

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



DETEÇÃO DE VÍRUS EM MATRIZES ALIMENTARES

(VERSÃO PÚBLICA)

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

DIANA RITA SANTOS PAIXÃO

DISSERTAÇÃO ORIENTADA POR:

PROF.^a MARIA FILOMENA CAEIRO

DOUTOR FRÉDERIC BUSTOS GASPAR

2016

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



DETEÇÃO DE VÍRUS EM MATRIZES ALIMENTARES

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

DIANA RITA SANTOS PAIXÃO

DISSERTAÇÃO ORIENTADA POR:
PROF.^a MARIA FILOMENA CAEIRO
DOUTOR FRÉDERIC BUSTOS GASPAR

2016



DETEÇÃO DE VÍRUS EM MATRIZES ALIMENTARES

DIANA RITA SANTOS PAIXÃO

2016

O TRABALHO APRESENTADO NESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO FOI REALIZADO NO INSTITUTO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL E TECNOLÓGICA SOB A ORIENTAÇÃO DIRETA DO DOUTOR FRÉDERIC BUSTOS GASPAR NO ÂMBITO DO MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA.

Agradecimentos

Muitos foram os que contribuíram para que este trabalho fosse possível. A todos agradeço com sincero sentimento, mas quero deixar uma palavra especial de apreço:

Ao Dr. Frédéric Gaspar, por desenvolver e orientar este projeto, pelos conhecimentos transmitidos e, principalmente, pelo apoio, paciência e dedicação demonstrados ao longo deste ano.

À Professora Dr.^a Filomena Caeiro, na qualidade de meu orientador interno, gostaria de manifestar o meu reconhecimento e o meu muito obrigado por toda a paciência e disponibilidade demonstrada, tornando possível a realização deste trabalho.

À Dr.^a Teresa Crespo, por ter aceitado coorientar este trabalho e pela disponibilidade demonstrada.

Ao ITQB e IBET, por me terem permitido desenvolver projeto nas suas instalações.

A todos os membros do laboratório de Microbiologia do IBET pelo apoio e simpatia sempre demonstrada

Um especial agradecimento à Doutora Sandra Chaves, do Laboratório de Investigação da Biopremier, pela disponibilidade e ajuda técnica, e pela simpatia sempre demonstrada.

A todos os membros do Laboratório de Investigação da empresa Biopremier pela ajuda e paciência prestada durante o desenvolvimento final do trabalho.

Aos meus pais, pelo incentivo, paciência e esforço feito ao longo de toda a minha vida académica. Sem eles, nada teria sido possível.

Ao João por toda a paciência, carinho, encorajamento e positivismo sempre demonstrado.

A toda a minha família pela compreensão, força e carinho que me deram ao longo desta caminhada.

Aos meus amigos e colegas pelo apoio e bons momentos sempre proporcionados. Ao companheirismo durante todo o curso e estágio.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, Muito Obrigado!

Resumo

A segurança alimentar está relacionada com a presença de perigos em géneros alimentícios no momento do seu consumo. A entrada desses elementos perigosos que podem constituir um risco quando ingeridos em conjunto com o alimento contaminado pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia de produção de alimentos, tornando-se essencial a sua conveniente identificação. Os perigos biológicos de origem alimentar incluem microrganismos como fungos, bactérias e vírus.

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que contêm um genoma de RNA ou de DNA associado a uma capa proteica protetora. Apenas se conseguem multiplicar no interior das células vivas dos seus organismos hospedeiros após infeção. A contaminação de alimentos por vírus pode ocorrer ao longo de toda a cadeia de produção, quer devido ao uso de más práticas de saneamento ou à intervenção de manipuladores de alimentos infetados. Entre os alimentos com maior risco de contaminação por vírus entéricos estão os moluscos bivalves, devido à sua elevada capacidade de filtrar e concentrar os vírus que podem estar presentes na água, os vegetais, legumes, frutos vermelhos e bagas cultivados em campos fertilizados com resíduos de origem animal ou irrigados com águas contaminadas.

Nestes alimentos contaminados, os vírus estão geralmente presentes em baixas concentrações e as metodologias de deteção convencionais, tais como a propagação em células animais, nem sempre permitem a sua deteção. Para além do mais, nem sempre existem métodos de rotina para a propagação de certos vírus. A sua deteção passa, portanto, pela utilização de técnicas moleculares após as necessárias etapas de extração de partículas virais da matriz em questão e subsequente extração de ácidos nucleicos virais.

A presente dissertação de mestrado teve como principal objetivo o desenvolvimento de novos métodos e a adaptação e otimização de métodos previamente descritos para a deteção de vírus em diferentes matrizes alimentares relevantes. Este trabalho permitiu definir métodos específicos de deteção de norovírus GI, norovírus GII, vírus da hepatite A, e adenovírus humanos (HAdV) por RT-PCR e PCR em tempo real. Para os métodos desenvolvidos foi determinado o limite de deteção (LOD), a especificidade e a reprodutibilidade em diferentes termocicladores. Este trabalho permitiu igualmente otimizar o processo de extração de ácidos nucleicos virais após a extração de partículas virais de diferentes vírus a partir das seguintes matrizes alimentares selecionadas: moluscos bivalves, frutos vermelhos e águas engarrafadas. Os métodos desenvolvidos estão prontos para serem usados numa empresa sob a forma de *kit* ou serviço.

Em paralelo, este trabalho permitiu igualmente o desenvolvimento de um método de PCR digital que permite a deteção e quantificação em simultâneo de 69 serótipos de HAdV descritos.

Abstract

Food safety is related to the presence of hazards in food at the time of consumption. The entry of these dangerous elements that may pose a risk when taken in combination with the contaminated food can occur at any stage of the food production chain, making it essential their convenient identification. Biological hazards include foodborne microorganisms such as fungi, viruses and bacteria.

Viruses are obligate intracellular parasites that contain an RNA or DNA genome associated to protein.. They can only multiply within living cells after infection of their host organisms. The food contamination by viruses may occur throughout the food chain either by use of poor sanitation practices or by the intervention of infected food handlers. Among the foodstuffs with higher risk of contamination by enteric viruses are bivalve molluscs, due to their high ability to filter and concentrate viruses that may be present in the water, and vegetables and berries cultivated in fertilized fields with waste of animal origin, or irrigated with contaminated water.

In contaminated food, viruses are usually present in low concentrations and conventional detection methodologies, such as propagation in animal cells, do not always allow their detection. Furthermore, there are not routine methods for the propagation of certain viruses. Therefore, their detection requires the use of molecular techniques after the necessary steps of virus extraction and subsequent extraction of viral nucleic acids.

This master's thesis had as main objective the development of new methods and adaptation and optimization of previously described methods, for virus detection in different relevant food matrices. This work allowed defining specific methods for the detection of norovirus GI, norovirus GII, hepatitis A virus and human adenoviruses (HAdV) by real-time RT-PCR and PCR. For the developed methods, the limit of detection (LOD), the specificity, and the reproducibility, were determined. This work also allowed the optimization of the process of extraction of viral nucleic acids after their isolation from the following selected food matrices: bivalve molluscs, berries and bottled water. The developed methods are ready to be marketed as commercial kits or in form of a service.

This work also allowed the development of a digital PCR method that allows the detection and the quantification of 69 HAdV serotypes.

Lista de abreviaturas e siglas

ATCC - American Type Culture Collection

CDC - Centre for Disease Control

Ct - do inglês *Threshold cycle*

EFSA - European Food Safety Authority

FAO - Food and Agriculture Organization

FDA - Food and Drug Administration

HAdV - Adenovírus humanos (do inglês *Human Adenovirus*)

HAV - Vírus da Hepatite A (do inglês *Hepatitis A Virus*)

ISO - International Organization for Standardization

LOD – Limite de detecção (do inglês *Limit of detection*)

NIBSC - National Institute for Biological Standards and Control

NoV - Norovírus

ORF – do inglês *open reading frame*

PCR - do inglês *Polymerase chain reaction*

dPCR - do inglês *digital PCR*

RT-PCR - do inglês *reverse transcription PCR*

T_m - do inglês *Melting temperature*

WHO - World Health Organization

Índice

I.	Introdução	1
1	Segurança alimentar e vírus	1
1.1	Segurança alimentar	1
1.2	Vírus presentes em alimentos	2
1.3	Processo de contaminação de alimentos por vírus	3
1.3.1	Contaminação na fonte	4
1.3.2	Contaminação no processamento	4
2	Norovírus, vírus da hepatite A e adenovírus humanos	5
2.1	Norovírus GI e GII	5
2.2	Vírus da hepatite A	6
2.3	Adenovírus humanos	7
3	Deteção de vírus em alimentos	8
3.1	Método clássico	8
3.2	Métodos com base em biologia molecular	8
4	Implementação de métodos de deteção de vírus em alimentos numa empresa	10
II.	Enquadramento e objetivos do trabalho	11
III.	Materiais e Métodos	12
1	Material de referência e amostras reais	12
1.1	Material de referência	12
1.2	Amostras alimentares	13
2	Deteção de vírus em amostras alimentares	13
2.1	Vírus de controlo de processo: vírus Mengo	13
2.2	Extração de partículas virais de vírus	14
2.3	Extração de ácidos nucleicos virais	14
2.4	Deteção de vírus por PCR e RT-PCR em tempo real	14
2.4.1	Métodos de deteção de norovírus e hepatite A por RT-PCR em tempo real	15
2.4.1.1	Norovírus	15
	Norovírus GI	15
	Norovírus GII	16
2.4.1.2	Hepatite A	16
2.4.2	Método de deteção de adenovírus por PCR em tempo real	16
2.5	Qualificação dos métodos de deteção	16
2.5.1	Limite de deteção (LOD)	16
2.5.2	Especificidade	17
2.5.3	Reprodutibilidade em equipamentos diferentes	17
2.6	Aplicação do método de deteção de vírus a amostras reais	17
3	Deteção e quantificação de adenovírus por PCR digital	17
3.1	Seleção do conjunto de primers e sondas	17
3.2	Método de deteção e quantificação de adenovírus por PCR digital	18
IV.	Resultados e discussão	20
1	Seleção dos métodos de deteção de vírus por PCR/RT-PCR em tempo real e seleção do kit de extração de ácidos nucleicos	20
1.1	Métodos de deteção de norovírus e adenovírus por PCR/RT-PCR em tempo real	21
1.1.1	Norovírus GI	21

1.1.2	Norovírus GII	22
1.1.3	Adenovírus	22
1.2	Seleção do <i>kit</i> de extração de ácidos nucleicos	23
1.2.1	Extração de ácidos nucleicos	23
1.2.2	Análise por espectrofotometria dos ácidos nucleicos extraídos	24
1.2.3	Seleção do <i>kit</i> de extração de ácidos nucleicos	26
1.3	Método de deteção de vírus da hepatite A por RT-PCR em tempo real	28
1.4	Qualificação dos métodos de deteção	30
1.4.1	Limite de deteção (LOD)	30
1.4.2	Especificidade	31
1.4.3	Reprodutibilidade dos métodos de deteção	31
2	Aplicação do método de deteção de vírus por PCR/RT-PCR a amostras reais	32
2.1	Extração de partículas virais	32
2.2	Vírus de controlo de processo	33
2.2.1	Curva padrão de RNA do vírus de controlo de processo	33
2.2.2	Eficiência da totalidade do processo de extração de ácidos nucleicos virais a partir de diferentes matrizes alimentares	34
2.3	Deteção de genomas virais em matrizes alimentares artificialmente contaminadas	36
3	Deteção e quantificação de adenovírus humanos por PCR digital	37
3.1	PCR digital	37
3.2	Estratégia para a deteção e quantificação de adenovírus humanos	37
3.2.1	Identificação das regiões conservadas	38
3.2.2	Seleção de primers e sondas	38
3.3	Deteção e quantificação de adenovírus por PCR digital	38
V.	Conclusão e perspetivas futuras	41
VI.	Referências	44
VII.	Anexos	47

Índice de Figuras

- Figura 1:** Exemplo de curvas de amplificação de experiências de otimização das condições para a detecção de ácidos nucleicos de NoV GI. Curvas a traço cheio preto: condições ótimas selecionadas utilizando o controlo proveniente do CEERAM (#KQNVGI); curvas a traço cheio cinzento: exemplos de outras condições testadas utilizando o controlo proveniente do CEERAM (#KQNVGI); curva com tracejado preto: controlo negativo utilizando as condições ótimas selecionadas; curvas com tracejado a cinzento: amplificação inespecífica nos controlos negativos com uso dos *primers* e sonda referidos na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b). 21
- Figura 2:** Exemplo de curvas de amplificação de experiências de otimização das condições para a detecção de ácidos nucleicos de NoV GII com duas concentrações de amostra ([A] e 100x[A]) utilizando como controlo positivo o controlo proveniente do CEERAM (#KQNVGII). Curvas a traço cheio preto: condições ótimas selecionadas; curvas a traço cheio cinzento: exemplo de outras condições de amplificação testadas; curva a tracejado: controlo negativo. 22
- Figura 3:** Exemplo de curvas de amplificação de experiências de otimização das condições para a detecção do controlo positivo de HAdVF41 da Vircell. Curvas a traço cheio preto: condições ótimas selecionadas; curvas a traço cheio cinzento: exemplo de outras condições de amplificação testadas; curva a tracejado preto: controlo negativo. 23
- Figura 4:** Gráfico da curva da absorvância (no eixo das ordenadas) em função do comprimento de onda (no eixo das abcissas) dos ácidos nucleicos extraídos de amostras de referência de NoV GI, NoV GII e HAdVC2, pelos métodos correspondentes aos *kits* A, B, C, D e E. (*) Procedimento seguindo o método experimental descrito pelo fabricante ou (**) Procedimento omitindo a adição de *carrier* RNA, no caso desta adição fazer parte do procedimento. 26
- Figura 5:** Curvas de amplificação de alguns replicados das extrações de ácidos nucleicos de NoV GI (Figura 5A), pelos *kits* A, B, e C, de NoV GII (Figura 5B) pelos *kits* A e D, e de HAdVC2 (Figura 5C) pelos *kits* A, D e E. A extração de ácidos nucleicos realizou-se seguindo o procedimento experimental descrito pelo fabricante ou omitindo a adição de *carrier* RNA, no caso desta adição fazer parte do procedimento. 28
- Figura 6:** Alinhamento múltiplo de sequências (MSA - *multiple sequence alignment*) de (Figura 6A) uma seleção de 4 genomas completos de HAV (~7,5 kb de comprimento) e (Figura 6B) detalhe de 500 bp da sequência que contem as zonas alvo dos conjuntos de *primers* e sonda descritos na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) e no método BAM26B (Williams-Woods et al. 2013). Aos números 1, 2, 3, e 4 correspondem genomas completos de HAV com os números de acesso no GenBank do NCBI M14707.1, M16632.1, K02990.1 e M20273.1, respetivamente. Na Figura 6B, a região 1 corresponde à zona alvo para detecção de HAV descrita na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) e a região 2 à zona alvo para detecção de HAV descrita no método BAM26B (Williams-Woods et al. 2013). 29

Figura 7: Exemplo de curvas de amplificação de experiências de otimização das condições para a deteção de ácidos nucleicos de HAV com três concentrações de amostra ([B], 10x[B] e 100x[B]). Curvas a traço cheio preto: condições ótimas selecionadas; curvas a traço cheio cinzento: exemplo de outra condição de amplificação testada; curva a tracejado preto: controlo negativo. 30

Figura 8: Exemplo de curvas padrão de amplificação de diluições decimais seriadas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de RNA do vírus Mengo e respetivo coeficiente de correlação de Pearson (r^2). Curvas padrão obtidas durante os ensaios de determinação da eficiência de recuperação nas seguintes matrizes: bivalves (◇), águas de consumo (△), e frutos vermelhos e bagas (□). 34

Figura 9: Gráficos da dispersão da fluorescência atribuída a cada poço de um chip em que se procedeu à amplificação de amostra de HAdVC1. O sinal correspondente ao fluoróforo FAM encontra-se no eixo das ordenadas e o sinal correspondente ao fluoróforo VIC no eixo das abcissas. Exemplo de diferenças na discriminação entre populações com (+) e sem (-) amplificação, quando efetuadas leituras ao ciclo 35 (A), ciclo 40 (B) e ao ciclo 45 (C), ao longo do programa de dPCR para a quantificação da amostra em questão. 39

Figura 10: Deteção e quantificação de HAdV por dPCR, em cópias/ μ l, nas amostras seguintes: (*) Controlo positivo de HAdV serótipo 1, quantificação realizada em quadruplicado; (**) DNA de concentração desconhecida extraído de HAdV serótipo 2 com o *kit* Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification quantificação realizada com um replicado; (***) Controlo positivo de HAdV tipo 5 fornecido pela Unidade de Serviços Analíticos do iBET (Oeiras, Portugal), quantificação realizada em duplicado; (****) Controlo negativo (NTC), experiência realizada em quadruplicado. 40

Figura 11: Alinhamento múltiplo de sequências (MSA - *multiple sequence alignment*) dos genomas completos de todos os 69 tipos HAdV descritos, um para cada tipo de HAdV, e detalhe do MSA da região conservada do gene do hexão. 60

Índice de tabelas

- Tabela 1:** Composição da mistura reacional para cada experiência de dPCR. O conjunto de *primers* e sondas é constituído por uma mistura de um *primer forward*, dois *primers reverse* e duas sondas tipo *Taqman*, todos degenerados, referidos na Tabela 22 do Anexo lh. 18
- Tabela 2:** Valores da concentração e da razão entre a absorvância a 260 nm e a 280 nm dos ácidos nucleicos extraídos de amostras de referência de NoV GI, NoV GII e HAdV, pelos métodos dos *kits* A (magnético), B (coluna), C (coluna), D (coluna) e E (magnético automático). 25
- Tabela 3:** LOD, em cópias genómicas por reação de amplificação, para os métodos de deteção montados para NoV GI, NoV GII e HAdV. 30
- Tabela 4:** Resultados da especificidade de cada método de deteção de vírus. Cada teste de especificidade foi efetuado com ácidos nucleicos de cada um dos vírus indicados e repetido em triplicado. (+): amplificação em cada um dos triplicados; (-): sem amplificação em nenhum dos triplicados. 31
- Tabela 5:** Resultados da reprodutibilidade dos métodos de deteção de cada um dos vírus em diferentes termocicladores. Cada teste foi efetuado com ácidos nucleicos de cada um dos vírus indicados e repetido em triplicado nos termocicladores iQ5 Real-Time PCR Detection Systems, 7500 Real-Time PCR System, e PikoReal Real-Time PCR System, e em duplicado no termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System. (+): amplificação em um dos replicados. 32
- Tabela 6:** Fator de diluição, eficiência e respetivo coeficiente de variação do processo de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos virais para os replicados de diferentes amostras nos diferentes tipos de matrizes alimentares em estudo: águas para consumo, frutos vermelhos e bagas, e bivalves. A eficiência do processamento das matrizes foi obtida recorrendo ao *kit* de controlo de processo adquirido ao CEERAM. O fator de diluição tem em conta as diluições provenientes do processo de extração de partículas virais e de extração de ácidos nucleicos. 35
- Tabela 7:** Resultados dos replicados da deteção das sequências alvo de NoV GI, NoV GII, HAdV e HAV nas matrizes alimentares em estudo: água engarrafada, framboesas, mirtilos, e mexilhões. Para cada replicado: (+) sequência viral alvo detetada; (-) sequência viral alvo não detetada. 36
- Tabela 8:** *Kits* utilizados para extração de ácidos nucleicos. 48
- Tabela 9:** *Kits* para RT-PCR e PCR em tempo real utilizados para a otimização dos métodos de deteção de vírus. Ambos os *kits* foram adquiridos à empresa Quanta Biosciences. 48
- Tabela 10:** Diferentes concentrações do conjunto de *primers* e sonda referido na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) testadas para a deteção de norovírus GI por RT-PCR em tempo real. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black*

