

THAÍS CRISTINE MARQUES SINCERO

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES
NO MONITORAMENTO DO VÍRUS DA
HEPATITE A EM TECIDO DIGESTIVO
DISSECADO DE OSTRAS DE CULTIVO**

FLORIANÓPOLIS

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

THAÍS CRISTINE MARQUES SINCERO

**APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES
NO MONITORAMENTO DO VÍRUS DA
HEPATITE A EM TECIDO DIGESTIVO
DISSECADO DE OSTRAS DE CULTIVO**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia**

Orientadora: Profª Drª Célia Regina Monte Barardi

Co-Orientadora: Profª Drª Cláudia Maria Oliveira Simões

FLORIANÓPOLIS

2005

Dedico este trabalho a Deus
e ao meu Anjo da Guarda.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Célia Regina Monte Barardi, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela valiosa orientação, e principalmente grande amizade e confiança nestes anos de convívio.

À Prof^a. Cláudia Maria Oliveira Simões, pelas sugestões, apoio e amizade em todos os momentos, mas, principalmente, no momento de decisão pela carreira acadêmica.

Aos professores Carlos Zanetti, Mário Steindel, Edmundo Grisard e Sônia Carobrez, pela amizade e sugestões oferecidas no decorrer deste trabalho.

Ao pessoal dos laboratórios de Imunologia Aplicada e de Protozoologia, pelas festas, amizades e reagentes emprestados.

A todos os novos amigos do LVA, Alexandre, Márcia, Adriana, Vanessas, Jadel, Tiago e Jonas pelo trabalho em equipe e companheirismo.

Aos grandes amigos que fiz durante a realização deste trabalho, Carla, Carol, Cláudia e Javier, pela amizade e contribuições científicas ao trabalho.

Aos meus pais pelo amor incondicional em todas as fases da minha vida.

Aos meus irmãos e cunhados pelo amor e convivência.

Ao meu Dato, pelo amor e compreensão em todos os momentos.

A todos que passaram pela minha vida e que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA), coordenado pelas Professoras Célia Regina Monte Barardi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB) e Cláudia Maria Oliveira Simões (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS), na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

Entre setembro e outubro de 2003 o trabalho foi realizado no laboratório do Prof^o Dr^o David Levin na Universidade de Victória, B.C., no Canadá em estágio financiado pelo Canada-Latin American and the Caribbean Research Exchange Grant (LACREG) promovida pela Association of Universities and Colleges of Canada (AUCC).

Ele foi parcialmente financiado pelo BMLP (Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura) através da agência canadense CIDA (Canadian International Cooperation Agency).

Recebeu, também, apoio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, através da concessão de uma bolsa pela CAPES/MEC.

RESUMO

Com o grande crescimento da malacocultura em Santa Catarina, tornou-se necessário verificar e assegurar a qualidade sanitária destes moluscos, como também da água onde os mesmos são cultivados. Devido à característica de alimentação filtrante, moluscos bivalves podem bioacumular vírus e outros patógenos presentes em águas contaminadas por efluentes. O vírus da Hepatite A (HAV) tem sido detectado em surtos relacionados ao consumo de água ou alimentos contaminados, em especial de moluscos bivalves. Os métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase, a hibridização molecular e o sequenciamento são hoje os métodos mais recomendados para avaliação da presença de vírus entéricos com genoma RNA em amostras ambientais. O objetivo deste trabalho foi padronizar métodos para a detecção do vírus da Hepatite A a partir de tecidos de ostras. Para isso foram avaliados três protocolos de recuperação das partículas virais a partir de tecido digestivo dissecado das ostras e dois métodos de extração e purificação do RNA viral. Os protocolos selecionados combinam a dissecação do trato gastrointestinal das ostras, a extração orgânica antes da precipitação das partículas virais com PEG, a extração de RNA com Trizol LS[®] com a RT-PCR seguida pela hibridização molecular utilizando uma sonda marcada com digoxigenina. A sensibilidade do método foi determinada pela inoculação do trato gastrointestinal de ostras com diluições crescentes de HAV (0,001 a 10⁵FFU/mL), seja por inoculação direta ou por semeadura viral em aquários. A RT-PCR foi capaz de detectar 0,1FFU/ml, e a hibridização, até 0,001FFU/ml. O protocolo estabelecido foi utilizado para analisar a possível contaminação por HAV de amostras de ostras, coletadas em três fazendas de cultivo de Florianópolis. Por RT-PCR, os índices de contaminação foram 10,5%, 21,1% e 0% para os sítios 1, 2 e 3, respectivamente. Quando a hibridização molecular foi utilizada, a sensibilidade de detecção viral foi aprimorada, e passou para: 47,4%, 79,0% e 31,8%, respectivamente. Conforme demonstrado, a hibridização molecular mostrou-se 100 vezes mais sensível que a RT-PCR na detecção do HAV no trato gastrointestinal de ostras. Os dados aqui apresentados poderão ser úteis no estabelecimento de um programa de segurança alimentar, visando a comercialização de ostras com qualidade sanitária assegurada para o consumo.

ABSTRACT

Because shellfish (oysters, clams, and mussels) are filter-feeders, pathogens become concentrated within them, and human consumption of raw, or under-cooked shellfish can result in disease outbreaks. Hepatitis A virus (HAV) has been detected in water and food-borne outbreaks, principally involving bivalve shellfish. Identification of HAV in shellfish has been difficult for several reasons: the concentration of virions in shellfish tissues are very low, detection methods based on *in vitro* propagation are unreliable, recovery of virions from shellfish tissues is inefficient, and PCR inhibitors in shellfish tissues limit the success of RT-PCR. Moreover, Hepatitis A infections require a longer incubation for the manifestation of symptoms compared to other food-borne infectious diseases. These facts underlie difficulties in determining cause and effect relationships between Hepatitis A outbreaks and detection of HAV contamination in shellfish samples. The objective of this study was to develop and evaluate a reliable method for the detection of low levels of HAV in oyster tissues. The method combines dissection of the gastrointestinal oyster tract, organic extraction before PEG precipitation, and RNA extraction with Trizol LS®, with RT-PCR followed by hybridization with a digoxigenin-labeled HAV cDNA probe. The sensitivities of HAV detection by RT-PCR alone and by RT-PCR followed by dot blot hybridization in samples derived from virus stock and from seeded oysters were determined and compared. When RT-PCR was used, the end-point detection was 0.1 FFU/ml for RNA derived from 10-fold dilutions of virus stock (10^9 FFU/ml). The detection level achieved for RT-PCR followed by dot blot hybridization, however, was 0.001 FFU/ml, 100-fold higher than by RT-PCR alone. Similar results were obtained when dissected oysters were seeded with 10-fold dilutions of HAV, indicating that the oyster gastrointestinal tract did not interfere with the sensitivity of HAV detection when the processing protocol described above was used. The method was applied to assess HAV contamination in cultivated Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) obtained from three aquaculture farms located in Florianópolis. When RT-PCR was used, the percentages of HAV positive samples were 10.5%, 21.1% and 0% for sites 1, 2 and 3, respectively. RT-PCR followed by dot blot hybridization, however, detected HAV in 47.4%, 79.0% and 31.8% of the samples, respectively. These results will benefit both public health officials concerned about Hepatitis A infections caused by consumption of HAV-contaminated oysters and shellfish producers who require reliable methods for quality control of commercial oyster production.

