son factores relevantes para la investigación de brotes¹⁰⁶.

Para estimar la proporción de infecciones de origen alimentario causadas por NoV a una escala global, Verhoef et al.¹⁴ utilizaron sistemas internacionales múltiples de vigilancia de brotes (*NorNet*, *Calicinet*, *Episurv*) y revisión sistemática de la literatura, y demostraron que, aunque la proporción de brotes causados por NoV GII.4 ha sido menor que los asociados con otros genotipos, es considerable la contribución absoluta de brotes de origen alimentario por NoV GII.4 a los costos sociales y económicos causados por este virus.

Alimentos asociados a contaminación por NoV

Los alimentos frescos sujetos a la contaminación ambiental y manipulación¹⁰⁷, como las frutas, los vegetales foliosos¹⁰⁸ y los moluscos bivalvos¹⁰⁹, son los que presentan un mayor riesgo de contaminación por NoV. Estos alimentos, además de ser consumidos crudos, están sujetos a la manipulación humana considerable y pasan por tratamientos sanitarios industriales que no garantizan la eliminación total del patógeno cuando presente¹¹⁰. Los artículos de *delicatessen* y alimentos listos para el consumo que no sufren procesamiento adicional, tales como sándwiches fríos^{111,112}, ensaladas de vegetales¹¹³ y productos de confitería¹¹⁴, también se asocian comúnmente a brotes.

Frutas y vegetales foliares

Los brotes relacionados con diversos tipos de productos, incluyendo frutas frescas cortadas, lechuga, tomates, melones, ensaladas, cebollas verdes, fresas, frambuesas y salsa se atribuyeron a NoV humano^{115,116,117}. Varios brotes implicados en el consumo de productos frescos fueron conocidos o sospechosos debido a



la contaminación en el campo, sugiriendo que el agua de riego sería una vía de contaminación^{93,118}.

Investigaciones anteriores con cultivo hidropónico de lechuga mostraron que los virus pueden ser internalizados a través de la raíz y diseminados para las porciones aéreas de la planta^{93,119}. Se verificó que el medio de crecimiento de las plantas desempeña el papel significativo en la internalización del patógeno, por absorción por el sistema radicular¹²⁰.

En los Estados Unidos, NoV humano representa más del 40% de las enfermedades relacionadas con productos frescos cada año^{121,122} y, según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de (ECDC), el 11,6% de los casos de infecciones víricas fueron causados por el consumo de vegetales, frutas, bayas, jugos y alimentos mixtos en 32 países de Europa, en el año 2013^{123,124}.

Moluscos bivalvos

Los moluscos bivalvos son típicamente conocidos por el alto riesgo de contaminación microbiológica que presentan, ya que son acumuladores naturales de partículas dispersas en el agua. Los parámetros bacteriológicos han sido utilizados como criterio regulatorio de seguridad alimentaria para evaluar la contaminación de estos alimentos, así como de las aguas de cultivo, principalmente después de eventos de potencial contaminación fecal¹²⁵.

Sin embargo, concentraciones de *Escherichia coli* y coliformes en ostras y aguas de cultivo pueden reducirse dentro de unos días debido a la inactivación y eliminación bajo influencias del ambiente y de las mareas, lo que no ocurre con los virus¹²⁶. Una característica de brotes relacionados con esta fuente es su frecuente asociación con linajes múltiples de virus observados tanto en pacientes infectados como en el alimento involucrado¹²⁷.

La mayoría de los brotes por NoV asociados a los moluscos bivalvos se vinculan al consumo de ostras, ya que se consumen crudas, aunque algunos brotes se han vinculado a ostras cocidas¹²⁸. Estudios previos reportaron además que ostras congeladas importadas fueron atribuidas a brotes de gastroenteritis por NoV en Australia y en los EE.UU.^{129,130}.

Los tanques para la depuración de ostras se han utilizado para reducir la contaminación bacteriana, sin embargo, los procedimientos de depuración estándar son ineficaces para los contaminantes virales, como lo demuestran los altos niveles de NoV detectados en ostras comercialmente distribuidas en Italia y los EE.UU.^{131,132}. En las ostras artificialmente contaminadas y depuradas, AdV humano fueron detectados hasta 168 y MNV-1 hasta 96 h de depuración, con cuantificación viral variando de 3,2E + 05 CG / ga 4,4E + 07 CG / g para AdV y de 3,5E + 04 CG / ga 2,9E + 06 CG / g para MNV-1 después de 14 días de análisis¹³³.