Hole Quencher-1, BHQ-1. Nucleótidos degenerados: R - A ou G; Y - C ou T; N - A, T, C ou G. 49

Tabela 11: Diferentes condições de amplificação testadas para a detecção de norovírus GI por RT-PCR em tempo real (conjunto referido na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b)). O programa A foi testado com as concentrações do conjunto #1, o programa B foi testado com as concentrações do conjunto #2, o programa C foi testado com as concentrações dos conjuntos #1 e #3 e o programa D foi testado com as concentrações dos conjuntos #3, #4 e #5 apresentados na Tabela 10. 49

Tabela 12: Diferentes concentrações do conjunto de *primers* e sonda referido na norma norma EPA/600/R-10/181 (Fout et al. 2012) testadas para a detecção de norovírus GI por RT-PCR em tempo real. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. A afinidade do nucleótido degenerado [I] para os seus nucleótidos complementares segue a seguinte ordem: C>A>T~G. 50

Tabela 13: Diferentes condições de amplificação testadas para a detecção de norovírus GI por RT-PCR em tempo real (conjunto referido na norma EPA/600/R-10/181 (Fout et al. 2012)). O programa A foi testado com as concentrações do conjunto #1, o programa B foi testado com as concentrações dos conjuntos #1, #2 e #3, o programa C foi testado com as concentrações do conjunto #2 e o programa D foi testado com as concentrações dos conjuntos #2, #4 e #5 apresentados na Tabela 12. 50

Tabela 14: Diferentes concentrações do novo conjunto de *primers* e sonda (conjunto constituído por um *primer* descrito na literatura (Miura et al. 2013), um *primer* da norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) e a sonda da norma EPA/600/R-10/181 (Fout et al. 2012)) testadas para a detecção de norovírus GI por RT-PCR em tempo real. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. 50

Tabela 15: Diferentes condições de amplificação testadas para a detecção de norovírus GI por RT-PCR em tempo real (novo conjunto formado descrito na Tabela 14). O programa A foi testado com as concentrações do conjunto #1, o programa B foi testado com as concentrações do conjunto #2 e o programa C foi testado com as concentrações dos conjuntos #1, #2 e #3 apresentados na Tabela 14. 51

Tabela 16: Diferentes concentrações de *primers* e sonda testadas para detecção de norovírus GII por RT-PCR em tempo real (conjunto referido na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b)). As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3' A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. Nucleótidos degenerados: W – A ou T. 51

Tabela 17A: Diferentes condições de amplificação testadas para detecção de norovírus GII por RT-PCR em tempo real (conjunto referido na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b)). O programa A foi testado com as concentrações do conjunto #1, o programa B foi testado

- com as concentrações dos conjuntos #1, #2 e #3, o programa C foi testado com as concentrações dos conjuntos #2 e #4, o programa D foi testado com as concentrações do conjunto #2, o programa E foi testado com as concentrações dos conjuntos #2 e #3 e o programa F foi testado com as concentrações do conjunto #2 apresentados na Tabela 16. As restantes condições de amplificação testadas encontram-se na Tabela 17B. 52
- Tabela 17B:** Diferentes condições de amplificação testadas para detecção de norovírus GII por RT-PCR em tempo real (conjunto referido na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b)) (continuação). Os programas apresentados na tabela (G a L) foram testados com as concentrações do conjunto #2. 50
- Tabela 18:** Diferentes concentrações de primers e sonda testadas para detecção de HAV por RT-PCR em tempo real (conjunto referido no método BAM 26B/FDA (Williams-Woods et al. 2013)). As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3' A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. 53
- Tabela 19:** Diferentes condições de amplificação testadas para detecção de HAV por RT-PCR em tempo real (conjunto referido no método BAM 26B/FDA (Williams-Woods et al. 2013)). O programa A e B foram testados com as concentrações do conjunto #1 e #2 apresentados na Tabela 18. 53
- Tabela 20:** Diferentes concentrações de *primers* e sonda testadas para detecção de HAdV por PCR em tempo real. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. Nucleótidos degenerados: Y – C ou T. 53
- Tabela 21:** Diferentes condições de amplificação testadas para a detecção de HAdV por PCR em tempo real. O programa A foi testado com as concentrações do conjunto #1, o programa B foi testado com as concentrações do conjunto #2, o programa C foi testado com as concentrações dos conjuntos #1 e #2, o programa D foi testado com as concentrações do conjunto #3 e o programa E foi testado com as concentrações do conjunto #3 apresentados na Tabela 20. 54
- Tabela 22:** Conjunto de *primers* e sondas selecionado para detecção de HAdV e respetivo número de combinações diferentes de *primers* formados tendo em conta o número de oligonucleótidos degenerados. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. Nucleótidos degenerados: Y – C ou T; V – A, C ou G; R – A ou G; S – C ou G; D – A, G ou T. 54
- Tabela 23:** Diferentes concentrações testadas para cada conjunto de *primers* degenerados e sondas degeneradas. (F:R:S): proporção relativa de cada *primer forward* (F), *primer reverse* (R) e sonda (S) únicos das misturas de *primers* e sondas degenerados. 55
- Tabela 24:** Condições de amplificação testadas para detecção de HAdV por dPCR. 55
- Tabela 25:** Concentração final de cada *primer* e sonda selecionados para o método de detecção de NoV GI. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A

- sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. A afinidade do nucleótido degenerado [I] para os seus nucleótidos complementares segue a seguinte ordem: C>A>T~G. 56
- Tabela 26:** Concentração final de cada *primer* e sonda selecionados para o método de detecção de NoV GII. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. Nucleótidos degenerados: W – A ou T; R – A ou G. 56
- Tabela 27:** Concentração final de cada *primer* e sonda selecionados para o método de detecção de HAV. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. 56
- Tabela 28:** Concentração final de cada *primer* e sonda selecionados para o método de detecção de HAdV. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. Nucleótidos degenerados: Y – C ou T. 57
- Tabela 29:** Composição das reações de RT-PCR em tempo real para a detecção de vírus de RNA. O volume total da mistura reacional é de 20 µL. 58
- Tabela 30:** Condições de amplificação finais selecionadas para a detecção de vírus de RNA por RT-PCR em tempo real. 58
- Tabela 31:** Composição das reações de PCR em tempo real para detecção de vírus de DNA. O volume total da mistura reacional é de 20 µL. 58
- Tabela 32:** Condições de amplificação finais selecionadas para detecção de vírus de DNA por PCR em tempo real. 59
- Tabela 33:** Conjunto de *primers* e sondas selecionado para detecção e quantificação de HAdV, quantidade de *primers* e sondas distintos nas misturas degeneradas, e respectivas concentrações selecionada. As sequências dos *primers* e sonda são apresentadas no sentido 5' > 3'. A sonda está marcada com os seguintes fluoróforos: 6-carboxifluoresceína, 6-FAM; *Black Hole Quencher-1*, BHQ-1. Nucleótidos degenerados: Y – C ou T; V – A, C ou G; R – A ou G; S – C ou G; D – A, G ou T. 60
- Tabela 34:** Condições de amplificação otimizadas para a detecção de HAdV por dPCR. 60

Índice de Anexos

Anexo I	47
Anexo Ia - Protocolos de extrações de matrizes alimentares	47
Anexo Ib - Kits de extração de ácidos nucleicos	48
Anexo Ic - Kits para RT-PCR e PCR em tempo real	48
Anexo Id – Otimização do conjunto de primers e sonda e das condições de amplificação para deteção de norovírus GI	49
Anexo Ie – Otimização do conjunto de primers e sonda e das condições de amplificação para deteção de norovírus GII	51
Anexo If – Otimização do conjunto de primers e sonda e das condições de amplificação para deteção de hepatite A	53
Anexo Ig – Otimização do conjunto de primers e sonda e das condições de amplificação para deteção de adenovírus	53
Anexo Ih - Otimização do conjunto de primers e sondas e das condições de amplificação para deteção de adenovírus por dPCR	54
Anexo II	56
Anexo IIa - Conjuntos finais de primers e sonda de cada vírus selecionados	56
Anexo IIb - Composição das reações de PCR e de RT-PCR e condições de amplificação otimizadas	58
Anexo IIc – Seleção do conjunto de primers e sondas para deteção de adenovírus	60
Anexo IId – Condições de amplificação otimizadas para deteção de adenovírus humanos por PCR digital	60

I. Introdução

1 Segurança alimentar e vírus

1.1 Segurança alimentar

A segurança alimentar é uma prioridade mundial. Enquanto segurança alimentar entendem-se as condições e práticas de produção de alimentos, bem como o seu transporte e armazenamento, que preservem a sua qualidade e evitam a sua contaminação, impedindo o aparecimento de doenças de origem alimentar. Estas práticas são na sua maioria semelhantes internacionalmente e permitem reduzir problemas de ordem sanitária nas relações comerciais de modo a que as populações possam atender de forma segura às suas necessidades alimentares (Havelaar et al. 2004; Newell et al. 2010; Ercsey-Ravasz et al. 2012; Richards 2001). Diversas organizações, tais como a WHO (World Health Organization, ONU), FAO (Food and Agriculture Organization, ONU), EFSA (European Food Safety Authority, UE), e FDA (Food and Drug Administration, EUA), visam facilitar a prevenção, deteção e resposta a perigos para a saúde pública associados a alimentos, bem como garantir a confiança do consumidor nas suas autoridades competentes e na segurança do abastecimento alimentar (Newell et al. 2010; FAO & WHO 2010; Havelaar et al. 2004).

Nas últimas décadas, a qualidade e segurança dos alimentos e da água para consumo, bem como as suas implicações na saúde pública, têm adquirido uma importância crescente para as autoridades competentes (Mattison & Bidawid 2009; Havelaar et al. 2004). De facto, os alimentos podem conter substâncias consideradas indesejáveis e perigosas. Estas substâncias, estranhas a um determinado alimento, podem ser de natureza física, química ou biológica. Elas podem alterar a composição e/ou características originais dos alimentos e assim acabar por afetar a saúde do consumidor. Mesmo sem apresentar nenhuma alteração óbvia, tal como o aspeto visual, o sabor ou o aroma, um alimento pode ainda assim comprometer de alguma forma o estado de saúde do consumidor (Newell et al. 2010; Koopmans & Duizer 2004). Geralmente, as doenças de origem alimentar causadas por microrganismos, como parasitas, fungos, bactérias e vírus, têm uma natureza infecciosa ou tóxica (Scallan et al. 2011).

Os alimentos podem ser contaminados por microrganismos em diferentes pontos da cadeia alimentar, desde o seu ponto primário de produção até ao momento final do seu consumo (Ercsey-Ravasz et al. 2012). Se considerarmos a globalização do comércio de produtos alimentares, estes perigos podem acabar por afetar muitas pessoas ao mesmo tempo (Taylor & Nat 2011). Outras causas que podem contribuir para problemas de segurança alimentar são a globalização do comércio, a facilidade e o aumento do número de viagens entre zonas remotas, as lacunas nas práticas de higiene em certas regiões do globo, e a apetência crescente das sociedades modernas para consumir produtos exóticos (Taylor & Nat 2011; Ercsey-Ravasz et al. 2012)

O aumento da densidade populacional tem um impacto sobre o ambiente, por exemplo através da existência de descargas não controladas de águas residuais, tornando-se um desafio encontrar águas limpas para utilização nas práticas agrícolas, na pecuária e na aquicultura (Richards 2001; Myrmet et al. 2004; Appleton 2000). Estas fontes ambientais de contaminação podem conter uma mistura de agentes patogénicos, tanto humanos quanto animais, o que demonstra o potencial de entrada de agentes patogénicos na cadeia alimentar e a necessidade de conseguir controlar essas vias (Taylor & Nat 2011). Também se prevê que a alteração climática cause impacto na segurança alimentar, devido às alterações de temperaturas na produção, armazenamento e distribuição de alimentos (Richards 2001; Lee et al. 2015).

A WHO calculou em 2010 que tenham existido cerca de 582 milhões de casos de 22 tipos diferentes de doenças entéricas de origem alimentar e cerca de 351 000 mortes no mundo devido às mesmas, tendo a África registado o número mais elevado, seguida pelo Sudoeste Asiático (WHO 2015; World Health Organization 2015). É de notar que cerca de 40% destas pessoas são crianças com idade inferior a 5 anos (World Health Organization 2015). Por sua vez, o CDC (Centre for Disease Control, USA) estima que anualmente cerca de 1 em 6 americanos (ou seja 48 milhões de pessoas) fiquem doentes, 120 000 tenham que ser hospitalizados e 3 000 morram devido a doenças causadas por alimentos (CDC 2014). As doenças transmitidas por alimentos constituem, portanto, um problema de Saúde Pública crescente e mundial.

Parte significativa de todas as doenças transmitidas por alimentos reportadas são causadas por *Salmonella*, vírus, toxinas bacterianas, e *Campylobacter*, sendo os vírus considerados a segunda causa mais comum de surtos de origem alimentar (EFSA e ECDC 2015). Em 2012, estimava-se que os vírus eram responsáveis por aproximadamente 14% de todos os surtos de doenças transmitidas por alimentos comunicadas na União Europeia (EFSA e ECDC 2014). A EFSA refere que este valor aumentou, em 2013, para 18% (EFSA e ECDC 2015).

Em 2015 os agentes de doenças entéricas responsáveis pela maioria das mortes foram *Salmonella typhi* (52 000 mortes), *Escherichia coli* enteropatogênica (37 000 mortes) e norovírus (NoV) (35 000 mortes) (WHO 2015), mostrando que os vírus presentes em alimentos continuam a representar um problema para a saúde humana.

1.2 Vírus presentes em alimentos

Atualmente, os vírus descritos com capacidade de infetar os seres humanos estão agrupados em 22 famílias. Pelo menos 10 destas famílias foram documentadas como sendo responsáveis pela transmissão de doenças de origem alimentar sendo que essas doenças podem variar de diarreia leve a encefalite grave (EFSA 2011a). A maioria dessas infeções transmitidas por vírus em alimentos podem dever-se a más práticas de higiene, quer por contaminação das matérias-primas, quer por contaminação pelos manipuladores de alimentos durante a sua produção. É o caso dos vírus entéricos transmitidos através da via fecal-oral, que

estão potencialmente presentes nos alimentos que tenham estado em contato com matéria fecal ou em contacto com pessoas infetadas (Vasickova et al. 2005). Após a ingestão, estes vírus podem infetar o hospedeiro, invadir as células do revestimento epitelial do intestino, e subsequentemente replicar nesse e/ou noutro local do organismo (EFSA 2011a; Scallan et al. 2011; Koopmans & Duizer 2004).

Entre os vírus entéricos existem vários agentes causadores de gastroenterites, tais como NoV, sapovírus, astrovírus, rotavírus e adenovírus (hAdV), e também os agentes causadores das hepatites A e E, os vírus da hepatite A (HAV) e hepatite E, respetivamente. Devido ao grande número de surtos de infeções de origem alimentar associados a norovírus dos genogrupos I (NoV GI) e II (NoV GII) e HAV, estes têm sido considerados os mais relevantes do ponto de vista da segurança alimentar (Koopmans & Duizer 2004; Taylor & Nat 2011).

Entre os alimentos com maior risco de contaminação por vírus entéricos estão: i) os moluscos bivalves, devido à sua elevada capacidade de filtrar e concentrar os vírus que podem estar presentes na água; ii) os vegetais e legumes e iii) os frutos vermelhos e bagas (Taylor & Nat 2011; Myrmel et al. 2004; Richards 2001). Qualquer um deles pode apresentar um risco elevado de contaminação viral devido à possibilidade de ter estado em contacto com água contaminada com matéria fecal (Myrmel et al. 2004). Uma vez que estes alimentos são normalmente consumidos crus ou levemente cozidos, o risco de infeção acaba por não ser diminuído pelo processamento do alimento (Richards 2001).

Em 2008, na Europa, os crustáceos, os moluscos e seus derivados foram implicados em surtos de doenças associadas a vírus transmitidos por alimentos (NoV e HAV) (EFSA 2011a). Em 2013, um dos maiores problemas foram os surtos causados pelo HAV presente em morangos e bagas, que afetaram 315 indivíduos em 11 países europeus (European Commission. 2013; EFSA Panel on Biological Hazards 2014). No entanto, pensa-se que a maioria das viroses transmitidas por alimentos não seja reportada ou seja sub-diagnosticada. Isto deve-se ao facto de muitos indivíduos afetados não procurarem ajuda médica quando apresentam sintomas que podem estar associados a certas doenças virais de origem alimentar, como por exemplo gastroenterites. Também pode ser justificado porque esses indivíduos, após entrada no hospital, não são submetidos a análises de diagnóstico, ou então devido aos hospitais não reportarem os casos identificados e tratados (EFSA 2011a; EFSA e ECDC 2015).

1.3 Processo de contaminação de alimentos por vírus

Conforme referido anteriormente, a presença de vírus em alimentos pode dever-se à existência de uma contaminação inicial da matéria-prima, ou a uma contaminação durante o processo de produção. Compreender estas fontes de infeção potenciais e diferentes é importante porque a ecologia da doença é diferente para cada uma das origens de contaminação (Koopmans & Duizer 2004; Koopmans et al. 2002).

1.3.1 Contaminação na fonte

A contaminação de alimentos na fonte ocorre quando o alimento é contaminado durante a sua produção primária, como tem sido observado em certos produtos frescos, tais como bagas, ou moluscos bivalves (Le Guyader et al. 2006; van den Berg et al. 2005). A natureza da contaminação pode variar muito dependendo do local de produção e da possibilidade de contaminação por águas residuais, sendo nesses casos os NoV e o HAV considerados como preocupações prioritárias (FAO/WHO 2008).

Nas águas residuais, que podem contaminar a água usada para a rega, podem estar presentes múltiplos agentes patogénicos. O consumo de alimentos regados com essas águas contaminadas pode levar a uma infeção com mais de um tipo de vírus em simultâneo. Esta exposição simultânea a misturas de vírus pode levar a um aumento da probabilidade de recombinação e/ou rearranjo dos genomas virais quando o consumidor é infetado após consumir alimentos contaminados por diversos vírus (Le Guyader et al. 2006; Koopmans & Duizer 2004; Dong et al. 2008).

Este modo de transmissão envolve tipicamente os vírus humanos mais comuns que estão presentes em abundância nas águas residuais, uma vez que alguns métodos frequentemente usados para o tratamento de águas residuais podem não ser suficientes para remover ou inativar de forma eficaz esses vírus (FAO/WHO 2008; Myrmel et al. 2004; Wolf et al. 2010; Iwai et al. 2009; van den Berg et al. 2005).

1.3.2 Contaminação no processamento

A contaminação associada ao processamento manual de alimentos resulta do contacto entre um alimento e um manipulador infetado com o vírus. Os vírus podem ser facilmente transmitidos pela pele humana (e.g. mãos) ou por aerossóis diretamente para alimentos ou indiretamente para superfícies que servem como uma fonte secundária de contaminação se entrarem em contacto com alimentos (FAO/WHO 2008). O impacto potencial destas ocorrências de contaminação depende do tipo de produto e da sua preparação (EFSA 2011a). Todos os alimentos que são manipulados manualmente e não são posteriormente submetidos a um tratamento eficaz (e.g. temperatura, pressão, radiação) antes do seu consumo têm um potencial de risco. Certos tratamentos, como por exemplo o congelamento, não são suficientes para inativar alguns agentes patogénicos virais (FAO/WHO 2008; EFSA 2011a).

Existem inúmeros relatos de surtos virais associados ao processamento manual de alimentos (Koopmans & Duizer 2004; EFSA 2011a; Greig et al. 2007). A principal preocupação em casos de contaminação no processamento são os NoV que são a causa mais comum de gastroenterite em todos os grupos etários, mas surtos com vários outros vírus entéricos são possíveis, tais como com os HAV (FAO/WHO 2008; EFSA 2011a). Estes eventos de contaminação não estão no entanto limitados a indivíduos sintomáticos (FAO/WHO 2008; Okabayashi et al. 2008).