ÍNDICE

1	Introdução.....	1
1.1	<i>Moluscos bivalves.</i>	1
1.1.1	Cultivo de moluscos em Santa Catarina.....	1
1.1.2	Hábito alimentar e capacidade de bioacumulação.....	2
1.1.3	Contaminação ambiental dos moluscos bivalves por microrganismos patogênicos	3
1.1.4	Controle sanitário da produção de moluscos.....	5
1.2	<i>Vírus entéricos.</i>	8
1.2.1	Vírus da Hepatite A (HAV)	9
1.2.2	Transmissão do vírus da hepatite A relacionada ao consumo de moluscos	12
1.3	<i>Métodos disponíveis para a detecção de contaminantes virais em águas e moluscos.....</i>	13
2	Objetivos	18
3	Materiais e Métodos	19
3.1	<i>Vírus e células.....</i>	19
3.1.1	Vírus da Hepatite A (HAV)	19
3.1.2	Células FrhK-4.....	19
3.1.3	Manutenção das células.....	19
3.1.4	Preparo da suspensão-estoque de HAV.....	20
3.1.5	Titulação do HAV por imunofluorescência indireta	21
3.2	<i>Bactérias</i> 22	
3.2.1	Coliformes totais e coliformes a 45°C.....	22
3.2.2	<i>Salmonella</i> spp	22
3.2.3	Manutenção das cepas bacterianas	22
3.3	<i>Ostras</i> 23	
3.3.1	Coleta das amostras.....	23
3.3.2	Dissecação do trato gastrointestinal das ostras para detecção viral.....	24
3.3.3	Preparação das amostras de água e ostras para detecção bacteriana	24
3.4	<i>Extração do RNA de culturas infectadas pelo HAV.....</i>	24
3.5	<i>Quantificação do RNA total.....</i>	25
3.6	<i>Reação de RT-PCR para detecção de HAV.....</i>	25
3.6.1	Transcrição reversa	26

3.6.2	Reação de PCR para HAV	26
3.6.3	Visualização dos produtos de PCR	27
3.7	<i>Hibridização molecular para detecção do HAV.</i>	28
3.7.1	Produção da sonda de 192pb.....	28
3.7.2	Produção da sonda de 22pb.....	33
3.7.3	Aplicação das amostras em membrana de nylon.....	34
3.7.4	Hibridização molecular	35
3.8	<i>Determinação do limite de sensibilidade da detecção do HAV, através da reação de RT-PCR e da hibridização molecular.</i>	37
3.9	<i>Avaliação dos protocolos de processamento, extração e purificação de material genético a partir do tecido digestivo dissecado de ostras contaminadas artificialmente com HAV.</i>	37
3.9.1	Recuperação das partículas virais.....	38
3.9.2	Extração e purificação do material genético	40
3.10	<i>Determinação do limite de sensibilidade do protocolo escolhido para detecção do HAV em ostras.</i> 42	
3.10.1	Infecção das ostras por inoculação direta.....	42
3.10.2	Infecção das ostras por bioacumulação.....	42
3.11	<i>Avaliação da contaminação por HAV das amostras de campo, coletadas entre dezembro de 2002 e julho de 2004.</i> 43	
3.12	<i>Determinação dos níveis de coliformes em águas de cultivo.</i>	44
3.12.1	Técnica dos tubos múltiplos.....	44
3.12.2	Kit Petrifilm®	45
3.13	<i>Determinação da presença de Salmonella spp.</i>	45
3.13.1	Crescimento em meios seletivos e testes bioquímicos.....	46
3.13.2	Determinação da presença de <i>Salmonella</i> spp. em ostras por kit comercial	47
3.14	<i>Análise dos resultados.</i>	47
4	Resultados	48
4.1	<i>Titulação do HAV por imunofluorescência indireta.</i>	48
4.2	<i>Extração de material genético a partir de fluido viral do HAV e quantificação do RNA total.</i>	48
4.3	<i>Reação de RT-PCR para detecção do HAV.</i>	49
4.4	<i>Hibridização molecular para detecção do HAV.</i>	49
4.4.1	Produção da sonda de 192pb.....	49
4.4.2	Produção da sonda de 22pb.....	52

4.5	<i>Determinação do limite de sensibilidade da detecção do HAV, através da reação de RT-PCR e da hibridização molecular.</i>	53
4.6	<i>Avaliação dos protocolos de processamento, extração e purificação de material genético a partir de tecido digestivo dissecado de ostras contaminadas artificialmente com HAV.</i>	54
4.7	<i>Determinação do limite de sensibilidade do protocolo escolhido (P3E2) para detecção de HAV em ostras, através da reação de RT-PCR e da hibridização molecular.</i>	55
4.8	<i>Determinação do limite de sensibilidade do protocolo escolhido (P3E2) para determinação do HAV em ostras, através da reação de RT-PCR e da hibridização molecular.</i>	56
4.9	<i>Avaliação da contaminação microbiológica das amostras de campo, coletadas entre dezembro de 2002 a julho de 2004.</i>	57
4.9.1	Detecção do HAV	57
4.9.2	Determinação dos níveis de coliformes	58
4.9.3	Determinação da presença de <i>Salmonella</i> spp	60
5	Discussão	61
5.1	<i>Titulação do HAV por imunofluorescência indireta.</i>	61
5.2	<i>Extração de material genético a partir de fluido viral de HAV e quantificação do RNA total.</i>	62
5.3	<i>Reação de RT-PCR para detecção do HAV.</i>	62
5.4	<i>Hibridização molecular para a detecção do HAV.</i>	63
5.5	<i>Avaliação dos protocolos de processamento, extração e purificação de material genético a partir de tecido digestivo dissecado de ostras contaminadas artificialmente com HAV.</i>	67
5.6	<i>Análise comparativa entre os limites de detecção do HAV, obtidos com fluido viral e com o trato gastrointestinal de ostras.</i>	72
5.7	<i>Avaliação da contaminação microbiológica das amostras de campo, coletadas entre dezembro de 2002 a julho de 2004.</i>	76
5.7.1	Detecção do HAV	76
5.7.2	Determinação dos níveis de coliformes	79
5.7.3	Determinação da presença de <i>Salmonella</i> spp	82
5.8	<i>Influência da contaminação bacteriana e de fatores ambientais na presença do HAV no trato gastrointestinal de ostras de cultivo.</i>	83
6	Conclusões	88
7	Perspectivas	89

1 Introdução

1.1 *Moluscos bivalves.*

1.1.1 Cultivo de moluscos em Santa Catarina

A maricultura, que envolve o cultivo de moluscos, algas, crustáceos e peixes, é uma atividade que vem adquirindo grande importância de caráter nutricional como fonte de proteína animal. No Brasil, o cultivo de moluscos marinhos (malacocultura) possui maior representatividade através da produção de ostras e mexilhões. Os principais estados produtores são Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Santa Catarina, sendo que este último ocupa a liderança nacional (SOUZA, 2003).

A malacocultura é uma atividade ainda recente no Estado de Santa Catarina. Surgiu em 1988, graças a um convênio entre a Universidade Federal de Santa Catarina e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (Epagri), que transferiram a tecnologia do cultivo de moluscos bivalves para as comunidades pesqueiras. Os resultados desses experimentos foram altamente positivos, fazendo com que muitas pessoas adotassem a atividade como uma importante fonte de renda (EPAGRI, 2000).

O litoral catarinense caracteriza-se por apresentar condições favoráveis ao cultivo de moluscos marinhos (WINKLER; GRUMANN; NETO et al., 1998). Atualmente, a espécie de ostra *Crassostrea gigas* ou ostra-do-pacífico é cultivada no Estado, onde se desenvolve perfeitamente devido às características climáticas da região, como a baixa temperatura da água e a grande quantidade de baías (NASCIMENTO, 1983).

Os principais municípios produtores de ostras em Santa Catarina são: Florianópolis, Penha, Governador Celso Ramos, Bombinhas, Palhoça e Porto Belo, sendo que a maioria da produção está localizada em Florianópolis (LCMM, 2001).