Un estudio realizado en el Reino Unido en 2011 demostró que el 76,2% (n = 844) de muestras recogidas en las áreas de producción de ostras presentaron resultados positivos para NoV GI y / o GII¹³⁴. En un brote de gastroenteritis asociado al consumo de

ostras en un restaurante, también en el Reino Unido, NoV GI y GII se detectaron en concentraciones <100 copias / g (límite teórico de detección del ensayo es 13 copias/g de glándula digestiva de la muestra) y 1.736 copias/g, respectivamente¹³⁵.

En Brasil, VN GI fueron detectados en *Crassostera gigas* cultivadas en viveros marinos por 14 días, con concentraciones de 1,2 E + 06 CG / g, y NoV GII en el agua del mar, con concentraciones de 7,5 E + 13 CG / G¹³⁶. En investigaciones posteriores, NoV no fueron encontradas por Souza et al.¹³³ en ostras naturalmente contaminadas.

Itens de delicatessen e alimentos prontos para o consumo

El método de detección de NoV fue evaluado por Stals et al.¹³⁷ en alimentos listos para el consumo, tales como muestras de ensalada de penne, sopas, sándwiches y comidas compuestas, encontrando que la recuperación de NoV GI y GII fue influenciada por el nivel de inóculo viral y por el tipo de alimento. Además, MNV-1 fue evaluado con éxito como control de proceso por la misma metodología de detección.

En un brote de gastroenteritis por NoV, Malek et al.¹³⁸ encontraron que el consumo de carnes de *delicatessen* resultó en 137 personas enfermas, en 13 viajes de *rafting* independientes durante un período de un mes, y la misma secuencia del virus fue encontrada en muestras fecales obtenidas de personas que participaron de cinco viajes diferentes.

En Brasil, se identificaron NoV GI.1 en muestra de mantequilla con hierbas y NoV GII.4 en muestras de queso y salsa blanca contaminadas naturalmente, relacionadas con un brote de gastroenteritis aguda en un buque de crucero¹⁵. En este estudio, la secuenciación parcial del gen de la RNA polimerasa mostró la presencia de linajes GII.4, confirmando trabajos previos que describen la incidencia y distribución de este genotipo en el mundo entero, incluyendo Brasil^{21,139}.

Métodos de concentración y detección de NoV en alimentos

De acuerdo con Baert et al.¹¹⁴, tres categorías de alimentos se consideran cuando se eligen metodologías de concentración y detección de virus: alimentos ricos en agua y carbohidratos (frutas y vegetales); ricos en proteína y grasa (productos listos para el consumo) y moluscos bivalvos, debido a la acumulación y concentración de partículas virales y otros patógenos en el sistema digestivo⁶⁷.

Los pasos requeridos para la detección de virus en estas matrices incluyen 1) concentración y purificación de virus, 2) extracción de ácido nucleico, 3) detección, y (d) confirmación¹⁴⁰. La concentración de partículas virales para un volumen menor de muestra es la etapa más crítica del proceso y particularmente necesaria debido a los bajos niveles de virus que pueden ocurrir en las matrices^{137,141,142}. Durante la concentración de los virus, las moléculas tales como los polisacáridos, las proteínas y los ácidos grasos se quitan para prevenir la inhibición de la extracción de ARN posterior y la detección molecular^{143,144}.



Los protocolos de elución-concentración, basados en la recuperación de las partículas virales de la superficie del alimento utilizando un tampón apropiado seguido por concentración de los virus eluidos incluyen precipitación por polietileno glicol (PEG), ultracentrifugación, ultrafiltración, inmunocentración y separación catiónica. Diferentes metodologías presentan tasas de recuperación viral influenciadas por la concentración de inóculo y por el tipo de alimento analizado¹³⁷.