2 Norovírus, vírus da hepatite A e adenovírus humanos

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que contêm um genoma de RNA ou de DNA associado a proteína, por vezes constituindo uma capa protetora. Têm dimensões muito reduzidas com diâmetros médios que variam entre 0,25 e 0,40 µm, os maiores podendo ter cerca de 0,50 µm de diâmetro e 0,7 – 1 µm de comprimento (Robert & Wagner 2016; Koopmans & Duizer 2004). Como já foi referido anteriormente, é possível ocorrer transmissão de vírus em alimentos devido a más práticas de saneamento, quer seja por manipuladores de alimentos infetados ou durante a produção de alimentos (EFSA e ECDC 2014; EFSA e ECDC 2015). Alimentos contaminados por vírus podem levar à infeção do hospedeiro após a ingestão, invasão das células do revestimento epitelial do intestino, e replicação subsequente no mesmo local ou noutra local no corpo (EFSA 2011a).

Como foi já mencionado, um número crescente de surtos de gastroenterites tem vindo a ser atribuído a diferentes tipos de vírus, sendo considerados a segunda causa mais comum de surtos de origem alimentar. Entre esses vírus associados à transmissão de doenças por alimentos destacam-se os NoV, o HAV e os adenovírus humanos (HAdV) (Koopmans et al. 2002; Bosch, Bidawid, et al. 2011; EFSA e ECDC 2015).

2.1 Norovírus GI e GII

Os NoV, membros da família *Caliciviridae*, são vírus sem invólucro, com uma cápside icosaédrica de 27 – 40 nm de diâmetro e contendo um genoma de RNA de cadeia simples, de sentido positivo, de aproximadamente 7 Kb (Food 2009). Os NoV podem ser classificados em cinco genogrupos principais, sendo os membros pertencentes aos genogrupos I, II e IV capazes de infetar humanos. No genogrupo II também podem ser encontrados vírus com a capacidade de infetar porcos e no genogrupo III vírus que infetam gado (Jothikumar, Lowther, et al. 2005; Taylor & Nat 2011).

Os NoV podem ser transmitidos através do contato pessoa-a-pessoa ou por aerossóis formados durante e após o vómito. O consumo de alimentos, como mariscos crus, frutos, saladas e vegetais crus, ou água, diretamente contaminados por matéria fecal ou excreções gástricas são também fonte de infeção (Vasickova et al. 2005). A facilidade de propagação de NoV é devido principalmente à sua baixa dose infecciosa, sendo 10 a 100 partículas virais suficientes para causar uma infeção, à sua resistência elevada a desinfetantes, e à sua estabilidade e persistência no ambiente (Taylor & Nat 2011; Greig et al. 2007; Todd et al. 2008). Esta estabilidade e persistência longa dos NoV em superfícies contaminadas utilizadas em áreas de preparação de alimentos também pode ser uma contribuição substancial para a transmissão destes vírus. Além disso, os NoV são resistentes a muitos dos métodos de conservação usados na indústria alimentar e podem ser resistentes à refrigeração, congelação, acidificação e embalagem em atmosfera protetora modificada (Baert et al. 2011; EFSA 2011a).

Os sintomas das infeções causadas por NoV geralmente apresentam-se na forma de vômito agudo, diarreia aquosa não sanguinolenta com cólicas abdominais, e náuseas, o que pode tornar esta doença muito debilitante. Para além destes sintomas podem igualmente ocorrer dores de cabeça, febre baixa, e dores musculares (EFSA 2011a). Os sintomas geralmente persistem por 12 a 72 horas, com um período médio de 24 a 48 horas (EFSA 2011a; Bresee et al. 2002). No entanto, para pacientes hospitalizados, pessoas imunodeprimidas, e pessoas idosas, os sintomas levam mais tempo a desaparecer, entre 72 e 96 horas, podendo os sintomas não específicos, tais como dor de cabeça, sede, e vertigem, persistir até 19 dias (Bresee et al. 2002; Food 2009; EFSA 2011a). A recuperação é geralmente completa e sem efeitos a longo prazo (FAO/WHO 2008; Food 2009). Estudos sugerem que algumas pessoas infetadas com NoV não exibem nem sintomas nem doença gastrointestinal associados, mas ainda assim excretam elevados níveis de vírus nas fezes (Green et al. 2010; EFSA 2011a).

Para a maioria das pessoas, o tratamento da infeção por NoV é favorável e consiste, para além de descanso, na reidratação oral e, se necessário, na substituição intravenosa de eletrólitos (Bresee et al. 2002). Atualmente não há medicação antiviral nem vacinas disponíveis para tratar e evitar estas infeções por NoV (CDC 2013).

2.2 Vírus da hepatite A

O HAV, família *Picornaviridae*, género *Hepatitisvirus*, tem um genoma composto por uma cadeia simples de RNA de sentido positivo, de aproximadamente 7,5 Kb (WHO 2005; Konduru & Kaplan 2006). O HAV é um vírus sem invólucro viral, hidrofóbico, com 27 a 32 nm de diâmetro, e com simetria icosaédrica com 20 lados (WHO 2000; Konduru & Kaplan 2006).

Estão descritos seis genótipos de HAV (I-VI) que derivam da análise da sequência do seu genoma. Nos genótipos I, II, e III estão representadas estirpes associadas a infeções em humanos, estando a maioria dessas estirpes agrupadas nos genótipos I e III. Nos genótipos IV, V, e VI podemos encontrar a maioria das estirpes responsáveis pela infeção de primatas não-humanos (Taylor & Nat 2011; Sánchez et al. 2007).

O HAV é transmitido por via fecal-oral, através do contacto pessoa-a-pessoa ou por transmissão pela água em locais onde existe falta de condições de saneamento (Food 2009). Nos países industrializados a transmissão pessoa-a-pessoa é rara e surtos de HAV estão associados à propagação através de alimentos contaminados. Os surtos têm sido frequentemente associados ao consumo de marisco, quer cru quer inadequadamente preparado, cultivado em águas contaminadas (Taylor & Nat 2011; Todd et al. 2008; Food 2009).

Presume-se que a dose infecciosa do HAV seja baixa, 10 a 100 partículas virais, embora a dose exata seja desconhecida (Food 2009). A infeção pelo HAV pode ser assintomática ou sintomática. As infeções são geralmente assintomáticas em crianças menores de 6 anos de idade e sintomática em crianças e adultos mais velhos (EFSA 2011a; WHO 2000). Os sintomas associados à infeção por HAV incluem febre, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, mialgia,

hepatite e, muitas vezes, icterícia, sendo que esta ocorre geralmente 5 a 7 dias após o início dos sintomas (WHO 2000). Em pacientes sintomáticos, a fase de incubação é de cerca de 30 dias, podendo variar de 15 a 50 dias. As partículas virais são excretadas em altas densidades nas fezes de doentes sintomáticos e assintomáticos, podendo estas continuar a ser excretadas em níveis elevados até 36 dias pós-infecção (Todd et al. 2008; WHO 2000). A recuperação é geralmente completa após uma ou duas semanas, embora possa durar até 2 meses em algumas pessoas.

2.3 Adenovírus humanos

Na família *Adenoviridae*, os HAdV pertencem ao género *Mastadenovirus* que contém 7 espécies: HAdV-A a HAdV-G (Buckwalter et al. 2012). Os HAdV são vírus de tamanho médio (65-80 nm), sem invólucro, de simetria icosaédrica, com genoma de DNA de cadeia dupla. Mais de 50 tipos de adenovírus imunologicamente distintos podem provocar infeções em humanos (Ghebremedhin 2013).

Os HAdV são transmitidos por via fecal-oral, através do contacto pessoa-a-pessoa, da ingestão de água e alimentos contaminados ou que estiveram em contacto com superfícies contaminadas (EFSA 2011b). Os HAdV também podem igualmente ser transmitidos através de águas de recreio, como a água de piscinas, embora seja uma forma menos comum (WHO 2005).

Os HAdV podem causar uma variedade de doenças clínicas, que incluem conjuntivite, gastroenterite, hepatite, miocardite e pneumonia. A maioria destes ocorre em crianças com idade inferior a 5 anos e geralmente estas doenças desaparecem espontaneamente sem tratamento específico (Pehler-Harrington et al. 2004). Idosos e crianças com um sistema imunológico mais vulnerável, podem ser portadores assintomáticos de infeções por HAdV e assim transmitir o vírus durante meses por meio das diversas formas de transmissão (CDC 2015).

Das sete espécies de HAdV referidas, a espécie A está associada a doenças gerais do trato gastrointestinal, enquanto as espécies B e C são associadas de forma mais comuns a doenças do trato respiratório. Por seu lado a espécie D provoca principalmente conjuntivite e a espécie E está frequentemente associada a conjuntivites bem como outras infeções oculares e respiratórias. Por fim, as espécies F e G são descritas como agentes causadores de gastroenterite (Buckwalter et al. 2012; Stroparo et al. 2010; Ghebremedhin 2013).

Os HAdV com os serótipos 40 e 41, pertencentes à espécie F, são os principais responsáveis por gastroenterites virais agudas em crianças (Wrigley 2007). Estes serótipos são particularmente difíceis de isolar uma vez que crescem lentamente em cultura celular. A técnica de PCR em tempo real tem oferecido uma alternativa rápida e sensível aos métodos de deteção clássicos (Buckwalter et al. 2012; Jothikumar, Cromeans, et al. 2005).

3 Detecção de vírus em alimentos

Existem inúmeros desafios para o desenvolvimento e seleção de métodos para detetar vírus entéricos em alimentos e amostras ambientais. Os vírus presentes em alimentos, cuja dose infecciosa pode ser reduzida, requerem métodos tanto sensíveis como específicos. A deteção de vírus tem sido realizada por propagação em cultura de células e por deteção dos genomas virais alvo por técnicas de biologia molecular, sendo a cultura de células considerada o *gold standard* (Mattison & Bidawid 2009).

3.1 Método clássico

Uma vez que os vírus recorrem à maquinaria das células hospedeiras para se replicarem, a cultura celular tem sido o método clássico usado para a sua deteção uma vez que permite o aumento do número inicial de partículas virais facilitando assim a identificação da sua presença. A cultura celular baseia-se na propagação de células animais ou vegetais num ambiente artificial favorável. Essas células podem ser diretamente removidas do tecido de interesse, sendo desagregadas por meios enzimáticos ou mecânicos antes da sua propagação, ou então cultivadas a partir de uma linha celular pré-estabelecida (Kayser et al. 2005; Tortora et al. 2012). A infeção de culturas celulares por vírus pode ser monitorizada por microscopia ótica, coloração imunológica com um painel de anticorpos, ou por biologia molecular selecionando o alvo apropriado (Mattison & Bidawid 2009).

Apesar da cultura celular ser um método que permite a multiplicação e subsequente deteção de vírus, existem determinados vírus que não são cultiváveis com sucesso por esta técnica (Duizer et al. 2004; Straub et al. 2007; Tanaka et al. 2007). Como tal, estes métodos de cultura celular não podem ser utilizados nestes casos específicos em que não há infeção e/ou amplificação das partículas virais.

3.2 Métodos com base em biologia molecular

Os vírus que contaminam alimentos estão presentes em baixos níveis nesses alimentos contaminados e grande parte desses vírus não é facilmente detetável por métodos de propagação em células animais. Para além do mais, não existem métodos de rotina para a cultura de alguns desses vírus. Os métodos com base em biologia molecular apresentam uma alternativa que pode e muitas vezes tem de ser usada para detetar ácidos nucleicos virais presentes nessas amostras (Mattison & Bidawid 2009; Nugen & Baeumner 2008; López-Campos et al. 2012).

A utilização de métodos de biologia molecular, baseados em PCR e PCR associado a transcrição reversa (*reverse transcriptase* PCR ou RT-PCR), permite ultrapassar algumas das limitações dos métodos clássicos, para o caso de vírus de DNA e de RNA, respetivamente. Nas últimas décadas, estes ensaios permitiram revolucionar a deteção de ácidos nucleicos pela rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade do método. Estes métodos são largamente utilizados

no campo da virologia em alimentos e estão em permanente evolução (Koopmans & Duizer 2004; Vasickova et al. 2005; López-Campos et al. 2012).

É essencial que a especificidade, a gama de vírus detetáveis, e a sensibilidade dos ensaios por PCR e RT-PCR sejam demonstradas. Todos estes pontos estão relacionados e dependem principalmente das sequências alvo de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) e sondas. Os alvos selecionados devem garantir que o objetivo da detecção pretendida seja cumprido, tais como obter a maior especificidade possível, e atingir o equilíbrio entre elevada sensibilidade, eficiência da reação, e fiabilidade dos resultados (FAO/WHO 2008).

Embora as técnicas de biologia molecular permitam ultrapassar as limitações da cultura celular, existem ainda assim diversas limitações nestas técnicas (López-Campos et al. 2012). Os obstáculos que podem influenciar essa detecção de vírus em alimentos incluem a baixa eficiência dos procedimentos de extração e de concentração de ácidos nucleicos e a presença de inibidores das reações moleculares nas amostras (FAO/WHO 2008).

O RT-PCR e PCR em tempo real recorrendo a sondas de hidrólise permite fazer em simultâneo a amplificação e a detecção ou até mesmo a quantificação do produto, reduzindo ou até mesmo eliminando a necessidade da posterior manipulação dos produtos amplificados (Dung et al. 2013; Life Technologies 2012). Contrariamente, a maioria dos ensaios de RT-PCR e PCR convencionais são qualitativos e a quantidade inicial de DNA apenas pode ser estimada semi-quantitativamente com base no resultado da corrida electroforética associada a um marcador quantitativo (Mattison & Bidawid 2009). Os resultados de RT-PCR e PCR em tempo real podem ser obtidos em tempo reduzido, o que torna estas técnicas consideravelmente mais rápidas que as suas versões convencionais. O RT-PCR e PCR em tempo real, para além da rapidez, têm aumentado consideravelmente a sensibilidade dos métodos de detecção baseados em amplificações convencionais (Bosch, Sánchez, et al. 2011; Buckwalter et al. 2012; Life Technologies 2012).

Relativamente ao RT-PCR em tempo real podem seguir-se duas abordagens diferentes. A primeira inclui o passo de síntese de cDNA e de amplificação no mesmo tubo (*one-step* RT-PCR). A segunda envolve a síntese de cDNA independente do passo de amplificação (*two-step* RT-PCR) (Wacker & Godard 2005; Life Technologies 2012). Existem vantagens e desvantagens para ambas as abordagens que devem ser consideradas antes de se escolher a melhor. O *one-step* RT-PCR é mais simples e fácil uma vez que envolve menos pipetagens e passos de manuseamento o que pode reduzir a possibilidade de contaminações, mas não fornece a flexibilidade e controlo que é possível com o *two-step* RT-PCR (Wacker & Godard 2005; Life Technologies 2012).

Para facilitar a aplicação de métodos que permitam a detecção de organismos patogénicos existem organizações que desenvolvem normas com requisitos, especificações, guias e características cujo objetivo é garantir que determinado método é adequado à sua finalidade. A ISO (International Organization for Standardization) é a maior dessas organizações no mundo, com 164 membros, desenvolvendo normas internacionais que uniformizam certos métodos de análises, permitindo desta forma a implementação dos mesmos

e a comparação de resultados analíticos entre continentes. As normalizações e padronizações resultantes da implementação destas normas contribuem para facilitar o comércio internacional uma vez que hoje mais do que nunca, os produtos alimentares cruzam regularmente as fronteiras das nações em todas as fases da cadeia de abastecimento, desde a exploração agrícola até ao momento do consumo de alimentos e águas.

O único método normalizado disponível para a deteção de vírus em alimentos encontra-se descrito na norma ISO/TS 15216-2:2013 que se destina à deteção de NoV e HAV em alimentos como marisco, frutos vermelhos, produtos frescos e águas engarrafadas (EFSA Panel on Biological Hazards 2014; ISO 2013b). Esta norma fornece informações sobre como extrair os vírus a partir das diferentes matrizes alimentares, como extrair os ácidos nucleicos a partir dos vírus extraídos, e quais os métodos a usar para detetar as sequências alvo nos ácidos nucleicos extraídos. Após a extração de partículas virais a partir da amostra a ser analisada, os ácidos nucleicos virais são extraídos por lise com agentes caotrópicos e subsequente adsorção a partículas de sílica. As sequências alvo no RNA ou no DNA viral são amplificadas e detetadas por RT-PCR ou PCR em tempo real (ISO 2013b). Esta abordagem é também aplicada para a deteção de outros vírus humanos presentes em alimentos, nas suas superfícies, ou outras superfícies seguindo a validação adequada bem como o uso de conjuntos de *primers* e sondas dirigidos a alvos específicos.

4 Implementação de métodos de deteção de vírus em alimentos numa empresa

Embora doenças de origem alimentar associadas a vírus sejam um problema significativo, os alimentos raramente são consistentemente testados para contaminação viral, sendo estes testes geralmente limitados aos moluscos bivalves (EFSA 2011a; FAO/WHO 2008). Frequentemente existem suspeitas de um surto ser de origem viral, mas devido à falta de métodos que nos permitam detetar todos os vírus de origem alimentar que possam estar presentes numa amostra, essa suposição raramente pode ser confirmada experimentalmente. Torna-se, portanto, essencial a implementação de técnicas de rotina para detetar a presença de vírus em alimentos (Koopmans & Duizer 2004).

Do ponto de vista de uma empresa que queira apresentar soluções de biologia molecular na área agroalimentar é fundamental o desenvolvimento de métodos que permitam a deteção destes vírus em amostras alimentares de forma rápida e segura. Estes métodos de deteção podem existir sob a forma de *kit*, para que os clientes possam realizar a deteção nas suas empresas/indústrias, ou sob a forma de serviço, em que os clientes enviam a amostra a analisar para um laboratório e recebem os resultados da análise (López-Campos et al. 2012).

II. Enquadramento e objetivos do trabalho

Os vírus são microrganismos de dimensões reduzidas, geralmente da ordem de grandeza de um centésimo do tamanho da maioria das bactérias, compostos por um genoma de DNA ou RNA geralmente envolvido por proteínas. Ao contrário das bactérias, os vírus apenas se conseguem multiplicar no interior das células vivas dos seus organismos hospedeiros. Muitos vírus apresentam uma resistência elevada a condições ambientais tais como a temperatura, tanto o calor como o frio, a atividade de água reduzida e a radiação ultravioleta, podendo, portanto, sobreviver por longos períodos de tempo no meio ambiente, tal como em alimentos.

Para além dos riscos químicos, físicos e nutricionais, os riscos biológicos de origem alimentar, onde os vírus se incluem, têm sido um desafio permanente na alimentação humana. Considerada a segunda causa mais comum de surtos de doenças de origem alimentar, a presença de certos vírus em alimentos representa um problema crescente para a saúde pública mundial uma vez que estes vírus podem provocar numerosas doenças, entre as quais gastroenterites e hepatites. Torna-se por isso essencial desenvolver métodos fiáveis que permitam identificar a sua presença em alimentos e águas.

O desenvolvimento e a seleção de métodos de diagnóstico, rápidos, fiáveis, tecnologicamente avançados, e que permitam detetar microrganismos reconhecidamente patogénicos ou considerados patogénicos emergentes, como é o caso dos vírus em alimentos e águas, é um processo complexo. Para tal, muitas considerações devem ser tidas em conta, tais como o método selecionado, a sua origem, robustez e precisão, bem como a sua validação. É necessário seguir as melhores práticas nos laboratórios de análises de alimentos para garantir uma segurança alimentar eficaz. Os principais fatores que levam à seleção de um método de deteção dependem de uma combinação da sua sensibilidade/especificidade, repetibilidade, eficiência da reação, e fiabilidade dos resultados, bem como do seu custo.