Num período de sete anos (1991-1998), a produção de ostras no Estado aumentou gradativamente. Desde o início da implantação do cultivo de moluscos bivalves no litoral catarinense, tal produção alcançou a marca de dois

milhões de dúzias no ano de 2003, e a produção de mexilhões foi de cerca de 11,4 mil toneladas (EPAGRI/CEDAP, 2004). De acordo com esta evolução da produção, há expectativas de que, em 2005, a produção de ostras possa chegar a 5 milhões de dúzias. Com isso, Florianópolis é hoje o maior produtor de ostras do Brasil (EPAGRI/CEDAP, 2004).

Entre os anos de 1989 e 1992, houve um crescimento sem controle desta atividade e, por isso, em 1992, com base nas exigências legais dos órgãos que exercem o controle e a fiscalização das atividades da maricultura, a EPAGRI, em convênio com o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis) e participação da FATMA (Fundação do Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina) e Capitania dos Portos, iniciou um programa de demarcação e mapeamento das áreas de maricultura a fim de que o Ministério da Marinha fizesse a legalização destas áreas. Hoje, 102 áreas em doze municípios estão legalizadas, tendo capacidade para produzir cerca de 20 mil toneladas anuais de mariscos (mexilhões) e ostras. No entanto, esse potencial poderia ser ainda maior, já que existem mais 100 áreas ainda não exploradas. A maricultura conta hoje com aproximadamente 1.000 produtores (mais de 150 produtores de ostras) e 5.000 trabalhadores (EPAGRI/CEDAP, 2004).

1.1.2 Hábito alimentar e capacidade de bioacumulação

As ostras são organismos bivalves que se alimentam de partículas em suspensão na água. O alimento provém de um fluxo de água, que passa através da cavidade do manto, pelas brânquias ciliadas. Essas são alargadas e pregueadas e funcionam como um filtro, concentrando partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos que servem como alimento para o animal (PEARSE; PEARSE; BUCHSBAUM et al., 1987; WARD, 1996).

Como consequência do hábito alimentar filtrante, os moluscos bivalves podem adsorver e bioacumular em seus tecidos diversos patógenos humanos, eventualmente presentes nas águas de cultivo, tais como vírus entéricos, bactérias, protozoários e helmintos (LEE; YOUNGER, 2002) e, também, contaminantes químicos, tais como mercúrio, ferro, chumbo, cobre, cádmio, cromo, manganês, organoclorados e hidrocarbonetos de petróleo dependendo

da qualidade da água onde os mesmos se encontram (ST-JEAN; COURTENAY; PELLETIER et al., 1999). A concentração destes contaminantes nos tecidos dos moluscos é muito maior do que nas águas de cultivo (LEE; YOUNGER, 2002; BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004).

Devido à esta característica de bioacumulação, os moluscos bivalves recebem o nome de “bioindicadores” ou “monitores” de contaminação ambiental, sendo a eles atribuída a capacidade de identificar diversos sintomas de um ambiente costeiro ou estuarino em estresse (CROCI; SUFFREDINI, 2003).

O consumo de moluscos contaminados com patógenos provenientes de fezes humanas representa um risco à saúde pública. Estudos sobre bioacumulação de partículas virais em bivalves demonstraram que, após 6 h de imersão em água contendo 8×10^5 a $2,5 \times 10^7$ partículas de adenovírus entérico e rotavírus humano por litro, respectivamente, 25 a 35% dos vírus eram adsorvidos pelos tecidos destes bivalves (BOSCH; PINTO; ABAD, 1995; MUNIAIN-MUJICA; GIRONES; TOFINO-QUESADA et al., 2002). A maioria dos moluscos bivalves é capaz de bioacumular de 3 a 100 vezes mais partículas virais em relação à concentração destas partículas nas águas circundantes (MUNIAIN-MUJICA; GIRONES; TOFINO-QUESADA et al., 2002; BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004).

1.1.3 Contaminação ambiental dos moluscos bivalves por microrganismos patogênicos

Tendo em vista a possibilidade de contaminação viral e bacteriana das águas e por ser a maricultura uma atividade em crescimento e de grande importância econômica e social, o controle da qualidade sanitária dos produtos da maricultura se faz urgente e necessário.

A água é reconhecida como um veículo potencial para a transmissão de inúmeras doenças, mas, ainda hoje, a etiologia de muitas epidemias provocadas por patógenos transmitidos pela água permanece desconhecida (SCHWAB; NEILL; LE GUYADER et al., 2001; LE MARCHAND; MASSON; BROUSSEAU, 2004). Atualmente, a detecção de bactérias na água depende,

principalmente, da utilização de meios de cultivo seletivos e diferenciais, que permitam o isolamento e a identificação destes microorganismos. Além de demandar um tempo relativamente longo para este processo de identificação, sabe-se que apenas uma porcentagem muito pequena (~10%) das bactérias do meio ambiente podem ser cultivadas (DELONG, 2004).

Os vírus também surgem como um sério fator de risco de contaminação das águas, principalmente, aqueles eliminados nas fezes e que podem contaminar a água utilizada para consumo, recreação, higiene, agricultura, etc (LE MARCHAND; MASSON; BROUSSEAU, 2004). Os vírus humanos capazes de persistir no meio ambiente são essencialmente os entéricos, que são extremamente resistentes a condições desfavoráveis e incluem adenovírus, norovírus, enterovírus e hepatovírus. Depois da replicação no trato gastrointestinal, ou no fígado, no caso do vírus da hepatite A (HAV), estes vírus são excretados nas fezes e podem ser dispersos para o meio ambiente se as fezes não forem adequadamente tratadas (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001; GRIFFIN; DONALDSON; PAUL et al., 2003). A quantidade de enterovírus presentes na água é altamente variável, dependendo de alguns fatores, tais como nível de higiene, densidade populacional, prevalência de infecções na comunidade local e estação do ano (VILLAR; DE PAULA; GASPARG, 2002; GRIFFIN; DONALDSON; PAUL et al., 2003).

Além disso, estes vírus são muito mais resistentes que as bactérias ao processo comum de tratamento de esgotos, incluindo a cloração. Alguns estudos têm demonstrado que eles podem sobreviver de 2 a 130 dias na água do mar. Este período é muito maior do que o encontrado para coliformes fecais em ambientes similares (GABUTTI; DE DONNO; BAGORDO et al., 2000). A temperatura é o principal fator, influenciando na sobrevivência de vírus entéricos no mar, sendo que os poliovírus e HAV podem resistir por 671 dias a 4°C, e 25 dias a 25°C (MELNICK, 1996). A luz ultravioleta também pode inativar rapidamente alguns vírus (GANTZER; SENOUCI; MAUL et al., 1997).

Como os vírus não se replicam nos tecidos dos moluscos, os mesmos podem ser considerados um potencial vetor, devido à estabilidade dos mesmos nos seus tecidos. Quando ingeridos pelo homem, os moluscos bivalves

contaminados com vírus podem tornar-se potenciais agentes na transmissão desses vírus, alguns deles causadores de sérias doenças infecciosas em humanos.

1.1.4 Controle sanitário da produção de moluscos

1.1.4.1 Legislação brasileira

A legislação brasileira vigente para controle microbiológico de moluscos (ANVISA, 2001) e águas de cultivo (CONAMA, 1986), compreende a Resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, para pescados e produtos de pesca (item 7a) e a Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 20, de 18 de junho de 1986:

- Resolução CONAMA N°20 de 18/06/86: regulamenta a concessão das áreas de cultivo. Os aspectos microbiológicos e químicos estão descritos, e estabelecem que os limites para as águas de cultivo não deverão exceder uma concentração média de NMP (Número Mais Provável) de 14 coliformes fecais/100mL, com não mais de 10% das amostras excedendo 43 coliformes fecais/100mL, para áreas destinadas à criação natural de espécies para consumo humano, que serão ingeridas cruas.
- Resolução ANVISA, RDC nº12, 02/01/2001: determina para pescados e produtos de pesca (item 7a) a determinação dos níveis de estafilococos coagulase + e a presença de *Salmonella* spp. na carne das ostras.