La eficacia de estos métodos ha sido evaluada en diversos estudios con el objetivo de proporcionar informaciones sobre recuperación viral. En la investigación realizada por Summa et al.¹⁴⁵, muestras de lechuga, jamón y frambuesas fueron contaminadas artificialmente con NoV GII, para la comparación de cuatro métodos de recuperación viral basados en técnicas de ultrafiltración, separación inmunomagnética, ultracentrifugación y precipitación por PEG. Ultracentrifugación produjo mayores eficiencias de recuperación en lechuga y jamón, mientras que la precipitación por PEG generó mayor rendimiento de recuperación de NoV en frambuesas.

Otros métodos, inicialmente descritos para la concentración de NoV a partir de diferentes matrices acuáticas, se han adaptado para la recuperación de estos virus en las matrices alimentarias. La utilización de métodos comunes para diferentes matrices puede ser útil en la investigación de brotes, en la que se suministran muestras de origen diverso. El método de concentración por filtración en membranas cargadas negativamente descrito para la recuperación de NoV a partir de agua del mar¹⁴⁶ fue adaptado para muestras de lechuga fresca y queso minas por la elución directa de estos alimentos^{147,148,149}.

El método de floculación orgánica utilizando leche descremada¹⁵⁰ también fue adaptado con éxito para la recuperación de virus a partir de las fresas¹⁵¹. Cuando se comparó con métodos de precipitación por PEG y filtración con membranas cargadas negativamente, mostró un porcentaje de recuperación de 2,5 y 32 veces mayor que las demás metodologías, respectivamente. La floculación orgánica es un método considerado de bajo costo, pues utiliza sólo un paso en la concentración de las muestras, ahorrando tiempo y reactivos. La Tabla presenta un resumen de las tasas de recuperación viral obtenidas con estas metodologías, en estudios realizados en Brasil.

La extracción de ARN es la segunda etapa en la estrategia para la detección de NoV. Protocolos de extracción implican (1) lisar la cápside viral y (2) aislar RNA⁶⁷. Sin embargo, las técnicas de

extracción directa de ARN viral implican tratamiento del producto alimenticio por la elución viral con un reactivo basado en isotiocianato de guanidina/fenol, seguido por la purificación del RNA extraído. La extracción directa de ARN se aplicó en alimentos compuestos por proteína y / o grasa, con 1 a 10² unidades de NoV detectadas, que fueron recuperadas en 10 ga 30 g de hamburguesa, pavo, *roast beef*, *penne*, *tagliatelle* y jamón de *delicatessen*^{114,152,153}.

La primera descripción detallada del empleo de metodologías moleculares para esclarecer brotes de origen alimentario fue descrita en los EE.UU. a partir de la detección de NoV en jamón contaminado¹¹¹. Las metodologías moleculares de transcripción inversa seguidas de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se utilizan para la detección y cuantificación de NoV. El método cuantitativo RT-qPCR, que incorpora una sonda marcada con fluorescencia o colorante fluorescente específicamente intercalado en la mezcla de reacción, ha sido el más recomendado debido a su sensibilidad, especificidad y rapidez¹⁵⁴.

Sin embargo, esta metodología basada en una curva estándar requiere una calibración cuidadosa y ofrece cuantificación relativa con variaciones interlaboratoriales¹⁵⁵. Como la detección de pequeñas concentraciones virales es la regla para las matrices alimentarias, la interpretación de los resultados debe seguir criterios bien establecidos¹⁴⁰.

A pesar de la sensibilidad, el ensayo molecular presenta limitaciones por no proporcionar datos de infecciosidad, pudiendo ser el RNA detectado proveniente de una partícula viral íntegra o ser una molécula residual¹⁵⁶. Recientemente, los procedimientos de pretratamiento y / o utilización de colorantes que se intercalan en ARN y ADN, como el propio monoazida (PMA) en metodologías moleculares, se han utilizado para la detección y determinación de infecciosidad de NoV humano^{157,158}, ocurriendo amplificación sólo de los genomas virales de partículas íntegras, o sea, infecciosas^{159,160}.

Otra cuestión importante en la detección de NoV a partir de las matrices alimentarias es el uso de virus como control interno de proceso. MNV-1, Mengovirus (linaje MC₀), calcivirus felino (FCV) y bacteriófagos como MS2 y PP7^{148,161} son ejemplos de virus que han sido utilizados con éxito^{162,163,164,165,166}, siendo los bacteriófagos más accesibles para producción en laboratorios de microbiología de alimentos¹⁶⁷.

Tabla. Eficiencias de recuperación de NoV en los alimentos.