O desenvolvimento de novos serviços e produtos revela-se essencial na estratégia de crescimento e desenvolvimento de uma empresa que analisa alimentos. Desta forma a presente dissertação de mestrado tem como principal objetivo de trabalho o desenvolvimento de métodos de deteção de vírus em diferentes matrizes alimentares. Para tal, consideram-se os seguintes objetivos:

1. Identificação, seleção e recolha de amostras de matrizes alimentares relevantes para o estudo: bagas e frutos vermelhos, bivalves e águas de distribuição de diferentes locais;
2. Extração de partículas virais de diferentes vírus, NoV GI e GII, HAV e HAdV, das matrizes alimentares selecionadas;
3. Otimização da extração de ácidos nucleicos virais dos diferentes vírus extraídos a partir das matrizes alimentares selecionadas;
4. Otimização dos métodos de deteção de ácidos nucleicos de NoV GI e GII, HAV e HAdV por PCR /RT-PCR em tempo real e quantificação de HAdV por PCR digital (dPCR).

III. Materiais e Métodos

Parte do trabalho desenvolvido e aqui descrito tem elementos confidenciais. Sempre que se mostre necessário os conteúdos considerados confidenciais serão remetidos para os anexos, sendo o anexo correspondente indicado ao longo do texto.

1 Material de referência e amostras reais

1.1 Material de referência

O material viral de referência selecionado foi adquirido ao National Institute for Biological Standards and Control no Reino Unido (www.nibsc.org). As estirpes de referência adquiridas para representar os NoVs, HAV e HAdV foram as seguintes:

- NoV GI: Human Norovirus GI Working Reagent for Nucleic Acid Amplification Testing (NIBSC #08/318-005)
- NoV GII: Norovirus GII for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC #07/294-005)
- HAV: Hepatitis A Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC #00/562)
- HAdV C, serótipo 2 (HAdVC2): Human Adenovirus serotype 2 for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC #08/114-004)

Foi igualmente adquirido RNA viral sintético quantificado de norovírus ao repositório de coleções de culturas ATCC – American Type Culture Collection (www.atcc.org) e ao CEERAM (www.ceeram.com) para servir como controlo positivo das reações de deteção por RT-PCR em tempo real.

NoV GI:

- Synthetic Norovirus G1 (I) RNA (ATCC® VR-3199SD™)
- Norovirus GI Quantification Standard (CEERAM #KQNVGI)

NoV GII:

- Synthetic Norovirus G2 (II) RNA (ATCC® VR-3200SD™)
- Norovirus GII Quantification Standard (CEERAM #KQNVGII)

Para servir como controlo positivo das reações de deteção de HAdV por PCR em tempo real e dPCR foi igualmente adquirido DNA viral quantificado de adenovírus à empresa Vircell:

- HAdV C, serótipo 1 (HAdVC1): AMPLIRUN® ADENOVIRUS DNA CONTROL (Vircell #MBC001)
- HAdV F, serótipo 41 (HAdVF41): AMPLIRUN® ADENOVIRUS 41 DNA CONTROL (Vircell #MBC114)

Para servir como controlo positivo das reações de deteção por dPCR, DNA viral quantificado de HAdV foi gentilmente cedido pela Unidade de Serviços Analíticos do iBET (Oeiras, Portugal):

- HAdV C, serótipo 5 (HAdVC5) quantificado por PCR em tempo real

Para servir como controlo da eficiência do conjunto dos passos de extração de partículas virais de vírus e extração de ácidos nucleicos virais foi adquirido um *kit* de controlo de processo ao CEERAM:

- Vírus Mengo: Mengo Extraction Control (CEERAM #KMG)

1.2 Amostras alimentares

Para testar os métodos de deteção de vírus foram seleccionadas e analisadas as seguintes matrizes alimentares adquiridas numa superfície comercial:

- Framboesas e mirtilos, na categoria de frutos vermelhos e bagas;
- Mexilhão, na categoria de bivalves;
- Água engarrafada, na categoria de águas para consumo.

2 Deteção de vírus em amostras alimentares

Para proceder à extração de partículas virais de diferentes amostras, à extração de ácidos nucleicos (RNA e DNA) a partir dos vírus isolados e à deteção de sequências alvo nos genomas virais foi seleccionado como protocolo base o conjunto das especificações técnicas publicadas pela ISO. As normas ISO/TS 15216-1:2013 (ISO 2013a) e ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) abordam, respetivamente, o método de quantificação e o método de deteção qualitativa de NoV e HAV em alimentos, usando RT-PCR em tempo real. Estas normas fornecem informações relativamente aos reagentes, materiais e equipamentos a usar, bem como aos procedimentos a seguir em cada um dos passos: extração de partículas virais dos vírus, extração de RNA e amplificação. Alguns detalhes foram adaptados e modificados de modo a serem obtidos os melhores resultados. Para a deteção de HAdV a metodologia aplicada teve como base o método de deteção qualitativa descrito na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) para a parte de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos, recorrendo às necessárias adaptações descritas em outros métodos (Buckwalter et al. 2012) para a parte da deteção das sequências alvo, uma vez que os vírus de DNA não fazem parte desta norma.

2.1 Vírus de controlo de processo: vírus Mengo

De modo a poder controlar a eficiência de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos virais foi utilizado um *kit* de controlo de processo (Mengo Extraction Control — #KMG, CEERAM). O *kit* foi usado conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, uma quantidade conhecida de vírus Mengo é adicionada a cada amostra antes de qualquer tipo de processamento. Após o completo processamento da amostra, determina-se a quantidade de vírus Mengo recuperado, compara-se com uma quantidade idêntica de vírus Mengo que não foi submetido a nenhum processamento, definindo assim a eficiência de recuperação da totalidade do processo. A utilização deste controlo permite avaliar

em simultâneo a presença de inibidores na reação de amplificação recorrendo à análise em paralelo de amostras de ácidos nucleicos puros e decimalmente diluídos.

2.2 Extração de partículas virais de vírus

Todo o trabalho referente ao extração de partículas virais foi desenvolvido segundo as indicações da norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) que descreve métodos de extração de partículas virais para as seguintes matrizes alimentares: superfícies de alimentos, vegetais para saladas, frutos vermelhos e bagas, águas engarrafadas, e moluscos bivalves. As matrizes alimentares contempladas nessa norma não requerem a validação prévia dos métodos a usar para à extração de partículas virais. Os protocolos referentes à extração de partículas virais a partir de cada tipo de matriz e as adaptações necessárias aos mesmos encontram-se descritos na sua totalidade no Anexo Ia.

As matrizes alimentares selecionadas foram artificialmente contaminadas com a totalidade dos 4 vírus em estudo, NoV GI, NoV GII, HAV e HAdV, juntamente com o vírus de controlo de processo, o vírus Mengo. Os vírus foram isolados de cada uma dessas amostras, independentemente, em triplicado.

2.3 Extração de ácidos nucleicos virais

Após a extração de partículas virais específico das partículas virais para cada tipo de matriz alimentar, segue-se o processo de extração de ácidos nucleicos que é comum a todas as matrizes.

De modo a poder selecionar o melhor *kit* de extração de ácidos nucleicos virais que levaria à obtenção dos melhores resultados (maior quantidade de ácidos nucleicos em simultâneo com o mais elevado grau de pureza possível), foram testados no total cinco *kits*. As marcas e modelos destes *kits* encontram-se descritos no Anexo Ib (ver ██████████).

Para testar os diferentes *kits* foram utilizadas as amostras de referência de cada um dos vírus em estudo. Os protocolos de cada *kit* de extração de ácidos nucleicos virais foram executados seguindo as instruções fornecidas pelos fabricantes. A quantificação dos ácidos nucleicos extraídos e avaliação da sua qualidade para cada um dos métodos de extração testados foi realizada espectrofotometricamente recorrendo ao espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). A seleção do *kit* mais adequado para a extração de ácidos nucleicos virais foi realizada recorrendo à técnica de PCR/RT-PCR em tempo real, cujas condições se encontram descritas no ponto seguinte.

2.4 Detecção de vírus por PCR e RT-PCR em tempo real

Os métodos de deteção por PCR/RT-PCR foram selecionados, aplicados e adaptados individualmente para cada vírus, consoante as exigências de cada ensaio, e encontram-se descritos nos pontos seguintes. A avaliação dos resultados dos ensaios de PCR/RT-PCR em tempo real foi baseada na interpretação dos gráficos obtidos no programa de análise

correspondente ao equipamento utilizado (iQ5 Real-Time PCR Detection Systems, Bio-Rad), recorrendo aos valores de fluorescência detetados.

2.4.1 Métodos de deteção de norovírus e hepatite A por RT-PCR em tempo real

As reações de deteção qualitativa por RT-PCR em tempo real foram efetuadas com base na norma ISO/TS 15216-1:2013 (ISO 2013b). As reações de transcrição reversa e de amplificação foram efetuadas recorrendo a um *kit* específico (ver [REDACTED] no Anexo Ic) que cumpre os pré-requisitos indicados na norma: o uso de sondas tipo *Taqman* e a realização da reação de transcrição reversa e amplificação em um único passo.

O processo de seleção dos conjuntos de *primers* e sonda tipo *Taqman* para cada vírus a ser detetado encontra-se descrito nos pontos seguintes. Todas as sequências de *primers* e sondas para detetar cada vírus em estudo, bem como as diferentes concentrações dos mesmos e as condições de amplificação testadas, encontram-se nos Anexos Id a Ig. Foi sempre selecionado o conjunto de *primers* e sonda, concentrações dos mesmos e condições de amplificação que permitiram a obtenção dos melhores resultados, sendo estes definidos como a deteção do controlo positivo para o menor *threshold cycle* (Ct) possível em simultâneo com a maior fluorescência final. O Ct é o número do ciclo de amplificação em que a fluorescência formada proporcional à acumulação do produto de reação ultrapassa o limiar de fluorescência, um sinal de fluorescência significativamente acima da fluorescência de fundo. No Ct existe uma quantidade detetável do produto amplificado sendo este gerado durante o início da fase exponencial da reação. Trata-se de uma medida relativa da concentração do alvo na reação de PCR.

2.4.1.1 Norovírus

Para otimizar a reação de deteção de NoV GI e GII foram usados os RNA virais sintéticos quantificados previamente mencionados (III- 1.1).

Norovírus GI

Nas experiências com o RNA viral sintético de NoV GI (#VR-3199SD™) e nas experiências com o controlo positivo quantificado (CEERAM — Norovirus GI Quantification Standard / #KQNVGI), foram testados três conjuntos diferentes de *primers* e sonda: a) o conjunto referido na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b); b) o conjunto referido no conjunto de especificações técnicas EPA/600/R-10/181 (Fout et al. 2012), publicado pela U.S. Environmental Protection Agency; e c) um outro conjunto constituído por um *primer* encontrado na literatura (Miura et al. 2013), um *primer* da norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) e a sonda da norma EPA/600/R-10/181 (Fout et al. 2012).

Para cada conjunto de *primers* e sonda foram testadas diferentes concentrações (ver [REDACTED], [REDACTED] e [REDACTED] no Anexo Id) e diferentes condições das reações de transcriptase reversa e de amplificação (ver [REDACTED], [REDACTED] e [REDACTED] no Anexo Id).

Norovirus GII

Para as experiências com o RNA viral sintético de NoV GII (#VR-3200SD™) e para as experiências com o controlo positivo quantificado (CEERAM — Norovirus GII Quantification Standard / #KQNVGII), foi testado o conjunto de *primers* e sonda referido na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b).

Foram testadas diferentes concentrações (ver ██████ no Anexo Ie) e diferentes condições das reações de transcriptase reversa e de amplificação (ver ██████ no Anexo Ie) para o conjunto de *primers* e sonda selecionado.

2.4.1.2 Hepatite A

Foi utilizado um controlo positivo de HAV para testar o conjunto de *primers* e sonda descritos no método BAM 26B (Williams-Woods et al. 2013). Testaram-se diferentes concentrações de *primers* e sonda (ver ██████ no Anexo If) e diferentes condições das reações de transcriptase reversa e de amplificação (ver ██████ no Anexo If) de forma a definir o melhor método de deteção.

2.4.2 Método de deteção de adenovírus por PCR em tempo real

Para o desenvolvimento e a otimização deste método de deteção foram usados os dois controlos positivos adquiridos à Vircell: um contendo DNA viral quantificado de HAdVC1 (Vircell #MBC001) e outro DNA viral quantificado de HAdVF41 (Vircell #MBC114). Para amplificar as amostras de DNA nas reações de PCR em tempo real foi utilizado um *kit* específico, descrito como tendo uma elevada estabilidade na presença de eventuais inibidores da reação (ver Tabela 9 no Anexo Ic).

Para o desenvolvimento do método foi utilizado um conjunto de *primers* e sonda descritos na literatura (Kishida et al. 2014) e posteriormente adaptados (ver Tabela 20 no Anexo Ig). Foram testadas diferentes concentrações de *primers* e sonda (ver Tabela 20 no Anexo Ig) e diferentes condições da reação de amplificação (ver

Tabela 21 no Anexo Ig) de forma a selecionar a melhor combinação final.

2.5 Qualificação dos métodos de deteção

A qualificação dos diferentes métodos de deteção foi efetuada determinando os seguintes parâmetros: limite de deteção (*limit of detection*, LOD), especificidade e reprodutibilidade dos métodos.

2.5.1 Limite de deteção (LOD)

Os LODs do passo de amplificação por PCR/RT-PCR dos métodos de deteção para NoV GI, NoV GII e HAdV foram estimados a partir de 3 determinações independentes em que foi detetada a amplificação da sequência alvo. Estas determinações do LOD foram realizadas

recorrendo aos materiais de referência quantificados previamente mencionados: NoV GI e NoV GII, adquiridos ao CEERAM, e HAdVC1 e HAdVF41, adquiridos à Vircell.

2.5.2 Especificidade

Foi testada a especificidade de cada conjunto de *primers* e sonda, específico a cada método de detecção viral, contra três alvos virais não específicos para esse método. Cada teste de especificidade foi efetuado com ácidos nucleicos de cada um dos vírus indicado e repetido em triplicado.

2.5.3 Reprodutibilidade em equipamentos diferentes

Os métodos de detecção por PCR/RT-PCR em tempo real, específicos para cada um dos vírus, foram testados em triplicado em quatro termocicladores diferentes: iQ5 Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad), 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Scientific).

2.6 Aplicação do método de detecção de vírus a amostras reais

De modo a poder determinar a presença de vírus em amostras reais foi aplicado o processo de extração de partículas virais, extração de ácidos nucleicos, e os métodos de detecção por PCR/RT-PCR em tempo real, previamente qualificados, às diferentes amostras alimentares anteriormente descritas (III - 1.2). A amplificação das regiões alvo foi efetuada no termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Foram utilizadas as diluições 10^0 e 10^{-1} dos triplicados de extração de cada tipo de matriz para a detecção de NoV GI, NoV GII, HAV e HAdV.

A análise da eficiência dos processos de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos foi realizada recorrendo ao *kit* de controlo de processo adquirido ao CEERAM, seguindo o procedimento descrito pelo fabricante.

3 Detecção e quantificação de adenovírus por PCR digital

3.1 Seleção do conjunto de *primers* e sondas

O conjunto de *primers* e sondas foi desenvolvido para que fosse possível detetar por dPCR todos os serótipos de HAdV descritos na literatura até a data da realização prática desta parte do trabalho (abril 2015). As propriedades termodinâmicas e estruturais dos *primers* e sondas selecionados foram verificadas usando o programa *online* OligoAnalyzer 3.1 (IDT 2016) para garantir uma T_m (*melting temperature*) correta e evitar a existência de *hairpins*, autodímeros e heterodímeros. A T_m é a temperatura à qual metade da sequência de bases de

determinada molécula de DNA, está desnaturada. O conjunto final de *primers* e sondas foi adquirido à IDT (Coralville, EUA) e encontra-se descrito na [REDACTED] no Anexo Ih.

3.2 Método de deteção e quantificação de adenovírus por PCR digital

Para a deteção e quantificação de HAdV foram utilizados os seguintes replicados de cada amostra: um controlo positivo de HAdVC1 quantificado por PCR em tempo real que foi adquirido à Vircell, em quadruplicado; DNA de concentração desconhecida extraído de HAdVC2, adquirido à NIBSC, no âmbito deste trabalho; um controlo positivo de HAdVC5 quantificado por PCR em tempo real que foi fornecido pela Unidade de Serviços Analíticos do iBET (Oeiras, Portugal), em duplicado; um controlo negativo (*no template control*, NTC), em quadruplicado.

Para a deteção de HAdV em cada amostra, as misturas reacionais para cada experiência de dPCR foram preparadas de acordo com a Tabela 1. Foram testados quatro conjuntos diferentes de concentrações e proporções de primers e sondas (ver [REDACTED] no Anexo Ih) e diferentes condições da reação de amplificação (ver [REDACTED] no Anexo Ih) de forma a selecionar a melhor combinação final.

Tabela 1: Composição da mistura reacional para cada experiência de dPCR. O conjunto de *primers* e sondas é constituído por uma mistura de um *primer forward*, dois *primers reverse* e duas sondas tipo *Taqman*, todos degenerados, referidos na Tabela 22 do Anexo Ih.

Componentes da reação de dPCR	Volume (µL)
QuantStudio 3D digital PCR MasterMix (2x)	8,00
Conjunto <i>Primers/Sondas</i> (10x)	1,60
Amostra ¹	6,40

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizado o sistema QuantStudio 3D Digital PCR (Thermo Fisher Scientific). Em comparação com outros sistemas de dPCR, este tem a vantagem de se basear numa tecnologia que requer menos passos de pipetagem e que reduz a possibilidade de contaminação pós amplificação. Resumidamente, a mistura de reação é carregada num chip com 20 000 partições com o auxílio do equipamento QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader (Thermo Fisher Scientific). As moléculas alvo presentes na amostra são distribuídas aleatoriamente nas partições do QuantStudio 3D Digital PCR 20K Chip, podendo cada partição receber nenhuma, uma, ou mais moléculas alvo. Foram testadas diferentes condições de amplificação num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) de modo a selecionar o programa mais adequado e com o qual se obteriam os melhores resultados (ver [REDACTED] no Anexo Ih).

Após a amplificação num termociclador, a fluorescência resultante da amplificação em cada partição é lida no sistema QuantStudio 3D Digital PCR (Thermo Fisher Scientific) e analisada com o auxílio do programa *online* QuantStudio 3D AnalysisSuite (Thermo Fisher Scientific). Os dados foram então processados com o módulo de quantificação relativa do

¹ Nos controlos negativos (*no template control*, NTC) o volume de amostra foi substituído por água *nuclease-free*.

programa *online* QuantStudio 3D AnalysisSuite (versão 3.0.3). Com base na proporção das partições com e sem amplificação de moléculas alvo presentes, o programa permite a análise estatística dos resultados fornecendo os valores da quantificação absoluta em cópias/ μ l (Conte et al. 2015). Este programa permite a análise estatística das experiências podendo ser definidos o intervalo de confiança, a precisão e o algoritmo de quantificação a aplicar aos resultados. Nas análises realizadas foram mantidos os valores por defeito do programa: intervalo de confiança de 95 %, precisão de 10 % e a distribuição de Poisson como algoritmo de quantificação. Os resultados da quantificação absoluta das moléculas alvo são apresentados em cópias/ μ l na mistura reacional em analisada.

IV. Resultados e discussão

Um dos objetivos deste trabalho centrou-se no desenvolvimento de metodologias que permitam a extração de partículas virais e deteção de NoV GI, NoV GII, HAV e HAdV em amostras alimentares. De modo a alcançar esse objetivo, desenvolveram-se numa primeira etapa os métodos de deteção por PCR e RT-PCR em tempo real específicos para cada um dos vírus. Numa segunda etapa, e com base no conhecimento adquirido anteriormente, procedeu-se à seleção de um *kit* de extração de ácidos nucleicos. Por último, aplicaram-se os métodos de deteção desenvolvidos para cada vírus às matrizes em estudo (bagas e frutos vermelhos, bivalves e água de consumo). Este trabalho teve igualmente como objetivo o desenvolvimento de um método de dPCR que permitisse em simultâneo a deteção e quantificação de todos os serótipos de HAdV descritos.