Portanto, estas resoluções estabelecem os microrganismos indicadores de sanidade para ostras e águas de cultivo.

A legislação que rege os níveis aceitáveis de contaminação em águas destinadas à criação de moluscos bivalves varia de acordo com o país. De acordo com a legislação brasileira, a partir de 1995, o IBAMA delegou aos aqüicultores o controle sanitário dos moluscos cultivados, bem como da qualidade sanitária das águas na área de influência do empreendimento, transferindo-lhes o ônus desta tarefa. O Brasil contraria, assim, o procedimento referendado internacionalmente de que a identificação, classificação e

monitoramento das áreas de obtenção de bivalves é de responsabilidade das autoridades competentes (CODEX, 2004).

Em face da ausência de legislação nacional sobre o assunto, o Brasil baseia-se nas Normas Higiênico-Sanitárias Provisórias para Moluscos Bivalves, propostas pelo Codex Alimentarius (CODEX, 2004). Contudo, isto não tem força de lei e, também, não propõe um critério específico para classificação das áreas, mas apresenta uma sinopse dos critérios de classificação de vários países signatários.

Para serem comercializadas para outros Estados, as ostras produzidas deveriam ter o certificado de inspeção sanitária (Serviço de Inspeção Federal = SIF), emitido pelo Serviço de Inspeção de Produto Animal (SERPA) do Ministério da Agricultura. A maioria dos maricultores não possui este registro, exigido para comercialização de qualquer produto de origem animal, e que funciona como um certificado de qualidade, além de informar a procedência dos produtos vendidos. Para conseguí-lo, o produtor precisa seguir uma série de determinações do Ministério da Agricultura, que vão desde medidas e gabaritos para construção das instalações até o tipo de roupa utilizada. O SIF é uma garantia para o consumidor e sem ele é legalmente impossível comercializar ostras e mexilhões para outras regiões. Sem um local para beneficiamento dos moluscos não é possível obter o carimbo do SIF.

1.1.4.2 Legislação internacional

O risco de contrair doenças infecciosas associadas com o consumo de moluscos bivalves é reconhecido há muitos anos. Conseqüentemente, muitos países decretaram medidas de controle sanitário para a produção de moluscos bivalves. Na Comunidade Européia (C.E.), estas foram descritas junto à Diretriz Européia 91/492/EEC (European Communities 91/492/EEC, 1991) para capacitar a operação do mercado comum europeu, a partir de 1993. Nos Estados Unidos, estas medidas foram regulamentadas por acordos comerciais interestaduais, definidos no Manual de Operações do Programa Nacional Sanitário de Moluscos do FDA (Food and Drug Administration) (National Shellfish Sanitation Program, FDA, 1995). Um outro país que tenha interesse

em exportar para a C.E. ou para os Estados Unidos deve produzir seus produtos com os mesmos padrões estabelecidos nesses países. A maioria das nações que exportam produtos de origem marinha tem desenvolvido programas próprios, de acordo com regulamentações de mercados modelo. O que há em comum nesses programas é o uso tradicional de indicadores bacterianos de contaminação fecal, tais como coliformes fecais ou *Escherichia coli*, para atestar a contaminação e, portanto, implementar as medidas apropriadas de controle. Aceita-se, internacionalmente, que moluscos coletados com um padrão microbiológico com menos de 230 *E. coli*, ou 300 coliformes fecais/ 100g de carne podem ser disponibilizados no mercado para consumo humano. Este padrão, juntamente com padrões para patógenos específicos (tais como *Salmonella*), substâncias químicas e biotoxinas de algas, foi adotado como um padrão de “produto-final” na Diretriz Européia 91/492/EEC. Já nos Estados Unidos, a legislação baseia-se no controle microbiológico das águas de cultivo, e os níveis permitidos de coliformes fecais são os mesmos adotados no Brasil (Tabela 1).

Tabela 1 - Padrões internacionais de qualidade microbiológica para a produção e comercialização de moluscos, adotados na C.E. e nos EUA.

Norma	Baseada na	Classificação	Coliformes fecais NMP/100g ou 100mL	E. coli NMP/100g
Diretriz Européia ¹	Carne dos moluscos	A (venda livre sem restrições)	<300	<230
		B (venda após depuração ou tratamento térmico)	<6.000	<4.600
		C (venda após longo tempo de depuração)	<60.000	NA
		D (venda proibida)	>60.000	NA
NSSP (EUA) ²	Águas de cultivo	Aprovada	<14	NA
		Condicionamente aprovada ³	Exige plano diretor	NA
		Restrita	<88	NA
		Proibida	>88	NA

1 - Diretriz Européia 91/492/EEC;

2 - National Shellfish Sanitation Program, FDA, 1995;

3 - Um plano diretor é necessário para apontar quando as áreas condicionalmente restritas serão abertas ou fechadas; NA=não aplicável; NMP=Número Mais Provável.

1.2 Vírus entéricos.

Os vírus entéricos se encontram distribuídos em todas as partes do mundo e são responsáveis por diversas doenças que afetam o ser humano, tais como gastroenterites, meningites, miocardites e hepatites infecciosas.

As gastroenterites constituem um problema de âmbito mundial, sendo responsável pela morte de aproximadamente 5 a 10 milhões de pessoas ao ano (TORTORA; FUNK; CASE et al., 2000). A patogênese é caracterizada por diarreia associada ou não à febre e vômitos. Pode levar à morte por intensa desidratação e assume importante papel na mortalidade infantil (QIAO; NILSSON; ABREU et al., 1999; MEDEIROS; NEME; DA SILVA et al., 2001). As gastroenterites podem ser provocadas por diversos patógenos, tais como as bactérias *E. coli* enterotoxigênica, *Shigella* sp., *Salmonella* spp., os protozoários *Cryptosporidium* spp e *Giardia* spp (SOUZA; BARREIROS; PAPP et al., 2003; GREINERT; FURTADO; SMITH et al., 2004) e os vírus entéricos (KOOPMANS; VON BONSDORFF; VINJE et al., 2002).

Vários estudos foram realizados no mundo para determinar os agentes causadores das gastroenterites provocadas pelo consumo de moluscos bivalves, e hoje se reconhece que os norovírus (NV) são os principais agentes, sendo que os casos de gastroenterites por astrovírus também estão aumentando. Além disso, considera-se a hepatite A a doença mais séria causada pelo consumo de moluscos contaminados (LEES, 2000; GERBA; KAYED, 2003).

Assim, os vírus entéricos mais importantes transmitidos para o homem pela alimentação são, principalmente, os responsáveis pelas hepatites A e E, os calicivírus do tipo norovírus (Small Round Structure Viruses) e vírus Snow Mountain, calicivírus típicos (Non-Small Round Structure Viruses), enterovírus, poliovírus (EV), os rotavírus e os astrovírus (HURST; KNUDSEN; MCINERNEY et al., 1997; LE GUYADER; HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000; LEES, 2000; SCIPIONI; DAUBE; THIRY, 2000). Estes vírus, não-envelopados, possuem uma grande estabilidade no meio externo e uma certa resistência a

agentes físico-químicos de desnaturação (NICAND; TEYSSOU; BUISSON, 1998). Por estes motivos, o grupo dos vírus entéricos é o mais significativo, confiável e eficiente modelo a ser usado para o monitoramento ambiental.