Métodos de concentración viral	Muestras de alimentos	Eficiencias medias de recuperación de NoV (%)	Referencias
Filtración con membranas cargadas negativamente	Queso	6,0-56,3	147
	Lechuga	5,2-72,3	
Filtración con membranas cargadas negativamente	Lechuga	3,5-32,0	149
Filtración con membranas cargadas negativamente	Lechuga	0,06-0,67	148
Floculación orgánica	Fresa	1,29-41,37	151



Después de la detección viral, otra etapa fundamental es la caracterización molecular de los NoV por el secuenciación nucleotídica del genoma. La secuencia completa de ORF2 que codifica el gen de la proteína VP1 de la cápside viral (1.600 pares de base) se utiliza como estándar para la caracterización molecular de genotipos y estudios filogenéticos⁷¹. Sin embargo, la secuenciación parcial de esta región del genoma se ha utilizado para la caracterización rápida de los genotipos por el uso de iniciadores que tienen como objetivo regiones menores de la ORF2, denominadas C (extremo 5' de la ORF2) y D (extremo 3' de la ORF2)^{168,169,170}.

Para la caracterización molecular de variantes de GII.4, Vega et al.¹⁷¹ desarrollaron un protocolo de amplificación que utiliza iniciadores que tienen como objetivo la región codificante del subdominio P2 de la proteína VP1 de la cápside viral, ya que gran parte de las mutaciones que diferencian los genotipos y las variantes se producen en esta región. En la actualidad, la caracterización molecular de los NoV es facilitada por el *National Institute for Public Health and the Environment* (RVMI) que dispone la herramienta *Norovirus Genotyping Tool version 1.0* de genotipado automático por la inserción de secuencias nucleotídicas del genoma en esta plataforma¹⁷².

En 2013, las especificaciones técnicas (TS) desarrolladas por el Comité Europeo de Normalización [(CEN)/TC 275/WG 6] y aprobadas por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) establecieron metodologías estandarizadas para la detección de NoV y HAV (ISO/TS 15216-1, 2013 e ISO/TS 15216-2, 2013) en categorías de alimentos de alto riesgo, lo que representa un avance significativo en los estudios de virología de alimentos⁵¹.

Estudios de evaluación de riesgos

La evaluación de riesgo microbiano cuantitativo (QMRA) se ha convertido en una herramienta valiosa para caracterizar riesgos de enfermedad de origen alimentario asociados con patógenos, sin embargo, parte considerable de los estudios se relaciona con agentes bacterianos^{173,174,175}. En relación a NoV, los modelos de QMRA fueron desarrollados para evaluar el riesgo de NoV en agua de consumo¹⁷⁶ y agua de recreación^{177,178}. En los alimentos, estudios de QMRA para NoV son limitados y concentrados en la contaminación inicial de producción fresca^{179,180,181}.

Una revisión sobre los estudios de evaluación de riesgo microbiológico en agua y seguridad de productos frescos reveló que los virus presentaron estimaciones de riesgo más altas en comparación con los agentes bacterianos. Las semillas de folios se identificaron como el producto de mayor preocupación, cuando se compararon con diferentes productos alimenticios¹⁸².

Sin embargo, un estudio realizado por Stals et al.¹¹² presentó modelo cuantitativo de exposición a NoV con foco en la transmisión potencial durante la preparación de sándwiches. Se encontró que una única dispersión de NoV por manipulador de alimentos podría causar niveles medios de 43 ± 18 , 81 ± 37 y 18 ± 7 partículas de NoV presentes en los sándwiches, manos y superficies de trabajo, respectivamente.

Prevención y control

El diagnóstico de laboratorio rápido es una herramienta importante para dirigir el control de brotes por NoV por la elección de prácticas de intervención y control apropiadas, tales como protocolos de limpieza y desinfección, aislamiento, agrupamiento de pacientes basado en los síntomas, exclusión de empleados sintomáticos o manipuladores de los alimentos o, en última instancia, el cierre de establecimientos¹⁸³.