1 Seleção dos métodos de deteção de vírus por PCR/RT-PCR em tempo real e seleção do *kit* de extração de ácidos nucleicos

A abordagem escolhida para o desenvolvimento deste trabalho baseou-se nas técnicas de PCR e RT-PCR em tempo real recorrendo a um sistema de *primers* e sondas de hidrólise do tipo *Taqman*. Neste sistema é essencial que a sonda marcada e o conjunto de *primers* tenham como região alvo de amplificação uma zona conservada do genoma a ser detetado. As sequências desses *primers* e sondas devem obedecer a vários critérios de modo a serem utilizados nas técnicas de PCR e RT-PCR em tempo real. Os critérios comuns a ambos os oligonucleótidos são um conteúdo em nucleótidos guanina (G) e citosina (C), G+C, entre 35 e 65%, não possuir mais de 3 Gs consecutivas e não ter mais do que 2 Gs e/ou Cs nos 5 nucleótidos finais. Os requisitos específicos para os *primers* incluem ter idealmente uma T_m entre 58 e 62°C e o tamanho do produto de amplificação final não exceder os 150 pares de bases (bp). No caso das sondas, a T_m deve situar-se idealmente entre 68 e 70°C, a sequência não deve ter o nucleótido G na extremidade 5' e deve possuir um maior conteúdo em C do que G (IDT 2016).

Os conjuntos de *primers* e sondas utilizados neste trabalho foram analisados de forma a confirmar a sua concordância com os critérios previamente descritos. Sempre que necessário esses conjuntos foram adaptados para permitir o desenvolvimento de três métodos de deteção de vírus de RNA por RT-PCR em tempo real (NoV GI, NoV GII e HAV) e um método de deteção de vírus de DNA por PCR em tempo real (HAdV). As condições de amplificação e as concentrações dos conjuntos de *primers* e sonda dos quatro métodos desenvolvidos foram selecionadas de acordo com as necessidades específicas de cada alvo a detetar, de forma a obter os melhores resultados para a deteção dos controlos positivos (menor C_t possível em simultâneo com a maior fluorescência final).

1.1 Métodos de detecção de norovírus e adenovírus por PCR/RT-PCR em tempo real

1.1.1 Norovírus GI

Nas experiências com RNA viral sintético de NoV GI (#VR-3199SD™), independentemente das diferentes combinações de concentrações de *primers* e sonda referidos na norma ISO/TS 15216-1:2013 (ISO 2013b) e das diferentes condições de transcrição reversa e amplificação testadas, nunca a amplificação do alvo mostrou ser eficiente, existindo amplificação nos controlos negativos. Uma análise *in silico* dos oligonucleótidos usados nesta amplificação mostrou a existência de uma elevada auto-complementaridade entre *primers* e sonda, bem como da sonda com ela própria, permitindo justificar os problemas de amplificação observados (Figura 1). Assim, foi necessário testar outro conjunto de *primers* e sonda de modo a eliminar as amplificações inespecíficas dos controlos negativos e a esclarecer se a ineficiência de amplificação no controlo positivo era causada pelo conjunto de *primers* e sonda descritos na norma utilizada ou se o RNA sintético de NoV GI também estaria de alguma forma implicado. Para tal utilizou-se um conjunto de *primers* e sonda descrito no conjunto de especificações técnicas EPA/600/R-10/181 (Fout et al. 2012) e um terceiro conjunto constituído por um *primer* encontrado na literatura (Miura et al. 2013), um *primer* da norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) e a sonda da norma EPA/600/R-10/181 (Fout et al. 2012). Independentemente das diferentes condições testadas, o RNA viral sintético de NoV GI proveniente da ATCC continuou a mostrar uma amplificação pouco eficiente do alvo.

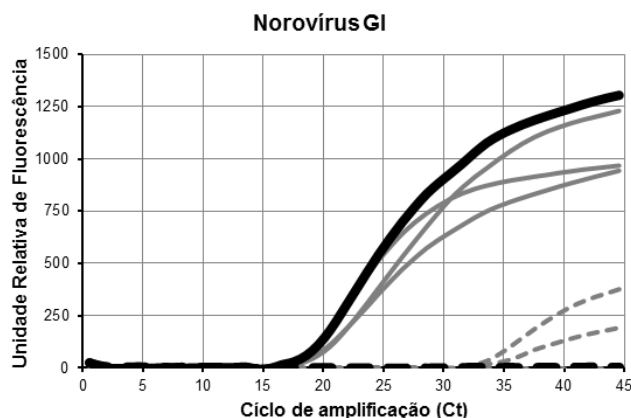


Figura 1: Exemplo de curvas de amplificação de experiências de otimização das condições para a detecção de ácidos nucleicos de NoV GI. Curvas a traço cheio preto: condições ótimas selecionadas utilizando o controlo proveniente do CEERAM (#KQNVGI); curvas a traço cheio cinzento: exemplos de outras condições testadas utilizando o controlo proveniente do CEERAM (#KQNVGI); curva com tracejado preto: controlo negativo utilizando as condições ótimas selecionadas; curvas com tracejado a cinzento: amplificação inespecífica nos controlos negativos com uso dos *primers* e sonda referidos na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b).

Para permitir a seleção do conjunto de *primers* e sonda mais adequado, foi então testado um outro controlo positivo quantificado (CEERAM — Norovirus GI Quantification Standard / #KQNVGI). Usando esse controlo proveniente do CEERAM foi possível selecionar o conjunto mais adequado de *primers* e sonda, a sua concentração (ver Tabela 25 no Anexo IIa) e as

condições de amplificação mais convenientes (ver Tabela 30 no Anexo IIb) para a detecção de NoV GI (Figura 1). A composição das reações de RT-PCR encontra-se no Anexo IIb (Tabela 29). A utilização apropriada do controlo positivo do CEERAM nas reações de otimização permitiu demonstrar que o controlo positivo da ATCC não é adequado para esta finalidade.

1.1.2 Norovirus GII

Para a otimização do método de detecção de NoV GII foram utilizados os controlos positivos adquiridos à ATCC (#VR-3200SD™) e ao CEERAM (CEERAM — Norovirus GII Quantification Standard / #KQNVGII), de forma a selecionar as condições que permitam a obtenção dos melhores resultados. Recorrendo a estes controlos foi possível selecionar a melhor concentração de *primers* e sonda (ver Tabela 26 no Anexo IIa) e as melhores condições de amplificação (ver Tabela 30 no Anexo IIb) para detecção de NoV GII (Figura 2). A composição das reações de RT-PCR encontram-se no Anexo IIb (Tabela 29).

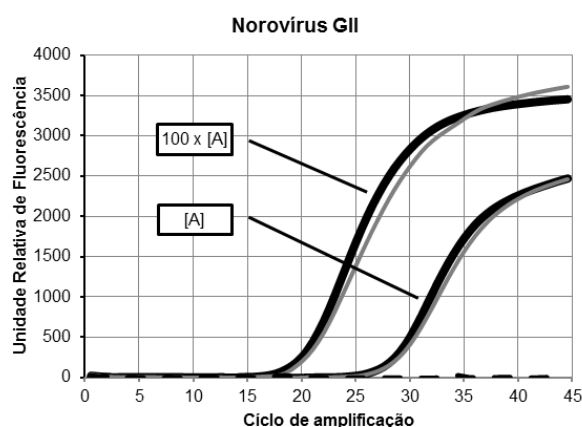


Figura 2: Exemplo de curvas de amplificação de experiências de otimização das condições para a detecção de ácidos nucleicos de NoV GII com duas concentrações de amostra ([A] e 100x[A]) utilizando como controlo positivo o controlo proveniente do CEERAM (#KQNVGII). Curvas a traço cheio preto: condições ótimas selecionadas; curvas a traço cheio cinzento: exemplo de outras condições de amplificação testadas; curva a tracejado: controlo negativo.

1.1.3 Adenovirus

Não havendo nenhuma norma de referência que definisse um conjunto de *primers* e sonda para ser usado na detecção de HAdV, procedeu-se a uma pesquisa bibliográfica de um método que permitisse executar essa detecção.

Foi encontrado na literatura um conjunto de *primers* e sondas descrito como permitindo a detecção de forma eficiente de todos os serótipos de HAdV descritos até à data da publicação do manuscrito (Buckwalter et al. 2012). Uma análise *in silico* permitiu confirmar que este conjunto de oligonucleótidos apresentava a universalidade necessária para também detetar todos os serótipos descritos posteriormente à data de publicação deste manuscrito. As sondas descritas nessa publicação são, no entanto, um tipo de sondas de hibridação especialmente adaptadas a um único equipamento, o LightCycler da Roche Diagnostics. De modo a tornar o método compatível com os termocicladores em tempo real com maior expressão no mercado, a sonda foi adaptada para uma sonda tipo *Taqman* que pudesse ser usada juntamente com os

primers descritos. Desta forma, assegura-se o desenvolvimento de um método que tem a possibilidade de ser comercializado a um amplo leque de clientes.

À semelhança do que foi feito nos métodos descritos anteriormente, após as experiências de otimização do método de detecção com essa nova sonda tipo *Taqman* adaptada, foi possível selecionar a melhor concentração de *primers* e sonda (ver Tabela 28 no Anexo IIa) e as melhores condições de amplificação (ver Tabela 32 no Anexo IIb) para detecção de HAdV (Figura 3). A composição das reações de PCR encontram-se no Anexo IIb (Tabela 31). Para a otimização do método foram utilizados os dois controlos positivos adquiridos à Vircell contendo DNA viral quantificado de HAdVC1 e HAdVF41.

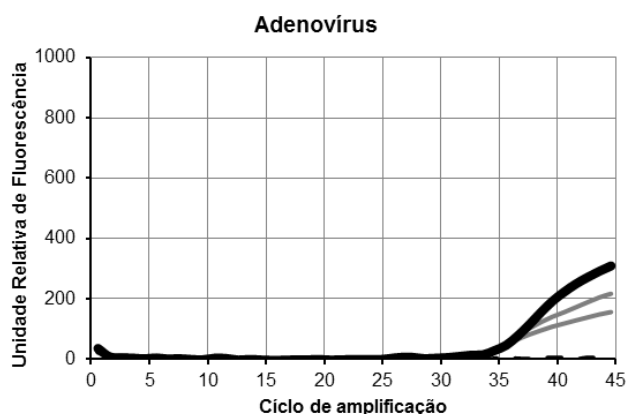


Figura 3: Exemplo de curvas de amplificação de experiências de otimização das condições para a detecção do controlo positivo de HAdVF41 da Vircell. Curvas a traço cheio preto: condições ótimas selecionadas; curvas a traço cheio cinzento: exemplo de outras condições de amplificação testadas; curva a tracejado preto: controlo negativo.

1.2 Seleção do *kit* de extração de ácidos nucleicos

Para a determinação do melhor *kit* de extração de ácidos nucleicos foram utilizados os métodos de detecção de NoV GI e NoV GII por RT-PCR e HAdV por PCR em tempo real previamente otimizados e descritos no ponto IV - 1.1. Após a utilização dos *kits* selecionados, os ácidos nucleicos extraídos foram analisados espectrofotometricamente e após amplificação por RT-PCR e PCR em tempo real. A seleção do *kit* baseou-se nas seguintes características: a) análise por espectrofotometria, b) análise dos resultados da amplificação dos ácidos nucleicos e c) análise das características de cada *kit* (magnético, coluna ou automático).

1.2.1 Extração de ácidos nucleicos

Em relação à extração de ácidos nucleicos virais, a norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) refere a necessidade de proceder a um método que garanta a obtenção de ácidos nucleicos puros, isentos de inibidores. Para tal é sugerido o uso do agente caotrópico tiocianato de guanidina e de uma matriz de sílica capaz de adsorver os ácidos nucleicos virais, permitir a sua lavagem e a sua posterior recuperação. Adicionalmente, o uso de *kits* na extração de ácidos nucleicos virais ajuda a uma maior uniformização de tratamento de amostra que outros métodos podem não garantir.

Esta norma recomenda o uso do sistema de extração de ácidos nucleicos NucliSens system da bioMérieux. Neste sistema a extração de ácidos nucleicos virais (DNA/RNA) é realizada com base em partículas de sílica magnética, em conjunto com o agente caotrópico tiocianato de guanidina, e associado a um equipamento específico que permite uma automatização parcial do processo de extração. Sendo o *kit* de extração de ácidos nucleicos uma componente essencial do método de detecção de vírus, a independência de um equipamento específico para efetuar essa extração é importante para a sua futura comercialização, o que tornou necessário encontrar um sistema alternativo.

Para tal, foram então extraídos os ácidos nucleicos do material de referência de NoV GI (NIBSC #08/318-005), NoV GII (NIBSC #07/294-005) e HAdVC2 (NIBSC #08/114-004) com os *kits* A, B, C, D, e E (ver Tabela 8 no Anexo Ib). O *kit* A apresenta uma versão em que a extração de ácidos nucleicos virais (DNA/RNA) é realizada com base em partículas de sílica magnética, em conjunto com o agente caotrópico tiocianato de guanidina. Os *kits* B e C, de marcas diferentes, utilizam uma coluna com partículas de sílica que, para além do recomendado agente caotrópico tiocianato de guanidina, incluem um segundo agente caotrópico, o hidrocloreto de guanidina. Para os *kits* B e C foi igualmente testado o efeito da não adição do composto *carrier* RNA. Este composto faz parte de alguns *kits* e o seu uso tem como objetivo aumentar a recuperação de ácidos nucleicos que existam em pequenas quantidades na amostra. No entanto, este *carrier* RNA pode ao mesmo tempo reduzir a eficiência do passo de transcriptase reversa necessário para a amplificação de RNA viral. No *kit* D, a extração de ácidos nucleicos virais é realizada utilizando uma coluna com partículas de sílica em conjunto só com o agente caotrópico tiocianato de guanidina. O *kit* E é baseado na utilização de partículas magnéticas, mas associado a um sistema automatizado de extração. Embora fosse útil selecionar um método que não fosse dependente de um sistema automatizado, este sistema pode ser útil uma vez que a empresa para a qual foi desenvolvido este projeto tem este equipamento e poderia utilizá-lo como serviço.

Os resultados da análise dos ácidos nucleicos extraídos por espectrofotometria encontram-se descritos no ponto seguinte.

1.2.2 Análise por espectrofotometria dos ácidos nucleicos extraídos

A razão entre a absorvância a 260 nm e a 280 nm de uma amostra de ácidos nucleicos, DNA de cadeia simples ou dupla e RNA de cadeia simples, permite avaliar a sua pureza, sendo que uma razão 260/280 de ~2,0 é geralmente aceite para RNA “puro” e de ~1,8 para DNA “puro”.

Os resultados obtidos para as amostras de RNA e DNA analisadas por espectrofotometria mostraram razões 260/280 muito fora da gama esperada, o que sugere RNA e DNA com presença de algum tipo de contaminante (ver Tabela 2).

Enquanto que uma razão 260/280 alta pode não ser indicativa de um problema, uma razão 260/280 baixa pode indicar a presença de interferentes como proteínas, fenol, guanidina ou outros contaminantes que ou são componentes ou são libertados pelo protocolo de extração

e que absorvem fortemente a 280 nm ou próximo desse comprimento de onda. Uma razão 260/280 baixa pode ainda ser consequência de uma concentração muito baixa de ácidos nucleicos (<10 ng/μl).

Tabela 2: Valores da concentração e da razão entre a absorvância a 260 nm e a 280 nm dos ácidos nucleicos extraídos de amostras de referência de NoV GI, NoV GII e HAdV, pelos métodos dos kits A (magnético), B (coluna), C (coluna), D (coluna) e E (magnético automático).

Vírus	Método de extração	Replicado	[ácidos nucleicos] (ng/μL)	Abs 260/280
NoV GI	Kit A	1	139,85	2,84
	Kit A sem <i>carrier</i> RNA	1	23,37	1,37
	Kit B	1	48,27	2,99
	Kit B sem <i>carrier</i> RNA	1	1,96	1,42
	Kit C	1	10,63	1,42
NoV GII	Kit A	1	55,00	3,50
		2	25,00	3,47
	Kit D	1	201,57	3,47
		2	225,99	3,45
HAdV	Kit A	1	55,52	2,95
	Kit D	1	163,26	3,35
	Kit E	1	11,05	1,47
		2	15,04	1,43

A análise das curvas de absorvância obtidas por espectrofotometria (Figura 4) sugere a presença de contaminantes no RNA e no DNA extraídos. No espectro de uma solução “pura” de ácidos nucleicos existe um vale situado a ~230 nm e um pico a ~260 nm. A presença de contaminantes pode ser identificada por um aumento da absorvância entre os 220 nm e 240 nm, bem como por alterações na região entre os 260 nm e 280 nm. Os resíduos de guanidina são um exemplo deste tipo de contaminantes uma vez que podem contribuir para um aumento da absorvância perto dos 230 nm, provocando então uma alteração ou deslocação do vale nessa região.

Pelos perfis espectrais consegue-se verificar que os ácidos nucleicos de NoV GI extraídos pelo *kit* A (segundo o procedimento do fabricante) e os ácidos nucleicos de NoV GII extraídos pelos kits A e D têm contaminantes porque o vale está ligeiramente deslocado na região entre 220 nm e 240 nm. Os ácidos nucleicos de NoV GI extraídos pelo *kit* C e os ácidos nucleicos de HAdVC2 extraídos pelo *kit* E não possuem vale na zona entre 230 nm e 240 nm e o pico está deslocado mostrando também a possível presença de contaminantes. O facto de se retirar o passo de adição do *carrier* RNA do procedimento de extração de ácidos nucleicos de NoV GI com os kits A e B também influenciou a análise provocando alterações nos espectros.

Embora a análise dos ácidos nucleicos extraídos não correspondesse aos valores de pureza esperados decidiu-se utilizar os mesmos nas reações de RT-PCR e PCR em tempo real. Os índices de pureza e perfis espectrais são indicadores importantes de qualidade da amostra e foram tidos em consideração em conjunto com os resultados da amplificação por RT-PCR e PCR em tempo real para a seleção do *kit* mais adequado, descritos no ponto seguinte.