1.2.1 Virus da Hepatite A (HAV)

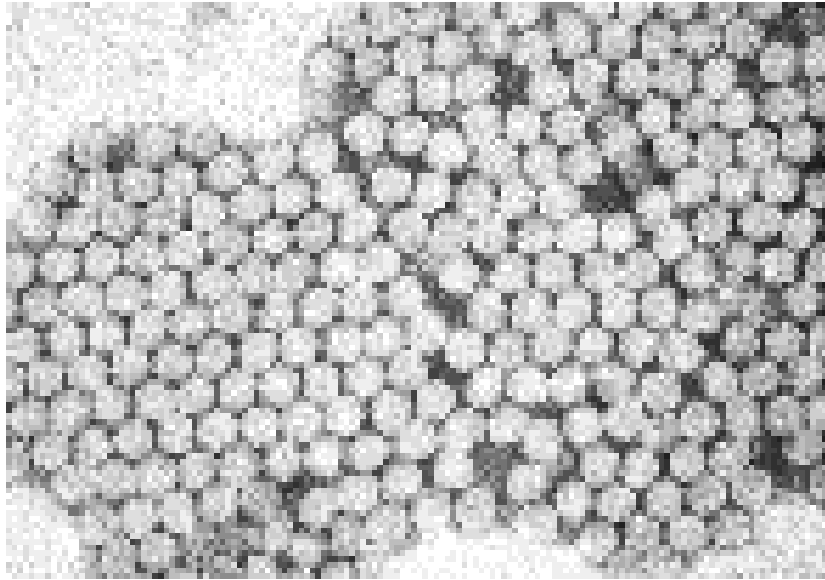
O HAV é um membro da família Picornaviridae (CROMEANS; NAINAN; MARGOLIS, 1997). No entanto, ele foi primeiramente descrito com um membro do gênero *Enterovirus* (sorotipo 72) por compartilhar com os outros vírus deste gênero algumas propriedades físico-químicas e características morfológicas e genômicas gerais, assim como transmissão pela via fecal-oral.

Atualmente, é classificado em um gênero separado, o dos *Hepatovirus* (MINOR, 1991), devido a várias características: ele é atípico quanto à seqüência do seu ácido nucléico, ou seja possui baixa porcentagem de homologia com o genoma dos enterovírus; possui termoestabilidade a 60°C; seu sítio de replicação é o fígado; sua multiplicação em cultura celular é lenta e o isolamento primário em culturas celulares é difícil, lento e fastidioso, pois os vírus selvagens não apresentam efeito citopático e tendem a estabelecer uma infecção persistente (BEARD; ABELL; HONDA et al., 1999; SCIPIONI; DAUBE; THIRY, 2000).

O vírus possui um genoma bastante conservado, sendo que as diferentes cepas de HAV do mundo inteiro correspondem a um único sorotipo e são classificadas em diferentes genotipos, de acordo com análises de seqüências (ROBERTSON; JANSEN; KHANNA et al., 1992; APAIRE-MARCAIS; ROBERTSON; AUBINEAU-FERRE et al., 1995; COSTA-MATTIOLI; DI NAPOLI; FERRE et al., 2003). Atualmente, esta classificação compreende quatro genotipos humanos (I, II, III e VII) e três símios (IV, V e VI), além de evidências de recombinação em populações naturais do vírus (COSTA-MATTIOLI; FERRE; CASANE et al., 2003).

O HAV é um vírus não-envelopado com cerca de 27nm de diâmetro e é levemente esférico ao microscópio eletrônico (Figura 1). Seu capsídeo é de simetria icosaédrica com sessenta cópias dos três maiores polipeptídeos: 1B (VP2), 1C (VP3) e 1D (VP1). Existe, ainda, uma pequena proteína de capsídeo,

1A (VP4), que está presente nos vírus pertencentes à família Picornaviridae . Seu genoma é de RNA simples-fita, não-segmentado, com peso molecular de



7.500 pb (CUTHBERT, 2001). As extremidades 5' e 3' do genoma constituem-se de regiões não-codificadoras de 735 e 64 bases, respectivamente, que delimitam uma única região codificadora (ORF). A região não codificadora situada na extremidade 5' é conservada no HAV (mais de 92% de nucleotídeos idênticos). A região codificadora responde por onze proteínas, cuja expressão é feita através de uma única poliproteína (BEARD; ABELL; HONDA et al., 1999).

Figura 1 - Microscopia eletrônica do HAV (Fonte: CDC, 1999).

O HAV é amplamente distribuído pelo mundo e extremamente resistente à degradação. O vírus pode sobreviver por aproximadamente um mês à temperatura ambiente e é somente parcialmente degradado, após um tratamento de 12 h a 60°C. Ele também sobrevive bem em fezes secas e superfícies de poliestireno, quando mantido entre 5 e 27°C. Dependendo das condições, o HAV pode ser estável no meio ambiente por meses. Para inativá-lo é necessário o cozimento dos alimentos a mais que 90°C por 1 min, ou a desinfecção das superfícies com uma solução 1:100 de hipoclorito de sódio em água (MBITHI; SPRINGTHORPE; SATTAR, 1991).

O HAV é adquirido primariamente pela via feco-oral, por ingestão de água e alimentos contaminados (CUTHBERT, 2001). Após a ingestão, o vírus chega à corrente sanguínea e espalha-se para infectar as células parenquimais

do fígado. O vírus replica-se nos hepatócitos e células de Kupfer, é excretado na bile e eliminado nas fezes. Mais de 10^8 partículas virais/mL de fezes podem ser excretadas durante a infecção, e estes vírus serão, posteriormente, liberados nas águas de esgotos contaminando, subseqüentemente, o meio ambiente (GRIFFIN; DONALDSON; PAUL et al., 2003).

O HAV é o principal causador de hepatites agudas no mundo inteiro, podendo conduzir à doença severa e até mesmo à morte, ou ocasionar epidemias. A doença clínica ocorre e mesmo uma taxa de mortalidade de 1 a 2% é estimada entre adultos e adolescentes não imunes, nos países industrializados (CUTHBERT, 2001; KHUROO, 2003).

Nos Estados Unidos, em torno de 84.000 casos de hepatite A são notificados anualmente, o que representa um custo de 200 milhões de dólares (KOOPMANS; VON BONSDORFF; VINJE et al., 2002). Entre 11% e 22% das pessoas com hepatite A são hospitalizadas. Adultos que apresentam a doença sintomática ficam incapacitados para o trabalho por um período médio de 4 a 10 semanas (KHUROO, 2003).

Uma característica comum da hepatite A, em muitos países desenvolvidos, é o declínio da incidência de infecção como mostrado por pesquisas epidemiológicas (PERRETT; GRANEROD; CROWCROFT et al., 2003; TAHAN; OZDOGAN; TOZUN, 2003; IINO, 2004; WONG; LIU; NG et al., 2004). As taxas de soropositividade na população mais velha podem ser muito mais altas do que naquela de adultos jovens. Geralmente, em áreas endêmicas, a hepatite A é adquirida na infância, quando a doença pode ser branda ou subclínica, através do contato social. Em muitos países desenvolvidos, o declínio da exposição endêmica de crianças deixa a população exposta à uma potencial transmissão epidêmica viral a partir de fontes, tais como alimentos ou água, ou à infecção através de viagens para áreas endêmicas (KHUROO, 2003; KOOPMANS; DUIZER, 2004). Tendo em vista que a população adulta torna-se cada vez mais susceptível à infecção e por estar demonstrado que os moluscos bivalves são, em muitos casos, potenciais responsáveis pela transmissão do HAV em epidemias, torna-se importante sua contínua vigilância.

1.2.2 Transmissão do vírus da hepatite A relacionada ao consumo de moluscos

Em um estudo retrospectivo de 15 anos, nos Estados Unidos, dos surtos relacionados ao consumo de alimentos contaminados, os frutos do mar foram responsáveis por 10% de todos os casos e 9% das mortes (DURBOROW, 1999). O agente causal pôde ser determinado em 44% dos casos; destes, 47% foram causados por vírus, 9% por bactérias e 44% por agentes químicos. Estes dados também refletem o perfil encontrado na Europa (LEE; YOUNGER, 2002).