El control de la contaminación de los alimentos, el agua, las superficies ambientales y los hábitos, así como la higiene adecuada de los manipuladores de alimentos es fundamental en la reducción de la transmisión⁶⁵. En el caso de los manipuladores de alimentos infectados se recomienda el alejamiento por lo menos 3 días después de la resolución de los síntomas. Los adultos y los niños infectados deben mantenerse alejados de las actividades escolares y de trabajo durante el mismo período de tiempo y, en caso de brotes, el funcionamiento de establecimientos como buques de crucero, resorts, campamentos y restaurantes debe interrumpirse para evitar la exposición de una nueva población de susceptibles¹⁸⁴. Las superficies contaminadas después de episodios de vómito o diarrea deben ser desinfectadas con una solución de hipoclorito al 5% -25% o 1.000 a 5.000 ppm¹⁸⁵.

La importancia clínica cada vez mayor de las infecciones por NoV humano sugiere la necesidad de una vacuna eficaz, que promovería el bloqueo de vías de transmisión particularmente para las poblaciones de alto riesgo, tales como manipuladores de alimentos, militares, personas mayores, niños e individuos inmunocomprometidos, mejorando así como la seguridad alimentaria, la salud pública y la biodefensa⁴².

El desarrollo de vacunas para NoV ha sido dirigido a la expresión de proteínas de la cápside viral como *virus like particles* (VLPs) en diferentes vectores^{97,186,187}. Una vacuna bivalente de amplia cobertura que utiliza VLPs de un consenso de tres variantes de NoVGII.4 en combinación con NoVGI.1 está en fase final de pruebas por el grupo Takeda Vacunas^{188,189,190}. A pesar de los avances logrados, uno de los principales desafíos en el diseño de vacunas es la gran variabilidad genética de estos virus y la sustitución de cepas pandémicas a intervalos de tiempo cortos, como se observa para el virus de la gripe A¹⁹¹.

CONCLUSIONES

Los registros de participación de NoV en brotes de origen alimentario y la creciente diversidad genética de estos virus refuerzan la necesidad de vigilancia de laboratorio y epidemiológica sobre todo en los países en desarrollo, como Brasil, donde no sólo la detección directa de virus de muestras de alimentos naturalmente contaminados, así como el diagnóstico, todavía están restringidos a los laboratorios de investigación. Diferentes metodologías de elución-concentración presentan gran variabilidad en las tasas de recuperación viral dificultando la recuperación de los NoV en diferentes matrices.



El establecimiento del diagnóstico de NoV en los Laboratorios Centrales de los estados (Amazonas, Bahía, Ceará, Pará, Pernambuco, Río de Janeiro, Santa Catarina y São Paulo) que están en la ruta de la temporada de cruceros por el Programa Nacional de Fortalecimiento de la Vigilancia Sanitaria que actúa en los puertos, aeropuertos y fronteras, publicado el 6 de diciembre de 2012, representa un gran avance en la capacidad de esclarecimiento de brotes en el país, facilitado por la edición de la norma ISO/TS 15216 (2013) que, estandarizando metodologías de

concentración y detección viral, armoniza el diagnóstico facilitando la creación de una red nacional de diagnóstico de NoV que contribuya a determinar el real impacto de las infecciones por NoV en el país. Adicionalmente, la evolución rápida y continua de estos virus requiere un sistema de vigilancia activa que identifique genotipos circulantes y prevalentes que puedan auxiliar en el establecimiento de una eventual vacuna en el país. En este contexto, es indispensable el establecimiento de una red de vigilancia epidemiológica integrada en todo el territorio 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.P11100>
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, Scaiola 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. AdeVNirus, 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 adeVNirus 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(2):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: Salinger 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 VNel 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 VNel 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 VNel 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 VNel 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):1-12. <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. VNet 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 Supl 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, Sleigh 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: IAFFP 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 VNI 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>

Agradecimientos

MPM (Productividad en Investigación) y ISL (Programa de Post-doctorado) son becarios CNPq y Capes, respectivamente. Esta revisión está en el ámbito de las actividades de Fiocruz como Centro Colaborador de la OPS / OMS en Salud Pública y Ambiental. Los autores informan de un conflicto de intereses. El uso de nombres comerciales en esta publicación no consiste en el endoso de productos comerciales.

Conflicto de Interés

Los autores informan que no hay ningún conflicto de interés con pares e instituciones, políticos o financieros de este estudio.



Esta publicación está bajo la licencia Creative Commons Asignación 3.0 no adaptada.
Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.es>