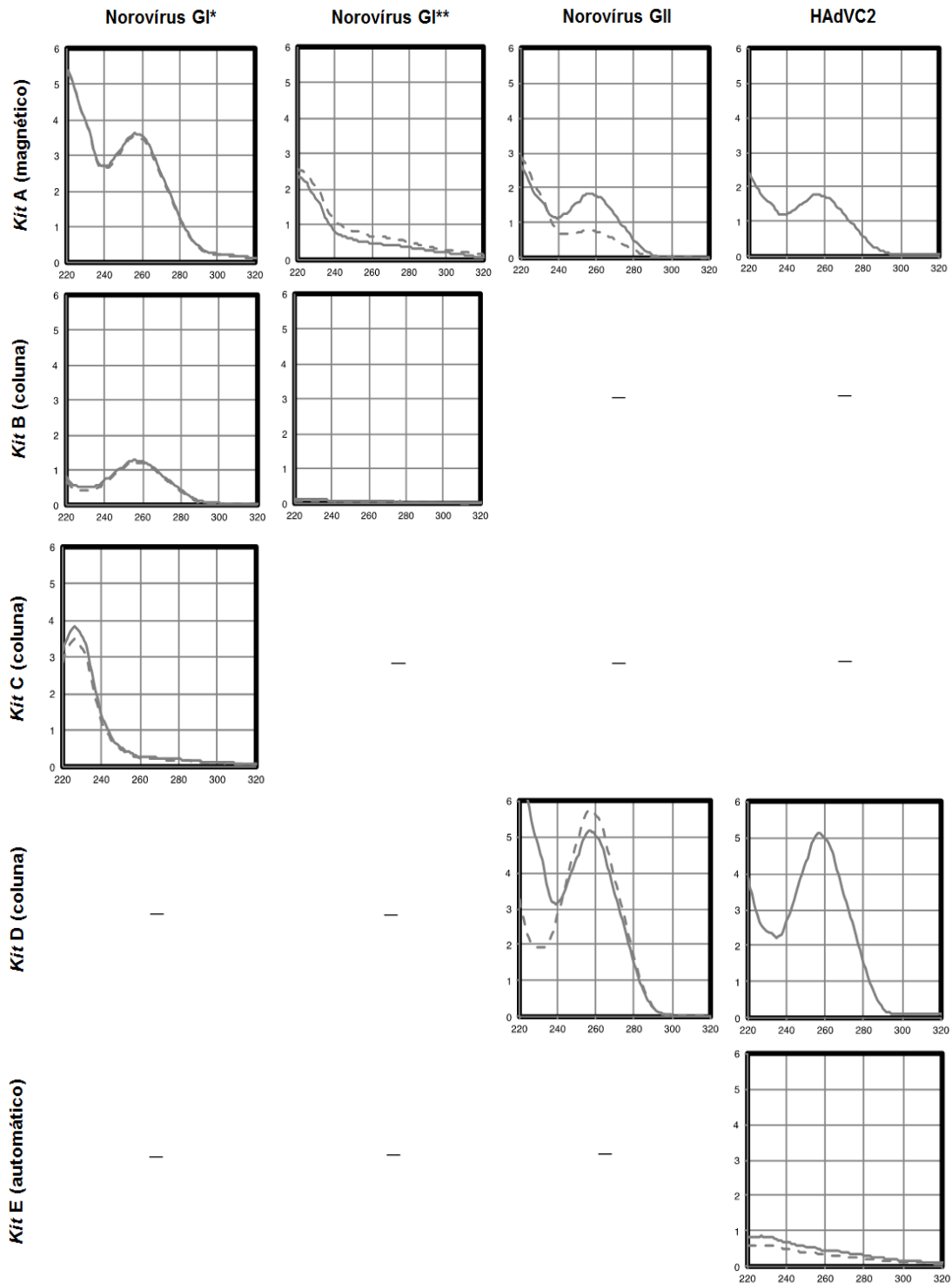


Figura 4: Gráfico da curva da absorvância (no eixo das ordenadas) em função do comprimento de onda (no eixo das abcissas) dos ácidos nucleicos extraídos de amostras de referência de NoV GI, NoV GII e HAAdVC2, pelos métodos correspondentes aos kits A, B, C, D e E. (*) Procedimento seguindo o método experimental descrito pelo fabricante ou (**) Procedimento omitindo a adição de *carrier* RNA, no caso desta adição fazer parte do procedimento.

1.2.3 Seleção do *kit* de extração de ácidos nucleicos

Mesmo com uma aparente pureza reduzida, provavelmente devida à presença de algum tipo de contaminante, verificou-se uma correta amplificação dos ácidos nucleicos extraídos em

todas as reações de RT-PCR e PCR em tempo real (Figura 5). A seleção do *kit* foi então principalmente baseada na interpretação nos perfis de amplificação, analisando-se o Ct e a fluorescência máxima detetada.

Os ácidos nucleicos de HAdVC2 extraídos pelo *kit* E foram os que apresentaram o ciclo de amplificação mais tardio (Figura 5C). Por ser um *kit* que requer um sistema automatizado, tal como o sistema de extração de ácidos nucleicos NucliSens system da bioMérieux, torna-se uma opção menos recomendável para esta finalidade, tendo-se decidido, portanto excluir este *kit*. Os ácidos nucleicos de HAdVC2 (Figura 5C) e NoV GII (Figura 5B) extraídos pelo *kit* D apresentam curvas de amplificação ligeiramente menos eficientes do que os ácidos nucleicos destas mesmas amostras extraídos pelo *kit* A, tendo igualmente também sido excluído. Os ácidos nucleicos de NoV GI (Figura 5A) extraídos pelos *kits* A, B e C apresentam ciclos de amplificação muito semelhantes, no entanto a fluorescência final no *kit* A mostrou ser superior à fluorescência apresentada pelos ácidos nucleicos extraídos pelos *kits* B e C. Como a adição ou exclusão do *carrier* RNA do procedimento de extração pelos *kits* A e B não influenciou os resultados de amplificação ou fluorescência, decidiu-se seguir o protocolo do fabricante uma vez que este *carrier* RNA aumenta a recuperação de ácidos nucleicos que possam existir em pequenas quantidades na amostra.

Dos cinco *kits* inicialmente testados (*kit* A, B, C, D e E) o método de extração selecionado foi o *kit* A, seguindo o procedimento do fabricante (com adição de *carrier* RNA). Este *kit* é também o método que apresenta mais semelhanças com o *kit* sugerido na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b), uma vez que a extração de ácidos nucleicos virais (DNA/RNA) é também realizada com base em partículas de sílica magnética, em conjunto com o agente caotrópico tiocianato de guanidina. Para além do mais, o *kit* A não requer nenhum equipamento automatizado específico tornando-se então uma mais-valia para as empresas que não possuem o sistema e que pretenderiam adquirir uma versão comercial deste método.

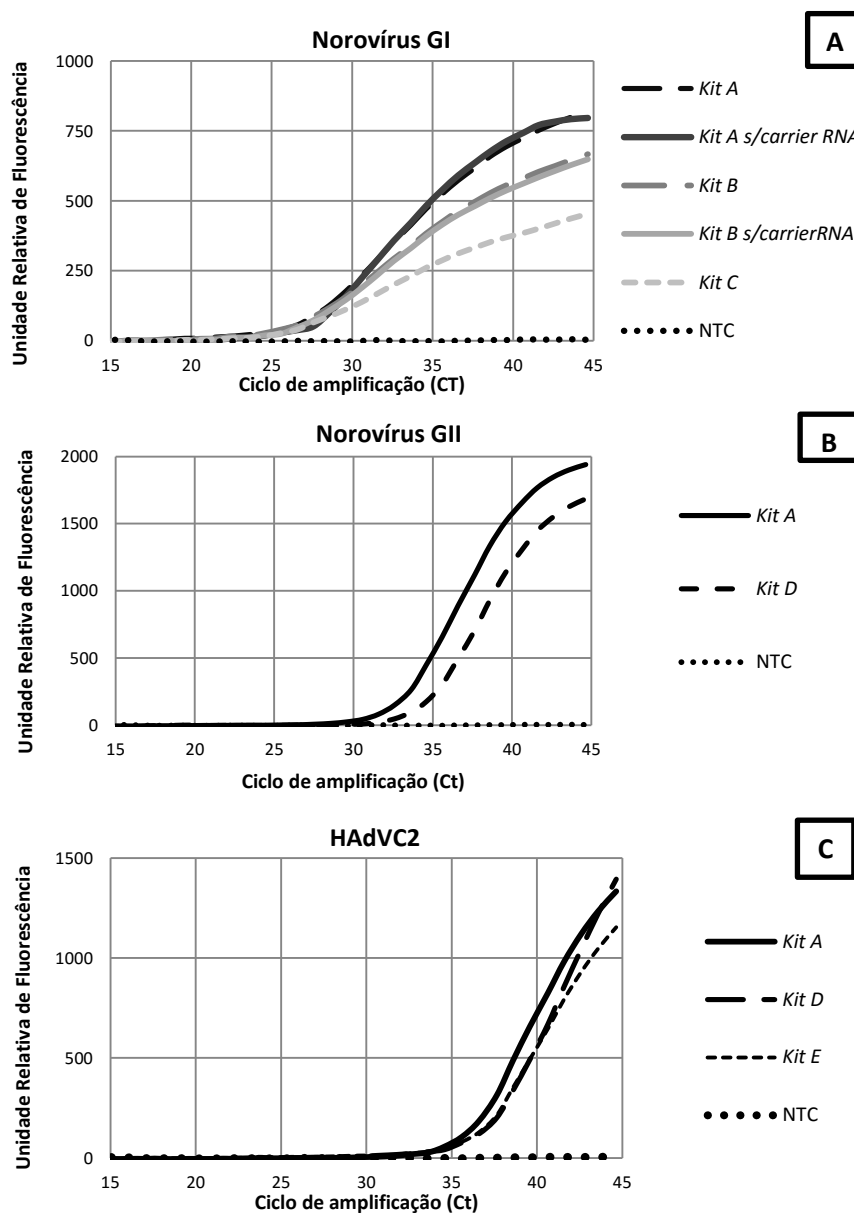


Figura 5: Curvas de amplificação de alguns replicados das extrações de ácidos nucleicos de NoV GI (Figura 5A), pelos kits A, B, e C, de NoV GII (Figura 5B) pelos kits A e D, e de HAdVC2 (Figura 5C) pelos kits A, D e E. A extração de ácidos nucleicos realizou-se seguindo o procedimento experimental descrito pelo fabricante omitindo a adição de *carrier RNA*, no caso desta adição fazer parte do procedimento.

1.3 Método de detecção de vírus da hepatite A por RT-PCR em tempo real

Para a otimização do método de detecção de HAV por RT-PCR em tempo real não foi encontrado comercialmente disponível nenhum controlo positivo que permitisse a amplificação da zona alvo com o conjunto de *primers* e sonda selecionado. Após a escolha do melhor método de extração de ácidos nucleicos virais procedeu-se à extração de ácidos nucleicos do material de referência NIBSC #00/562 (HAV) que foi então utilizado como controlo positivo na otimização do método de detecção de HAV.

A norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) tem descrito um conjunto de *primers* e sonda para a detecção de HAV. A sonda descrita nesta norma inclui na sua extremidade 3' um ligando *minor groove binder* (MGB). Para além de servir de *quencher* do fluoróforo, esse

ligando também tem como função a estabilização da sonda quando hibridada no seu alvo, aumentando de forma eficiente a sua T_m. As sondas de hidrólise com um ligando MGB têm a vantagem de poderem ser mais curtas que as sondas de hidrólise tradicionais, o que as torna mais adequadas para regiões ricas em nucleótidos adenina (A) e timina (T). No entanto os ligandos MGB são patenteados por uma empresa, a Applied Biosystems, que detém todos os direitos de produção. Sendo a sonda um componente essencial do método e a independência de fornecedores únicos fundamental para a sua futura comercialização no formato de serviço ou *kit*, foi necessário encontrar uma alternativa.

A Food and Drug Administration (FDA), órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controlo de alimentos (tanto para humanos como para animais) entre outros produtos, disponibiliza um conjunto de procedimentos usados nos seus laboratórios para deteção de agentes patogénicos (bactérias, vírus, parasitas e fungos) e de toxinas microbianas em produtos alimentares e cosméticos (Williams-Woods et al. 2013). No manual analítico bacteriológico (BAM — Bacteriological Analytical Manual) da FDA, o método BAM 26B (Williams-Woods et al. 2013) descreve um método para a deteção de HAV em alimentos e apresenta um conjunto de *primers* e sonda alternativos ao descrito na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b).

Uma análise *in silico* (Figura 6) permitiu identificar a zona alvo deste novo conjunto de *primers* e sonda, estando esta localizada a cerca de 200 nucleótidos de distância da zona alvo do conjunto indicado na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b).

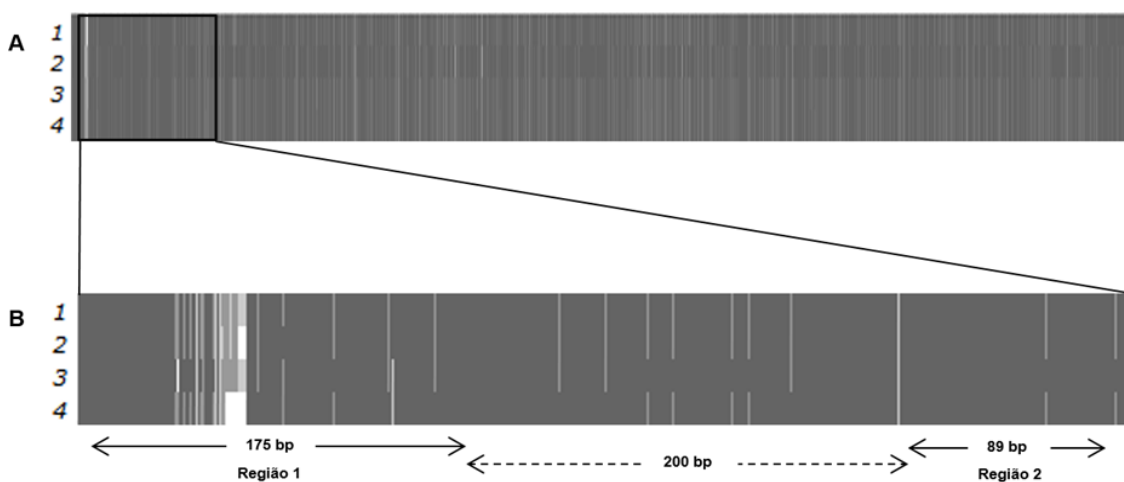


Figura 6: Alinhamento múltiplo de sequências (MSA - *multiple sequence alignment*) de (Figura 6A) uma seleção de 4 genomas completos de HAV (~7,5 kb de comprimento) e (Figura 6B) detalhe de 500 bp da sequência que contem as zonas alvo dos conjuntos de *primers* e sonda descritos na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) e no método BAM26B (Williams-Woods et al. 2013). Aos números 1, 2, 3, e 4 correspondem genomas completos de HAV com os números de acesso no GenBank do NCBI M14707.1, M16632.1, K02990.1 e M20273.1, respetivamente. Na Figura 6B, a região 1 corresponde à zona alvo para deteção de HAV descrita na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) e a região 2 à zona alvo para deteção de HAV descrita no método BAM26B (Williams-Woods et al. 2013).

Após as experiências de otimização do método de deteção de HAV, com os ácidos nucleicos extraídos do material de referência NIBSC #00/562 (HAV) pelo *kit* previamente selecionado (IV - 231.2), foi possível selecionar a melhor concentração de *primers* e sonda (ver Tabela 27 no Anexo IIa) e as condições de amplificação (ver Tabela 30 no Anexo IIb) que

permitiram a detecção de HAV (Figura 7). A composição das reações de RT-PCR encontram-se no Anexo IIb (Tabela 29).

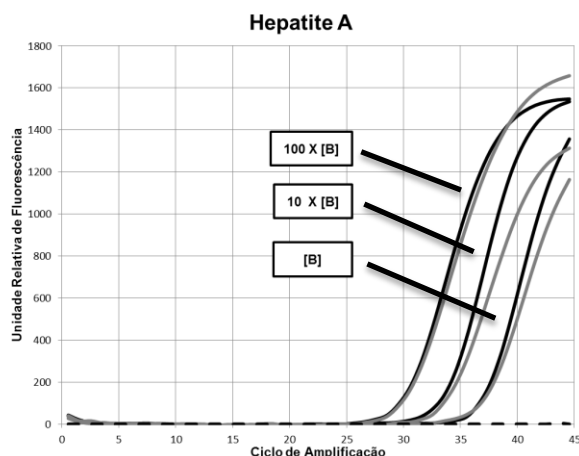


Figura 7: Exemplo de curvas de amplificação de experiências de otimização das condições para a detecção de ácidos nucleicos de HAV com três concentrações de amostra ([B], 10x[B] e 100x[B]). Curvas a traço cheio preto: condições ótimas selecionadas; curvas a traço cheio cinzento: exemplo de outra condição de amplificação testada; curva a tracejado preto: controlo negativo.

1.4 Qualificação dos métodos de detecção

1.4.1 Limite de detecção (LOD)

No caso de métodos de detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos recorrendo às técnicas de PCR/RT-PCR, o LOD pode ser definido como sendo o menor número de cópias de sequência alvo presente numa amostra que pode ser detetada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas.

O LOD para os métodos previamente determinados de RT-PCR em tempo real para a detecção de NoV GI e NoV GII e de PCR em tempo real para a detecção de HAdV encontram-se na Tabela 3. A determinação do LOD foi efetuada usando material de referência quantificado adquirido ao CEERAM (NoV GI e NoV GII) e à Vircell (HAdVC1 e HAdVF41).

Tabela 3: LOD, em cópias genómicas por reação de amplificação, para os métodos de detecção montados para NoV GI, NoV GII e HAdV.

Método de detecção para o alvo		LOD (cópias genómicas/reação de amplificação)
NoV GI		1000
NoV GII		10
HAdV	HAdVC1	100
	HAdVF41	100

Não foi determinado o LOD para o método de detecção de HAV uma vez que não foi encontrado comercialmente disponível nenhum controlo positivo quantificado de RNA que permitisse a amplificação quando usado com o conjunto de *primers* e sonda selecionado.

1.4.2 Especificidade

A especificidade pode ser definida como a capacidade de o método detetar apenas aquilo para o qual foi concebido, ou seja, um método é tão mais específico quanto menor o número de falsos positivos.

Os métodos de deteção de cada vírus, e seu conjunto de *primers* e sonda, mostraram ser específicos para os seus alvos correspondentes (ver Tabela 4).

Tabela 4: Resultados da especificidade de cada método de deteção de vírus. Cada teste de especificidade foi efetuado com ácidos nucleicos de cada um dos vírus indicados e repetido em triplicado. (+): amplificação em cada um dos triplicados; (-): sem amplificação em nenhum dos triplicados.

Método de deteção para o alvo	Vírus testados	Amplificação
NoV GI	NoV GI	+
	NoV GII	-
	HAV	-
	HAdV	-
NoV GII	NoV GI	-
	NoV GII	+
	HAV	-
	HAdV	-
HAV	NoV GI	-
	NoV GII	-
	HAV	+
	HAdV	-
HAdV	NoV GI	-
	NoV GII	-
	HAV	-
	HAdV	+

1.4.3 Reprodutibilidade dos métodos de deteção

A reprodutibilidade refere-se à capacidade de duplicar uma experiência obtendo o mesmo resultado quando se utiliza o mesmo método de ensaio sobre uma mesma amostra. Fazendo-se variar certos parâmetros, tais como diferentes laboratórios (intra ou interlaboratorial), diferentes operadores, diferentes equipamentos, e/ou épocas diferentes, pode-se avaliar a reprodutibilidade referente a cada um desses parâmetros.

Os métodos de deteção de cada um dos vírus por RT-PCR e PCR em tempo real testados permitiram a amplificação do LOD para todos os alvos em estudo em todos os termocicladores testados, mostrando serem suficientemente robustos para permitir a sua aplicação em diferentes termocicladores (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados da reprodutibilidade dos métodos de detecção de cada um dos vírus em diferentes termocicladores. Cada teste foi efetuado com ácidos nucleicos de cada um dos vírus indicados e repetido em triplicado nos termocicladores iQ5 Real-Time PCR Detection Systems, 7500 Real-Time PCR System, e PikoReal Real-Time PCR System, e em duplicado no termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System. (+): amplificação em um dos replicados.

Termocicladores testados	Método de detecção para o alvo:			
	NoV GI	NoV GII	HAV	HAdV
iQ5 Real-Time PCR Detection Systems	+++	+++	+++	+++
7500 Real-Time PCR System	+++	+++	+++	+++
PikoReal Real-Time PCR System	+++	+++	+++	+++
StepOnePlus Real-Time PCR System	++	++	++	++

2 Aplicação do método de detecção de vírus por PCR/RT-PCR a amostras reais

2.1 Extração de partículas virais

A detecção de partículas virais em matrizes alimentares envolve, como primeira etapa, a extração dessas mesmas partículas das respectivas matrizes alimentares alvo. Essa primeira etapa é essencial porque, por um lado, os alimentos são matrizes de elevada complexidade que podem conter substâncias capazes de inibir o passo de amplificação de ácidos nucleicos e, por outro lado, as partículas virais-alvo podem estar presentes nessas matrizes em concentrações muito reduzidas. Torna-se então necessário proceder a uma separação e/ou concentração das partículas virais, especificamente indicadas para cada tipo de matriz alimentar, de modo a obter material com as características necessárias para os subsequentes passos do processo.