Muitos vírus transmitidos pela via feco-oral têm sido associados ao consumo de moluscos bivalves, tanto pelo isolamento dos vírus dos tecidos dos moluscos, quanto pela análise do histórico epidemiológico e dos sintomas clínicos dos pacientes (LEE; YOUNGER, 2002). Entre eles destacam-se principalmente os norovírus e o vírus da hepatite A (FIORE, 2004; KOOPMANS; DUIZER, 2004).

O primeiro caso de hepatite A ligado ao consumo de moluscos foi relatado, em 1956, na Suécia, quando 629 casos foram relacionados ao consumo de ostras cruas (ROOS, 1956). Na Austrália, foi descrito um surto, em 1997, no qual 467 pacientes foram infectados e, novamente, as ostras foram apontadas como a causa da infecção (CONATY; BIRD; BELL et al., 2000). Porém, a maior epidemia aconteceu em Shanghai, China, em 1988, na qual mais de 288.000 pessoas foram infectadas após ingerirem mariscos crus ou mal cozidos (TANG; WANG; XU et al., 1991). O fator de risco mais importante nos casos primários foi o consumo de moluscos crus, enquanto que o contato pessoa-pessoa, principalmente, entre crianças, tenha desempenhado o papel mais importante nas infecções secundárias (BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004).

Surtos de doenças virais associados ao consumo de ostras e outros moluscos bivalves continuam a ser relatados em muitos países, mesmo quando há cumprimento de todas as normas estabelecidas pela legislação quanto às áreas de cultivo, processos de tratamento e produtos vendidos para o consumidor (GRACZYK; SCHWAB, 2000; POTASMAN; PAZ; ODEH, 2002).

Por isso, se reconhece que as regras em uso são, aparentemente, incapazes de garantir proteção ao consumidor de moluscos ou de prevenir tais surtos. Estes fatos têm levado também à reavaliação dos métodos para o controle higiênico-sanitário dos moluscos a serem comercializados.

1.3 Métodos disponíveis para a detecção de contaminantes virais em águas e moluscos.

Por muitos anos, a microscopia eletrônica foi a única técnica disponível para estudo dos vírus não cultiváveis e, hoje ainda, permanece como opção técnica para análise de amostras clínicas. Contudo, a microscopia eletrônica é relativamente insensível requerendo na ordem de um milhão de partículas para visualização dos vírus (IRITANI; SETO; HARUKI et al., 2000). Este número pode ser obtido em amostras clínicas, tais como fezes, mas raramente estará presente em alimentos contaminados. Além disso, este método não é prático nem de custo acessível para ser aplicado em análises de rotina (LEES, 2000).

As metodologias desenvolvidas para a detecção viral em amostras ambientais refletem a evolução do conhecimento nesta área, que começou com o isolamento dos vírus por indução da doença em animais de laboratório, com a indução do efeito citopático viral em culturas celulares, passando por metodologias imunológicas e moleculares para a detecção do material genético viral (ATMAR; ESTES, 2001; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001).

Os métodos baseados no isolamento viral em animais ou em cultura celular são onerosos e requerem muito tempo para se chegar a um resultado. Podem ainda ocorrer resultados falso-positivos, devido à presença de substâncias citotóxicas, tais como ácidos húmicos, metais pesados e íons ferro, presentes nas amostras ambientais, que mimetizam um efeito citopático; tais substâncias, por promoverem a lise celular, podem interferir na especificidade dos resultados (REYNOLDS; GERBA; ABBASZADEGAN et al., 2001). Além disso, a existência de uma grande diversidade de vírus em amostras ambientais também é um fator que pode dificultar a detecção de determinados grupos de vírus por cultura celular, uma vez que os menos fastidiosos produzem alterações morfológicas celulares mais rapidamente do que os mais

fastidiosos (REYNOLDS; GERBA; PEPPER, 1996; REYNOLDS; GERBA; ABBASZADEGAN et al., 2001).

Quando presentes no meio ambiente, os vírus encontram-se em pequenas quantidades ou muito dispersos. Moluscos contaminados por vírus entéricos podem conter de 0,2 a 224 partículas em seus tecidos (SHIEH; CALCI; BARIC, 1999; LEGEAY; CAUDRELIER; CORDEVANT et al., 2000; SCIPIONI; DAUBE; THIRY, 2000). Durante os últimos 20 anos, vêm sendo desenvolvidos vários métodos de concentração e de extração de vírus presentes em águas, alimentos de maneira geral, e tecidos de moluscos contaminados (LEGGITT; JAYKUS, 2000; CARDUCCI; LUCCHESI; CASINI et al., 2004; LAVERICK; WYN-JONES; CARTER, 2004). Estes estudos têm o objetivo de aumentar a eficácia da recuperação viral, minimizar o efeito citotóxico, quando a cultura celular *in vitro* é requerida para o isolamento e a caracterização viral, ou ainda eliminar inibidores de reações enzimáticas, quando técnicas moleculares são utilizadas (BARARDI; YIP; EMSILE et al., 1999; SHIEH; CALCI; BARIC, 1999; LEGEAY; CAUDRELIER; CORDEVANT et al., 2000; SANTOS; RIGOTTO; SIMOES et al., 2001, 2002; RIGOTTO; SINCERO; SIMOES et al., 2005).

Todas estas técnicas envolvem uma combinação de etapas consecutivas a fim de separar e depois eluir os vírus dos tecidos dos moluscos, concentrando-os em pequenos volumes, passíveis de serem processados para identificação viral. Independente da metodologia a ser utilizada, nenhuma delas é igualmente efetiva para produtos marinhos de diferentes lugares geográficos, sugerindo-se que os ensaios devem ser previamente padronizados em condições laboratoriais, antes de serem aplicados para amostras de campo (LEES, 2000; SCIPIONI; DAUBE; THIRY, 2000).

Métodos moleculares, tais como a hibridização molecular e a reação em cadeia da polimerase (PCR), foram adaptados visando a detecção de vírus entéricos, em amostras clínicas e ambientais (SCHWAB; NEILL; LE GUYADER et al., 2001). Estas técnicas apresentam vantagens em relação às tradicionais por sua alta sensibilidade, simplicidade e rapidez (SHIEH; CALCI; BARIC,

1999; LE GUYADER; HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000; LEES, 2000; LEGEAY; CAUDRELIER; CORDEVANT et al., 2000).

A amplificação gênica pela reação de PCR permite a detecção de pequenas quantidades de seqüências de DNA ou RNA, usualmente encontradas em amostras ambientais. Ela tornou-se imprescindível para a detecção de vírus contaminantes destas amostras e rotineiramente difíceis de identificar como o vírus da hepatite A, os norovírus e os rotavírus (GREEN; LEWIS, 1999; SHIEH; CALCI; BARIC, 1999; LEES, 2000; LEGEAY; CAUDRELIER; CORDEVANT et al., 2000). Sua desvantagem é que não se pode distinguir se a amplificação das seqüências gênicas virais provém de partículas infecciosas ou não, o que provoca dúvidas quanto ao valor do resultado positivo para o monitoramento ambiental, quando utilizada como parâmetro único (ARNAL; CRANCE; GANTZER et al., 1998; REYNOLDS; GERBA; ABBASZADEGAN et al., 2001).