Resumidamente, para a extração de partículas virais de frutos vermelhos e bagas, as partículas virais presentes nessas matrizes são colocadas em suspensão com a ajuda de um tampão específico. Após diversos passos de clarificação e precipitação com polietilenoglicol (PEG)/NaCl, o sobrenadante contendo as partículas virais pode então ser usado para a extração de ácidos nucleicos. No caso de bivalves o primeiro passo envolve a recuperação de uma determinada quantidade de glândulas digestivas do bivalve em estudo. Após homogeneização das glândulas digestivas e diversas incubações e tratamentos com uma solução de proteinase K, o homogenato é centrifugado, o sobrenadante é descartado e o sedimento resultante é clarificado, podendo então proceder-se à extração de ácidos nucleicos. No caso de águas para consumo, estas matrizes são filtradas por um filtro carregado positivamente que tem como função reter as eventuais partículas virais. Essas partículas virais retidas no filtro são colocadas novamente em suspensão com a ajuda de um tampão específico. Os vírus isolados são de seguida concentrados recorrendo a um concentrador, posteriormente clarificados, podendo então proceder-se à extração de ácidos nucleicos.

2.2 Vírus de controlo de processo

Durante a totalidade do protocolo de deteção de partículas virais, nas etapas quer de extração de partículas virais das partículas virais da amostra quer da extração de ácidos nucleicos, podem ocorrer perdas de material alvo. De modo a controlar essas perdas, adiciona-se às amostras no início do seu processamento uma quantidade definida de um vírus de controlo de processo. A percentagem de recuperação desse vírus de controlo de processo adicionado é determinada para cada amostra, permitindo assim definir as perdas devidas ao seu processamento.

O vírus selecionado para uso como controlo de processo deve ser cultivável, ter uma resistência físico-química comparável nas diferentes matrizes em estudo e uma dimensão semelhante à dos vírus alvo a serem detetados, ser geneticamente distinto dos vírus alvo de modo a não interferir com o passo de deteção por amplificação, e não deve estar naturalmente presente nas amostras a analisar. A norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) recomenda a utilização do vírus Mengo como controlo de processo. O vírus Mengo é um vírus murino pertencente à família *Picornaviridae*. A estirpe MC0 deste vírus Mengo é um vírus recombinante com propriedades de crescimento em cultura idênticas ao da estirpe selvagem, mas com um fenótipo avirulento em modelos animais.

2.2.1 Curva padrão de RNA do vírus de controlo de processo

De modo a estimar a eficiência do processo de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos seguiu-se o procedimento descrito pelo fabricante do *kit*, que por sua vez segue as recomendações propostas pela norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b). Nesta norma está definido que a curva padrão de RNA do vírus Mengo tem de ser sempre repetida a cada vez que se realiza uma nova extração e que requer pontos de um mínimo de 3 diluições decimais com um coeficiente de correlação de Pearson $r^2 \geq 0,98$.

Para a construção da curva padrão utilizaram-se os ciclos de amplificação de diluições decimais seriadas de RNA do vírus Mengo. Na Figura 8 estão apresentados três exemplos das curvas de calibração de eficiência de processo, e respetivos coeficientes de correlação, obtidos durante a análise de amostras correspondentes a diferentes matrizes alimentares. Todas as curvas padrão utilizadas para calcular a eficiência de recuperação em cada matriz tiveram um coeficiente de correlação de Pearson $r^2 \geq 0,98$. Cada curva padrão representada na Figura 8 apresenta variações na ordenada na origem, não havendo, no entanto, variação do declive. Essas variações podem dever-se à variabilidade das estimativas de Ct inerentes à técnica de PCR em tempo real bem como ao facto de cada umas dessas curvas ser proveniente de uma alíquota de vírus Mengo distinta. Cada alíquota de vírus Mengo pode ter sido submetida a diferentes ciclos de congelamento/descongelamento e por isso não conter exatamente a mesma quantidade inicial de material genético.

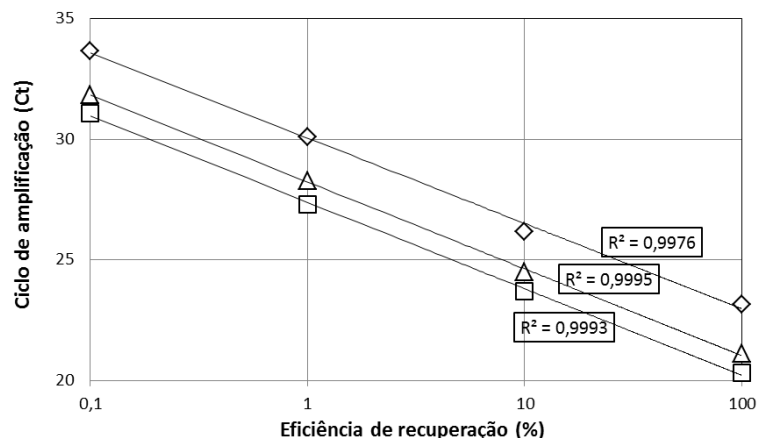


Figura 8: Exemplo de curvas padrão de amplificação de diluições decimais seriadas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) de RNA do vírus Mengo e respetivo coeficiente de correlação de Pearson (r^2). Curvas padrão obtidas durante os ensaios de determinação da eficiência de recuperação nas seguintes matrizes: bivalves (◇), águas de consumo (△), e frutos vermelhos e bagas (□).

2.2.2 Eficiência da totalidade do processo de extração de ácidos nucleicos virais a partir de diferentes matrizes alimentares

De modo a calcular a eficiência da totalidade do processo de extração de ácidos nucleicos virais a partir de diferentes matrizes alimentares, compararam-se os resultados do Ct do vírus Mengo adicionado a cada amostra, e que seguiu a totalidade do processamento, com a curva padrão de amplificação previamente descrita. Após correção dos valores obtidos tendo em conta os necessários fatores de diluição específicos para cada processo de extração (matriz alimentar e amostra), foram calculadas desta forma as eficiências da totalidade do processo de extração de ácidos nucleicos a partir das diferentes matrizes alimentares em estudo (Tabela 6). Para o cálculo da eficiência da totalidade do processo foi utilizada a diluição D^{-1} dos ácidos nucleicos extraídos do vírus Mengo de cada um dos replicados de cada amostra dos diferentes tipos de matrizes alimentares, uma vez que na diluição D^0 dificilmente se conseguiram amplificações consistentes. Esta inibição na amplificação, quando utilizada a amostra pura, foi possivelmente provocada devido à presença de interferentes provenientes dos passos de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos.

Tabela 6: Fator de diluição, eficiência e respetivo coeficiente de variação do processo de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos virais para os replicados de diferentes amostras nos diferentes tipos de matrizes alimentares em estudo: águas para consumo, frutos vermelhos e bagas, e bivalves. A eficiência do processamento das matrizes foi obtida recorrendo ao *kit* de controlo de processo adquirido ao CEERAM. O fator de diluição tem em conta as diluições provenientes do processo de extração de partículas virais e de extração de ácidos nucleicos.

Matriz Alimentar		Replicado	Fator de diluição	Eficiência %	
Água de consumo	Engarrafada Set #1	1	5,00	59,69	29,82 (± 21,19)
		2	6,25	19,1	
		3	6,25	10,95	
	Engarrafada Set #2	1	4,38	4,86	4,86
Frutos vermelhos e bagas	Framboesas	1	5,00	15,08	14,87 (±2,74)
		2	6,25	17,5	
		3	2,25	12,03	
	Mirtilos	1	1,00	102,46	134,57 (± 31,81)
		2	1,00	135,17	
		3	1,00	166,07	
Bivalves	Mexilhão Set #1	1	6,00	4,4	3,53 (± 0,99)
		2	6,00	3,72	
		3	6,00	2,46	
	Mexilhão Set #2	1	6,25	8,48	6,62 (± 4,47)
		2	5,25	1,52	
		3	7,50	9,85	

Os valores da eficiência da totalidade do processo de recuperação de ácidos nucleicos a partir de cada matriz alimentar demonstram uma grande variabilidade entre diferentes categorias de matrizes, entre os diferentes tipos de amostra dentro de uma mesma categoria de matriz, e em alguns casos entre replicados do mesmo processo.

A variabilidade dos resultados observados pode ser devida a diversos fatores que afetam a totalidade do processo de recuperação de ácidos nucleicos. Cada amostra analisada dentro de cada categoria de matriz alimentar tem características específicas que podem levar a uma diferença na eficiência do processo (e.g. framboesas vs. mirtilos na categoria frutos vermelhos e bagas). Além disso, o passo de extração de partículas virais específico para cada categoria de matriz alimentar é distinto o que pode igualmente afetar a eficiência do processo para categorias de matrizes diferentes (e.g. água de consumo vs. frutos vermelhos e bagas vs. bivalves). E de igual forma, a totalidade do processo de obtenção de ácidos nucleicos virais a partir de matrizes alimentar é composto por numerosas etapas distintas que por efeito cumulativo podem levar à variabilidade observada.

As matrizes alimentares contempladas na norma ISO/TS 15216-2:2013 (ISO 2013b) não requerem validação prévia dos métodos usados para a extração de partículas virais. Esta norma apenas faz referência à eficiência da totalidade do processo, determinando que se esta for <1% os resultados obtidos das amostras não são válidos e a amostra tem de ser novamente testada (com a exceção do caso em que, mesmo com uma eficiência <1%, existe um distinto sinal positivo de deteção do genoma viral alvo).

Independentemente da variabilidade de eficiência de processo observada, a totalidade dos replicados testados correspondentes às diferentes amostras de matrizes alimentares em

estudo obtiveram uma eficiência superior a 1%. Todas as amostras analisadas foram assim consideradas válidas e o método de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos adequado às matrizes em estudo.

2.3 Detecção de genomas virais em matrizes alimentares artificialmente contaminadas

Após confirmação que todas as amostras a analisar correspondentes a diferentes matrizes alimentares eram consideradas válidas em relação à eficiência da totalidade do processo, procedeu-se então à deteção por PCR e RT-PCR em tempo real dos diferentes genomas virais usados para contaminar artificialmente essas amostras.

Para a deteção dos genomas virais de HAdV, HAV, NoV GI, e NoV GII, recorreu-se aos métodos de deteção previamente desenvolvidos, descritos no ponto IV - 1.1 e IV - 1.3. Os resultados da deteção das sequências virais alvo em diferentes matrizes alimentares encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados dos replicados da deteção das sequências alvo de NoV GI, NoV GII, HAdV e HAV nas matrizes alimentares em estudo: água engarrafada, framboesas, mirtilos, e mexilhões. Para cada replicado: (+) sequência viral alvo detetada; (-) sequência viral alvo não detetada.

Matriz alimentar		NoV GI	NoV GII	HAV	HAdV
Água de consumo	Engarrafada #1	-, -, -	-, -, -	-, -, -	-, -, -
	Engarrafada #2	-	-	-	-
Frutos vermelhos e bagas	Framboesas	-, -, -	+, +, +	+, +, +	-, -, -
	Mirtilos	-, -, -	+, +, +	+, +, +	-, -, -
Bivalves	Mexilhão #1	-, -, -	-, -, -	-, -, -	-, -, -
	Mexilhão #2	-, -, -	-, -, -	-, -, -	-, -, -

Como é possível observar na Tabela 7, apenas se conseguiram detetar os genomas virais de NoV GII e HAV na matriz alimentar de frutos vermelhos e bagas. No entanto nesta mesma matriz não se conseguiu obter amplificação para os outros vírus em estudo, NoV GI e HAdV. Os métodos de deteção otimizados ao longo deste trabalho para deteção de NoV GI e HAdV apenas conseguem detetar a partir de 1000 cópias genómicas por reação para NoV GI e 100 cópias genómicas por reação para HAdV. O material de referência utilizado para contaminar artificialmente cada amostra não contém qualquer informação relativa à sua concentração. Torna-se por isso impossível saber previamente se a quantidade inicial de cada vírus utilizada para contaminar as amostras é suficiente para permitir a sua deteção. Existe a possibilidade que a quantidade de genomas virais de NoV GI e HAdV estejam abaixo do LOD do método e que por isso não sejam detetados no passo de amplificação por PCR e RT-PCR em tempo real. A complexidade da matriz pode igualmente ser responsável pela interferência diferencial nos métodos específicos de deteção de ácidos nucleicos para os diferentes vírus.

Na matriz de bivalves, nas amostras de mexilhão do conjunto 1 a baixa quantidade inicial de vírus usada para contaminar as amostras pode justificar o facto de não se ter conseguido detetar genomas virais. No entanto, mesmo com um aumento na quantidade inicial de vírus usada para contaminar as amostras de mexilhão do conjunto 2 também não se conseguiu

detetar genomas virais em nenhuma das amostras neste conjunto. A quantidade de vírus utilizada para contaminar as amostras em ambos os conjuntos, o fator de diluição, e o facto das amostras desta matriz apresentarem uma eficiência muito baixa na recuperação do vírus Mengo pode justificar a incapacidade de detetar os genomas virais alvo.

No caso da matriz das águas de consumo, as amostras de água engarrafada do conjunto 1 apresentam fatores de diluição e eficiências semelhantes ou superiores às amostras de framboesas na matriz de frutos vermelhos e bagas. No entanto, nestas amostras não se consegue detetar nenhum dos genomas virais adicionados. A possível presença de inibidores nos ácidos nucleicos provenientes do protocolo de extração de partículas virais de águas de consumo pode afetar diferencialmente as reações de amplificação dos vírus, em que é usada uma *mastermix* específica, e as reações do vírus Mengo que têm outra *mastermix* diferente. Outra possível explicação prende-se com a quantidade de genomas virais de NoV GI, NoV GII, HAV e HAdV que poderá estar muito próxima do LOD dos métodos de deteção, impossibilitando a deteção no passo de amplificação por PCR e RT-PCR. Na amostra de framboesas, por exemplo, já existe um replicado em que não se obteve amplificação para NoV GII, o que pode justificar essa proximidade do LOD. No conjunto 2, a quantidade utilizada para contaminar a amostra de água engarrafada foi muito superior às quantidades utilizadas nas outras amostras da mesma matriz, mas esta amostra apresenta em simultâneo uma eficiência de recuperação de vírus Mengo muito baixa e um fator de diluição ligeiramente mais elevado. Estes factos podem tornar difícil a deteção dos vírus uma vez que a quantidade de vírus alvo na reação final, após todo o processo de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos, pode ser muito pequena não permitindo a sua deteção.

3 Deteção e quantificação de adenovírus humanos por PCR digital

3.1 PCR digital

O dPCR é uma nova abordagem alternativa ao PCR quantitativo (qPCR) em tempo real, permitindo a deteção e quantificação absoluta de ácidos nucleicos alvo sem necessidade de recorrer a uma curva de calibração (Dong et al. 2015). O qPCR em tempo real é uma técnica usada em rotina para a deteção e quantificação de agentes patogénicos em amostras de alimentos e águas mas que pode ser sensível a inibidores presentes nessas mesmas matrizes (Coudray-Meunier et al. 2015). Por seu lado, a quantificação por dPCR é menos sensível a inibidores, uma vez que a quantificação não depende da eficiência da reação como é o caso no qPCR, e proporciona uma contagem absoluta dos alvos pesquisados sem a necessidade de material de referência (Coudray-Meunier et al. 2015).

3.2 Estratégia para a deteção e quantificação de adenovírus humanos

Na literatura, encontra-se descrito um método para a deteção e quantificação em simultâneo dos serótipos 40 e 41 de HAdV por dPCR (Kishida et al. 2014). Torna-se relevante

e interessante desenvolver um método que permita, para além dos serótipos 40 e 41, a deteção e quantificação por dPCR de todos os outros 69 serótipos de HAdV descritos até à data do desenvolvimento desta parte do trabalho (Abril de 2015).

3.2.1 Identificação das regiões conservadas

Para a identificação de eventuais regiões conservadas nos genomas dos diferentes serótipos de HAdV, genomas completos de cada um desses serótipos, uma sequência para cada serótipo, foram selecionados e importados das bases de dados de nucleótidos (GenBank, NCBI) utilizando o programa bioinformático UGENE (Okonechnikov et al. 2012). O alinhamento múltiplo de todas as 69 sequências selecionadas foi realizado utilizando o programa MAFFT (Versão 7) dentro do programa bioinformático UGENE. No alinhamento múltiplo foram identificadas regiões com níveis de conservação acima de 95%. Uma dessas regiões, que contém o gene que codifica para a proteína do hexão (proteína II da cápside que se localiza na unidade transcricional L3), foi selecionada por ter a maior extensão com um nível mais elevado de conservação entre todas as regiões conservadas dos genomas de HAdV (ver Figura 11 no Anexo IId).

3.2.2 Seleção de *primers* e sondas

Apesar da região selecionada apresentar uma elevada conservação no alinhamento múltiplo, a totalidade das sequências pertencentes a essa região não são idênticas. Um conjunto único de dois *primers* e uma sonda, degenerados ou não degenerados, com as características necessárias para satisfazer os requisitos da química desta técnica não permitiria detetar a totalidade das sequências alvo por existirem, no alinhamento múltiplo, demasiadas posições não conservadas. De modo a garantir um máximo de uma única não complementaridade entre os nucleótidos de cada *primer* e sonda e a sequência alvo foi então selecionado um conjunto constituído por um *primer forward*, dois *primers reverse*, e duas sondas em que a sequência desses *primers* e sondas foi degenerada em alguns nucleótidos.

O conjunto de *primers* e sondas foi desenhado com sucesso *in silico* de modo a ser usado para a deteção e quantificação por dPCR de todos os tipos de HAdV descritos até à data do desenvolvimento deste trabalho (ver Tabela 33 no Anexo IIe).

3.3 Deteção e quantificação de adenovírus por PCR digital

De forma a otimizar o método de deteção e quantificação de HAdV por dPCR foram testadas diferentes combinações de concentrações e proporções de *primers* e sondas, tal como diferentes condições de amplificação.

As melhores condições de amplificação e as melhores concentrações e proporções do conjunto de *primers* e sondas foram selecionadas de forma a otimizar a discriminação entre populações de amplificação positivas e negativas (ver

Tabela 34 no Anexo IId). Na

Figura 9 é possível observar que se consegue uma maior discriminação entre as populações com e sem amplificação ao aumentar o número de ciclos do PCR.

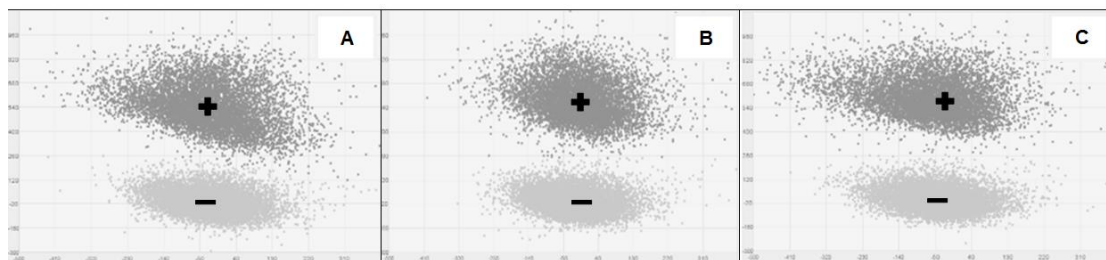


Figura 9: Gráficos da dispersão da fluorescência atribuída a cada poço de um chip em que se procedeu à amplificação de amostra de HAdVC1. O sinal correspondente ao fluoróforo FAM encontra-se no eixo das ordenadas e o sinal correspondente ao fluoróforo VIC no eixo das abcissas. Exemplo de diferenças na discriminação entre populações com (+) e sem (-) amplificação, quando efetuadas leituras ao ciclo 35 (A), ciclo 40 (B) e ao ciclo 45 (C), ao longo do programa de dPCR para a quantificação da amostra em questão.

O método desenvolvido foi utilizado com sucesso para detetar e quantificar três amostras diferentes de HAdV (Figura 10). Este método tem um erro associado de deteção de falsos positivos de $0,58 (\pm 0,23)$ cópias/ μl . Uma das possíveis causas para a existência de falsos positivos nos controlos negativos pode prender-se com a existência de ruído na imagem obtida através do sistema de leitura, o que pode levar um poço do chip a ser considerado positivo após processamento dos resultados pelo programa de análise.

No processo de otimização deste método utilizou-se o controlo positivo HAdVC1, e testaram-se 3 condições diferentes de proporções e concentrações de *primers* e sondas (ver [redacted] no anexo Ih), bem como 4 temperaturas de *annealing* distintas (ver [redacted] no anexo Ih) para as diferentes condições de amplificação. Para um total de 7 condições diferentes testadas obteve-se um coeficiente de variação de 8,86% ($483,37 \pm 42,8$ copias/ μl). O método de dPCR desenhado para a quantificação de HAdV mostrou ser muito robusto para as diferentes proporções e concentrações de *primers* e sondas testados, bem como para as diferentes condições de amplificação aplicadas.

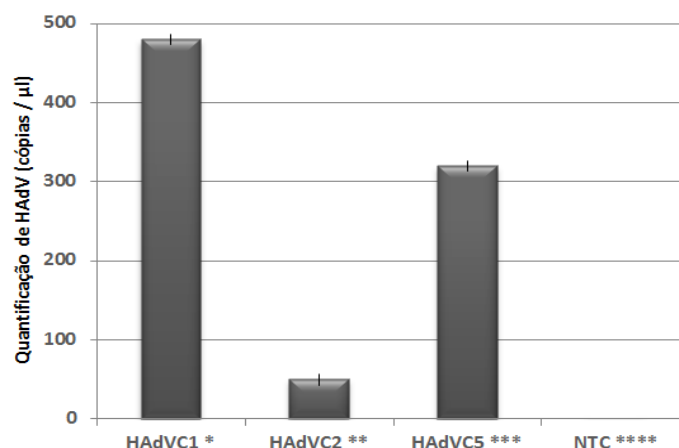


Figura 10: Detecção e quantificação de HAdV por dPCR, em cópias/μl, nas amostras seguintes: (*) Controlo positivo de HAdV serótipo 1, quantificação realizada em quadruplicado; (**) DNA de concentração desconhecida extraído de HAdV serótipo 2 com o *kit* Maxwell 16 Viral Total Nucleic Acid Purification quantificação realizada com um replicado; (***) Controlo positivo de HAdV tipo 5 fornecido pela Unidade de Serviços Analíticos do iBET (Oeiras, Portugal), quantificação realizada em duplicado; (****) Controlo negativo (NTC), experiência realizada em quadruplicado.

Os resultados obtidos revelaram uma inconsistência entre o número de cópias determinado por este método de quantificação (dPCR) e o valor nominal atribuído ao material de referência quantificado testado (quantificação realizada por qPCR em tempo real). Esta inconsistência foi descrita anteriormente com diferenças nas quantificações entre qPCR e ddPCR (*droplet* dPCR) que variam de 10 a 60% (Henrich et al. 2012). No caso da técnica de ddPCR, estas variações podem ser devidas à etapa da partição da reação (passo de formação de gotículas) que pode ser extremamente variável. As gotículas têm a mesma função que os poços de um chip, particionando a reação em muitas reações de PCR individuais. Uma má partição da reação pelos vários poços/gotículas pode influenciar o resultado final da quantificação o que não acontece na quantificação por qPCR uma vez que esta não é particionada.

Por outro lado, um aspeto importante a ter em conta é o facto de que todos os padrões quantificados utilizados no dPCR serem quantificados por qPCR ou por espectrofotometria. Isto faz com que a análise dos resultados obtidos por dPCR dependa, em algum passo, de uma comparação com padrões cuja quantificação pode estar afetada pelas limitações dessas outras técnicas. Seria importante o desenvolvimento de padrões quantificados por dPCR que pudessem servir de controlo interno, sendo desta forma independentes de outros métodos ou técnicas de quantificação.

V. Conclusão e perspectivas futuras

O consumo de água e alimentos contaminados continua a representar um problema para a saúde humana. A contaminação de alimentos pode ocorrer ao longo da cadeia de produção alimentar, quer durante a sua colheita ou preparação por manipuladores infetados bem como pelo contacto com águas impróprias para consumo, tal como água de esgoto ou poluída. O número de casos de surtos alimentares com origem viral tem vindo a crescer devido ao aumento da população, à escassez de água própria para consumo, à mudança de hábitos alimentares, mas também devido a um aumento do comércio internacional onde alimentos produzidos num determinado local podem ser consumidos longe da sua origem. Apesar da principal via de contágio por vírus responsáveis por gastroenterites humanas ser feita pessoa-a-pessoa, os alimentos também constituem um veículo muito significativo na transmissão destes microrganismos. As gastroenterites virais têm sido subestimadas ao longo dos anos, principalmente por falta de meios de diagnóstico. A utilização de técnicas de biologia molecular na pesquisa de vírus em alimentos poderá certamente contribuir para o reconhecimento da importância de certos grupos de vírus como organismos patogénicos veiculados por alimentos.

Um dos objetivos deste trabalho foi a implementação de metodologias com base em biologia molecular que permitissem a deteção de alguns dos vírus prioritários descritos como responsáveis pela contaminação de alimentos. Para tal foram desenvolvidos e otimizados métodos de deteção de NoV GI, NoV GII, HAV e HAdV por RT-PCR e PCR em tempo real. Os métodos de deteção de cada vírus, e seu conjunto de *primers* e sonda selecionados, mostraram ser específicos para os seus respetivos alvos e reprodutíveis quando testados em quatro termocicladores diferentes. Para os métodos de NoV GI, NoV GII e HAdV foi possível determinar o LOD correspondente. O desenvolvimento destes métodos permitiu selecionar o *kit* de extração de ácidos nucleicos mais adaptado para essa finalidade, que foi posteriormente usado na extração de partículas virais a partir de diferentes amostras alimentares.

Os métodos de extração de partículas virais e extração de ácidos nucleicos aplicados às diferentes matrizes alimentares foram considerados válidos, segundo as regras sugeridas na ISO/TS 15216-2:2013, uma vez que todas as amostras apresentaram uma eficiência de recuperação superior a 1%. No entanto existe uma variabilidade considerável na eficiência de recuperação de processo observada entre diferentes categorias de matrizes, entre os diferentes tipos de amostra dentro de uma mesma matriz, e em alguns casos entre replicados do mesmo processo. Esta variabilidade pode explicar o facto de não ter sido possível detetar genomas virais de nenhum dos vírus em estudo nas matrizes de águas de consumo e bivalves, e de apenas se ter conseguido detetar NoV GII e HAV na matriz de frutos vermelhos e bagas. Apesar dos resultados obtidos estarem incluídos na variabilidade associada ao método, estes também revelaram a importância de otimizar os métodos existentes ou de encontrar métodos alternativos que demonstrem ser mais robustos para o objetivo em causa.

No decorrer deste trabalho foi igualmente desenvolvido com sucesso um método de dPCR para a detecção e quantificação em simultâneo de todos os serótipos de HAdV descritos até a data da realização da parte experimental correspondente.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que algumas questões pertinentes ainda ficaram em aberto.

Seria relevante existirem comercialmente disponíveis partículas infecciosas virais quantificadas para todos os vírus em estudo que permitissem determinar o LOD da totalidade do método de detecção e não apenas do passo de amplificação por PCR e RT-PCR. O limite de detecção deve estar em linha com o que constitui uma dose infecciosa média e idealmente ser <10 partículas virais, por isso, seria igualmente importante e essencial encontrar métodos para todos os vírus em estudo que permitissem baixar o LOD.

Outro critério que seria desejável obter seria o desenvolvimento de um método mais rápido entre o processamento da amostra e a obtenção de resultados. Esse acréscimo de rapidez poderia ser benéfico para as autoridades competentes encarregadas de realizar análises em alimentos.

Também seria interessante avaliar quais os passos do processo existente para a extração de partículas virais a partir de diferentes matrizes em que ocorrem a maior parte das perdas, influenciando então o subsequente passo de detecção. Também seria interessante a otimização do processo existente para essa extração de partículas virais ou o desenvolvimento de um processo alternativo que permitisse a recuperação de partículas virais mais eficiente e de forma mais robusta.

Apesar do aumento da sensibilidade dos métodos quantitativos de RT-PCR e PCR em tempo real para a detecção de vírus, os resultados que indicam a presença do alvo pesquisado podem não significar diretamente um forçoso risco de infeção, isto porque as cópias virais detetadas por PCR não estão diretamente relacionadas com partículas infecciosas virais (EFSA, 2011). O risco associado ao consumo de alimentos cuja análise revelou a presença do alvo viral pesquisado não é direto. Para solucionar este problema, alguns estudos sugerem a utilização de PMA (*propidium mono azide*) e EMA (*ethidium bromide monoazide*) permitindo a discriminação entre partículas infecciosas e partículas não infecciosas (Kim et al. 2011; Kim & Ko 2012; Parshionikar et al. 2010; Henrich et al. 2012; Sánchez et al. 2012).

Por outro lado, deveria haver em simultâneo uma avaliação contínua dos procedimentos de produção e preparação de alimentos tais como inspeções sanitárias, formação, auditorias e outros métodos para verificar as práticas agrícolas e as práticas de higiene utilizadas (incluindo as praticas de higiene de manipuladores de alimentos). A avaliação de sistemas de monitorização das águas utilizadas nas regas e na produção de bivalves deve ser priorizada.

Por fim seria importante aplicar estes métodos sob a forma de *kit* ou serviço em empresas que realizam análises alimentares e que investigam a influência do consumo de alimentos contaminados com vírus na saúde pública.

Atingir todos estes critérios descritos seria desejável. No entanto, a realização de qualquer um destes critérios ou de uma combinação deles será um avanço significativo sobre a metodologia até agora desenvolvida. A melhoria dos métodos de detecção dos vírus poderá então permitir uma monitorização mais eficaz destes agentes nos alimentos e ajudar a reforçar a segurança do consumo dos produtos alimentares mais associados a viroses transmitidas por alimentos.

VI. Referências

- Appleton, H., 2000. Control of food-borne viruses. *British Medical Bulletin*, 56(1), pp.172–183.
- Baert, L. et al., 2011. Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), pp.261–269.
- van den Berg, H. et al., 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology*, 156(4), pp.532–540.
- Bosch, A., Sánchez, G., et al., 2011. Analytical Methods for Virus Detection in Water and Food. *Food Analytical Methods*, 4(1), pp.4–12.
- Bosch, A., Bidawid, S., et al., 2011. Norovirus and Hepatitis A virus in shellfish, soft fruits and water. *Rapid Detection, Identification, and Quantification of Foodborne Pathogens*, 44(March), pp.466–477.
- Breese, J.S. et al., 2002. Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35, pp.748–753.
- Buckwalter, S.P. et al., 2012. Real-Time Qualitative PCR for 57 Human Adenovirus Types from Multiple Specimen Sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, pp.766–771.
- CDC, 2015. Adenovirus. Available at: <http://www.cdc.gov/adenovirus/index.html> [Accessed November 12, 2015].
- CDC, 2014. CDC - Estimates of Foodborne Illness in the United States. Available at: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/estimates-overview.html> [Accessed November 9, 2015].
- CDC, 2013. Norovirus | Treatment. Available at: <http://www.cdc.gov/norovirus/about/treatment.html> [Accessed January 7, 2016].
- Conte, D. et al., 2015. Novel method to detect microRNAs using chip-based QuantStudio 3D digital PCR. *BMC Genomics*, 16(1), p.849.
- Coudray-Meunier, C. et al., 2015. A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *International journal of food microbiology*, 201, pp.17–26.
- Dong, J. et al., 2008. Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnostics. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 10(3), pp.185–197.
- Dong, L. et al., 2015. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material. *Nature Publishing Group*, 13174(5), pp.1–11.
- Duizer, E. et al., 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, 85, pp.79–87.
- Dung, T.T.N. et al., 2013. The validation and utility of a quantitative one-step multiplex RT real-time PCR targeting Rotavirus A and Norovirus. *Journal of Virological Methods*, 187(1), pp.138–143.
- EFSA, 2011a. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal*, 9(7), pp.1–96.
- EFSA, 2011b. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 9(3), pp.1–378.
- EFSA e ECDC, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1), pp.3991, 162pp.
- EFSA e ECDC, 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, pp.1–378.
- EFSA Panel on Biological Hazards, 2014. Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in leafy greens eaten raw as salad). *European Food Safety Authority*, 12, pp.1–118.
- Ercsey-Ravasz, M. et al., 2012. Complexity of the international agro-food trade network and its impact on food safety. *PLoS one*, 7(5), p.e37810.
- European Commission., 2013. *The Rapid Alert System for Food and Feed 2013 Annual Report*,
- FAO & WHO, 2010. FAO/WHO Framework for developing national food safety emergency response plans. , p.24.
- FAO/WHO, 2008. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. *Microbiological Risk Assessment Series*, 14(1726-5274), pp.1–151.
- Food, A.C. on the M.S. of, 2009. *An update on viruses in the food chain*,
- Fout, G.S. et al., 2012. *Method 1615: Measurement of Enterovirus and Norovirus occurrence in water by culture and RT-qPCR*,
- Ghebremedhin, B., 2013. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 4(1), pp.26–33.
- Green, G. et al., 2010. *Caliciviruses: Molecular and Cellular Virology*, Horizon Scientific Press.

- Greig, J.D. et al., 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 1. Factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories. *Journal of food protection*, 70(9), pp.2199–2217.
- Le Guyader, F.S. et al., 2006. Detection of Multiple Noroviruses Associated with an International Gastroenteritis Outbreak Linked to Oyster Consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), pp.3878–3882.
- Havelaar, A.H., Nauta, M.J. & Jansen, J.T., 2004. Fine-tuning Food Safety Objectives and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 93, pp.11–29.
- Henrich, T.J. et al., 2012. Low-Level Detection and Quantitation of Cellular HIV-1 DNA and 2-LTR Circles Using Droplet Digital PCR. *Viral Methods*, 186, pp.68–72.
- IDT, 2016. Integrated DNA Technologies - Home. Available at: <https://eu.idtdna.com/site> [Accessed February 15, 2016].
- ISO, 2013a. ISO/TS 15216-1:2013 - Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 1: Method for quantification.
- ISO, 2013b. 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 *Microbiologie*,
- Iwai, M. et al., 2009. Continuous Presence of Noroviruses and Sapoviruses in Raw Sewage Reflects Infections among Inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), pp.1264–1270.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., et al., 2005. Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41 Quantitative. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), pp.3131–6.
- Jothikumar, N., Lowther, J. a., et al., 2005. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), pp.1870–1875.
- Kayser, F.H. et al., 2005. Medical Microbiology. In *New York*. pp. 376–473.
- Kim, K. et al., 2011. Development of a real-time RT-PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 63(3), pp.502–7.
- Kim, S.Y. & Ko, G., 2012. Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus. *Letters in applied microbiology*, 55(3), pp.182–8.
- Kishida, N. et al., 2014. Quantitative detection of human enteric adenoviruses in river water by microfluidic digital polymerase chain reaction. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 70(3), pp.555–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25098888> [Accessed February 14, 2016].
- Konduru, K. & Kaplan, G.G., 2006. Stable Growth of Wild-Type Hepatitis A Virus in Cell Culture Stable Growth of Wild-Type Hepatitis A Virus in Cell Culture. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 80(3), pp.1352–1360.
- Koopmans, M. et al., 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), pp.187–205.
- Koopmans, M. & Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), pp.23–41.
- Lee, S.J. et al., 2015. Effect of Temperature and Relative Humidity on the Survival of Foodborne Viruses during Food Storage. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), pp.2075–2081.
- Life Technologies, 2012. *Real-time PCR handbook*,
- López-Campos, G. et al., 2012. Detection, Identification, and Analysis of Foodborne Pathogens. In *Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens*. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. Boston, MA: Springer US, pp. 13–33.
- Mattison, K. & Bidawid, S., 2009. *Analytical Methods for Food and Environmental Viruses*,
- Miura, T. et al., 2013. Environmental detection of genogroup I, II, and IV noroviruses by using a generic real-time reverse transcription-PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21), pp.6585–6592.
- Myrmel, M. et al., 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), pp.2678–2684.
- Newell, D.G. et al., 2010. Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, pp.S3–S15.
- Nugen, S.R. & Baeumner, a. J., 2008. Trends and opportunities in food pathogen detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(2), pp.451–454.
- Okabayashi, T. et al., 2008. Occurrence of Norovirus Infections Unrelated to Norovirus Outbreaks in an Asymptomatic Food Handler Population. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), pp.1985–1988.
- Okonechnikov, K., Golosova, O. & Fursov, M., 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), pp.1166–1167.
- Parshionkar, S., Laseke, I. & Fout, G.S., 2010. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish

- between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), pp.4318–26.
- Pehler-Harrington, K. et al., 2004. Rapid detection and identification of human adenovirus species by Adenoplex, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), pp.4072–4076.
- Richards, G.P., 2001. Enteric virus contamination of foods through industrial practices: a primer on intervention strategies. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 27(2), pp.117–25.
- Robert, R. & Wagner, M.D., 2016. Virus | biology: Size and shape. Available at: <http://www.britannica.com/science/virus/Size-and-shape> [Accessed January 6, 2016].
- Sánchez, G., Bosch, A. & Pintó, R.M., 2007. Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Letters in Applied Microbiology*, 45(1), pp.1–5.
- Sánchez, G., Elizaquível, P. & Aznar, R., 2012. Discrimination of Infectious Hepatitis A Viruses by Propidium Monoazide Real-Time RT-PCR. *Food and Environmental Virology*, 4(1), pp.21–25.
- Scallan, E. et al., 2011. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), pp.7–15.
- Straub, T.M. et al., 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), pp.396–403.
- Stroparo, E. et al., 2010. Adenovirus respiratory infection: significant increase in diagnosis using PCR comparing with antigen detection and culture methods. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(6), pp.317–321.
- Tanaka, T. et al., 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *Journal of General Virology*, 88(3), pp.903–911.
- Taylor, M.B. & Nat, P.S., 2011. Water and foodborne viruses: current developments. *Continuing Medical Education*, 29(5), pp.207–209.
- Todd, E.C.D. et al., 2008. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 9. Washing and drying of hands to reduce microbial contamination. *Journal of food protection*, 73(10), pp.1937–1955.
- Tortora, J.G., Funke, R.B. & Case, L.C., 2012. *Microbiology: An Introduction (10th Edition)*,
- Vasickova, P. et al., 2005. Viruses as a cause of foodborne diseases: a review of the literature. *Veterinari Medicina*, 50(3), pp.89–104.
- Wacker, M.J. & Godard, M.P., 2005. Analysis of one-step and two- step real-time RT-PCR using superscript III. *Journal of Biomolecular Techniques*, 16(3), pp.266–271.
- WHO, 2000. *Hepatitis A*,
- WHO, 2005. Viruses. In *Water Recreation and Disease*. pp. 191–229.
- WHO, 2015. WHO | World Health Day 2015: From farm to plate, make food safe. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en/> [Accessed January 6, 2016].
- Williams-Woods, J., Hartman, G. & Burkhardt III, W., 2013. Laboratory Methods - BAM 26B: Detection of Hepatitis A Virus in Foods. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm374006.htm> [Accessed February 15, 2016].
- Wolf, S., Hewitt, J. & Greening, G.E., 2010. Viral Multiplex Quantitative PCR Assays for Tracking Sources of Fecal Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), pp.1388–1394.
- World Health Organization, 2015. WHO | WHO estimates of the global burden of foodborne diseases, Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/.
- Wrigley, T., 2007. Microbial counts and pesticide concentrations in drinking water after alum flocculation of channel feed water at the household level, in Vinh Long Province, Vietnam. *Journal of Water and Health*, 5(1), p.171.