Para aplicação em algumas amostras ambientais (por ex. águas e ostras), outra limitação é a presença freqüente de inibidores nas amostras. A carne dos moluscos é uma matriz muito complexa quimicamente, contendo muitos compostos que podem interferir na eficiência desta técnica, como os carboidratos (particularmente glicogênio) (ARNAL; FERRE-AUBINEAU; BESSE et al., 1999; SHIEH; CALCI; BARIC, 1999). Solutos orgânicos e inorgânicos podem, também, inibir as enzimas polimerases (transcriptase reversa e Taq-polimerase), e nucleases e proteases podem, ainda, degradar o genoma do vírus antes que ele seja amplificado. Além disto, várias proteínas, carboidratos e outros compostos orgânicos seqüestram os íons magnésio e se ligam aos nucleotídeos requeridos pelas enzimas (ABBASZADEGAN; HUBER; GERBA et al., 1993; SCHWAB; DE LEON; SOBSEY, 1996; SHIEH; CALCI; BARIC, 1999). No entanto, algumas medidas têm sido propostas para minimizar este problema, como a análise do tecido digestivo dissecado do molusco. Após a demonstração de que o tecido digestivo é o principal local de concentração de partículas virais em ostras contaminadas, a análise deste tecido isolado faz com que a maioria das substâncias inibidoras, presentes no manto e nas brânquias, não interfiram nas reações (ATMAR; NEILL; ROMALDE et al., 1995;

LE GUYADER; HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000; LEGEAY; CAUDRELIER; CORDEVANT et al., 2000; SCHWAB; NEILL; LE GUYADER et al., 2001; BEURET; BAUMGARTNER; SCHLUEP, 2003).

Apesar destas desvantagens, a amplificação gênica pela reação de PCR é um método atraente para o monitoramento de vírus entéricos humanos eventualmente presentes em frutos do mar, já que uma vez padronizado, é mais rápido, simples e menos dispendioso que os métodos de cultura celular (LEES, 2000; SANTOS; RIGOTTO; SIMOES et al., 2001; COELHO; HEINERT; SIMOES et al., 2003; RIGOTTO; SINCERO; SIMOES et al., 2005).

A metodologias de amplificação de sinal, como a hibridização molecular e suas variantes, são hoje utilizadas não diretamente em amostras ambientais para detecção do material genético viral, mas como teste confirmatório da reação de RT-PCR (LE GUYADER; HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000; LEGGITT; JAYKUS, 2000; LE GUYADER; NEILL; DUBOIS et al., 2003), pois nestas amostras o material genético, geralmente, se encontra muito pouco concentrado, impossibilitando uma detecção eficiente (ZHOU; ESTES; JIANG et al., 1991).

Diversos pesquisadores vêm desenvolvendo tecnologias alternativas que possam melhorar a eficácia da análise de contaminantes virais nas amostras ambientais associando a PCR à cultura celular (Integrated cell culture to PCR, ICC-PCR). A grande vantagem desta metodologia é o aumento da sensibilidade da reação de PCR, já que, uma vez que as amostras ambientais passam pela cultura de células, a concentração das partículas virais infectantes é aumentada e a quantidade de inibidores diminuída. Em comparação com a cultura celular sozinha, a presença de partículas virais infectantes pode ser confirmada por ICC-PCR em três dias ao invés de uma semana (REYNOLDS; GERBA; ABBASZADEGAN et al., 2001; RIGOTTO; SINCERO; SIMOES et al., 2005). Este método pode ser usado, inclusive, na detecção de vírus que não são capazes de produzir efeito citopático devido às baixas concentrações na amostra (DE MEDICI; CROCI; DI PASQUALE et al., 2001). Além disso, a reação de PCR se limita à análise de pequenos volumes de amostra. Os volumes típicos utilizados são na ordem de microlitros, mesmo que a amostra

analisada, em princípio, seja grande (50g). O volume final da amostra, após concentração, geralmente está na ordem de mL. Estas desvantagens podem provocar, muitas vezes, resultados falso-negativos. Através da ICC/PCR, a probabilidade destes resultados acontecerem é minimizada (BLACKMER; REYNOLDS; GERBA et al., 2000).

A quantificação das partículas virais é difícil quando os ensaios moleculares de detecção são empregados. Todas as metodologias descritas anteriormente não permitem o cálculo da quantidade de partículas virais contidas inicialmente nas amostras. Com esse objetivo duas abordagens são possíveis: a reação de PCR semiquantitativa e a em tempo real. Na primeira, padrões de concentração conhecida ou um controle interno são analisados ao mesmo tempo com a amostra, e por comparação da intensidade da banda dos padrões obtida na eletroforese, estima-se a concentração da amostra desconhecida (SCHVOERER; VENTURA; DUBOS et al., 2001; LE GUYADER; NEILL; DUBOIS et al., 2003). Mais recentemente, adaptada às amostras ambientais, a reação de PCR em tempo real utiliza sondas fluorescentes, que são incorporadas às seqüências amplificadas e permitem uma análise quantitativa, relacionando as quantidades inicial e final do material genético (MONPOEHO; DEHEE; MIGNOTTE et al., 2000; LAVERICK; WYN-JONES; CARTER, 2004; LE CANN; RANARIJAONA; MONPOEHO et al., 2004). Entretanto, as mesmas dúvidas em relação à infectividade dos vírus detectados permanecem, e mais estudos são necessários a fim de determinar a significância destes resultados para a saúde pública e para um controle sanitário efetivo dos moluscos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral.

Padronizar técnicas moleculares para a detecção do RNA do vírus da hepatite A (HAV-RNA), a partir do trato gastrointestinal dissecado de ostras, e realizar um monitoramento mensal para avaliar a presença deste vírus em ostras de cultivo de três regiões de Florianópolis, buscando estabelecer uma provável relação entre fatores ambientais e a presença deste e de outros patógenos.

2.2 Objetivos específicos.

- Avaliar diferentes protocolos de processamento, extração e purificação de material genético viral a partir de tecido digestivo dissecado de ostras inoculadas artificialmente com HAV;
 - Determinar o limite de sensibilidade de detecção viral a partir do protocolo de processamento, extração e purificação de material genético selecionado para detecção do HAV-RNA por RT-PCR;
 - Padronizar a hibridização molecular como teste confirmatório da reação de RT-PCR para detecção do HAV-RNA em tecido digestivo dissecado de ostras;
 - Utilizar as técnicas padronizadas para avaliar a presença do HAV-RNA em amostras de campo;
 - Correlacionar a presença do HAV com a de outros patógenos.
-

3 Materiais e Métodos

MATERIAIS BIOLÓGICOS E METODOLOGIAS CORRESPONDENTES

3.1 Vírus e células

3.1.1 Vírus da Hepatite A (HAV)

O vírus da hepatite A cepa HM 175 (CROMEANS; SOBSEY; FIELDS, 1987) (gentilmente cedido pela Macquarie University, Sydney, Austrália) encontra-se disponível e estocado no Laboratório de Virologia Aplicada, onde esta dissertação foi realizada, estando adaptado ao cultivo *in vitro*.

3.1.2 Células FrhK-4

Foi utilizada a linhagem celular Frhk-4, células fetais de rins de macaco Rhesus (CROMEANS; SOBSEY; FIELDS, 1987) (gentilmente cedidas pela Macquarie University, Sydney, Austrália), que são permissivas à infecção *in vitro* pelo vírus da hepatite A. Quando cultivadas *in vitro*, formam monocamadas confluentes de células, que podem ser utilizadas para a propagação e titulação do HAV.

3.1.3 Manutenção das células

O cultivo das células foi realizado em garrafas descartáveis de 25 cm² ou 75 cm² (NUNC®) contendo Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's (MEM, Sigma) adicionado de bicarbonato de sódio 2,2g/L; glutamina 2mM (Sigma); aminoácidos não essenciais 1X (Gibco); tampão Hepes 15mM (Sigma); 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco-BRL); antibióticos/antifúngico: penicilina G; sulfato de estreptomicina e anfotericina B (Gibco-BRL) nas concentrações finais de 100U/mL, 100µg/mL e 0,25 µg/mL, respectivamente. Para o subcultivo, a monocamada celular foi lavada 2x com tampão salina fosfato (PBS) estéril (NaCl 150mM; KH₂PO₄ 1,5mM; Na₂HPO₄ 20mM; e KCl

27mM pH 7,2), recebendo em seguida um tratamento enzimático com solução a 0,05% de tripsina (1:250, Sigma; preparada em solução contendo NaCl 0,8%; KCl 0,04%; dextrose 0,1%; NaHCO₃ 0,058%; EDTA 0,02% e vermelho de fenol 0,045%). Após o desprendimento da monocamada celular, as células foram ressuspensas em 20 mL de meio MEM com 10% SFB. Em seguida, as suspensões foram transferidas para garrafas de 75 cm² e mantidas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂.

3.1.4 Preparo da suspensão-estoque de HAV

Foram realizadas sucessivas passagens do vírus HAV (CROMEANS; SOBSEY; FIELDS, 1987) em cultura celular para aumento do título infeccioso viral.

As células FrhK-4 foram previamente cultivadas, como descrito anteriormente, até atingirem uma monocamada confluenta. O meio de crescimento foi removido e as células lavadas 2x com PBS estéril pH 7,2. A monocamada foi então inoculada com 1mL de fluido celular infeccioso de HAV (estocado no laboratório) e mantidas por 90min, sob atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após este período, o excesso de inóculo foi removido e foram adicionados 20mL de MEM completo contendo 2% SFB (meio de infecção) para manutenção celular. As células foram mantidas sob as condições de temperatura e atmosfera de CO₂ anteriormente mencionadas.

O monitoramento da replicação viral foi realizado por observação das garrafas ao microscópio óptico invertido (Coleman XPD-1) a cada 24h, verificando-se o efeito citopático característico nas células infectadas, que culminou com a completa destruição do tapete celular. Quando foi observado 100% de destruição da monocamada, as células foram congeladas e descongeladas por 3x para rompimento das membranas, ocorrendo total liberação das partículas virais ainda no citoplasma celular.

A fim de se obter um estoque viral com alto título infeccioso, o procedimento de preparação dos fluidos infecciosos foi repetido várias vezes. Quando o efeito citopático característico tornou-se perceptível após 48h de infecção e o máximo de destruição celular foi visível em 5-6 dias pós-infecção

(Figura 2), os fluidos foram considerados prontos para estocagem. O sobrenadante final resultante foi distribuído em alíquotas de 1mL em microtubos estéreis e estocado em freezer a -80°C .

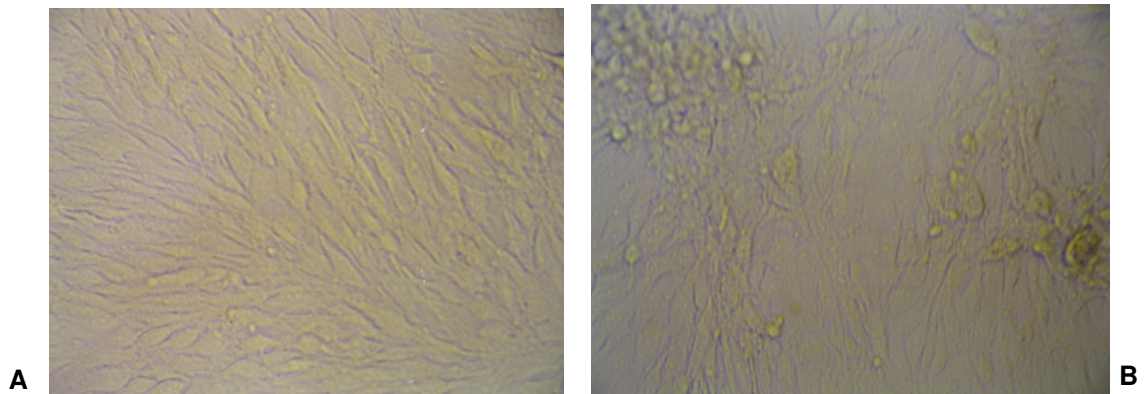


Figura 2 - Células FrhK-4 não infectadas (A) e após quatro dias de infecção com HAV (B).

3.1.5 Titulação do HAV por imunofluorescência indireta

O título infeccioso do estoque viral produzido foi determinado através de imunofluorescência (IFA) indireta, conforme descrito por Barardi et al (1998), com algumas modificações.

Células FrhK-4 foram cultivadas em meio de crescimento durante 24h em câmaras de oito poços estéreis (Lab Tek, NUNC) até a formação de um tapete confluyente. A concentração celular inicial foi de 5×10^4 células/mL. Foram realizadas diluições seriadas do fluido infeccioso (10^{-1} a 10^{-7}) em meio de infecção. As células contidas em cada poço foram infectadas com $100\mu\text{L}$ de cada diluição viral e mantidas durante 90 min a 37°C , sob atmosfera de 5% de CO_2 . Após esse período o inóculo foi removido e foram adicionados $300\mu\text{L}$ de meio de infecção. As câmaras foram mantidas por sete dias sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera acima mencionadas. Após o período de incubação, o meio foi removido e as células foram fixadas com $300\mu\text{L}$ de metanol a -20°C por 5 min à temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida para garantir adequada fixação das células. Posteriormente, as câmaras foram secas ao ar e reidratadas com $100\mu\text{L}$ de PBS por 5min. Em seguida, as células foram incubadas com $300\mu\text{L}$ de solução bloqueadora (PBS, soroalbumina

bovina (BSA) a 1% e Tween-20 a 0,05%) durante 15min. Cada poço recebeu o anticorpo monoclonal MAB 8241 (Chemicon International Inc.), diluído 1:100 em solução bloqueadora, por 16 h a 4°C. Após este período as células foram lavadas três vezes com solução bloqueadora e mantidas por 15min a 37°C com 100µL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) diluído a 1:50 em solução bloqueadora. As células foram lavadas 3x com solução bloqueadora e secas ao ar. As lâminas foram preparadas com 10µL de meio de montagem (PBS a 40%, glicerol 50%, formalina a 5%, NaCl a 5% e DABCO a 2,5% pH 8,6) e recobertas por lamínula para a realização da leitura em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40).

O título viral foi determinado pelo produto: **número de células fluorescentes x recíproca da diluição x recíproca do volume em mililitros**, através da observação de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos/mL (FFU/mL).

3.2 Bactérias

Todas as cepas bacterianas utilizadas como controle nos experimentos foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos (CAL/CCA/UFSC).

3.2.1 Coliformes totais e coliformes a 45°C

Segundo a legislação vigente brasileira (ANVISA, 2001), o termo “coliformes fecais” foi substituído por “coliformes a 45°C”.

Coliformes totais – *Enterobacter aerogenes* (ATTC 13048)

Coliformes a 45°C – *Escherichia coli* (ATCC 25922)

3.2.2 Salmonella spp

Salmonella tiphymurium (ATTC 14028)

3.2.3 Manutenção das cepas bacterianas

As cepas bacterianas são normalmente estocadas em microtubos de 1,7mL a -20°C. Para seu crescimento as mesmas foram descongeladas à

temperatura ambiente e inoculadas em tubos de ensaio contendo 5mL de caldo BHI (Oxoid: Infusão de sólidos de cérebro de bezerro 12,5g/l; infusão de sólidos de coração de boi 5,0g/l; peptona 10,0g/l; glicose 2g/l; NaCl 5,0g/l e NaH₂PO₄ 2,5g/l) com o uso de uma alça de platina esterilizada. Duas alçadas da cultura estoque foram necessárias para um inóculo satisfatório. Os tubos foram mantidos a 37°C por 16h para alcançar a fase estacionária do crescimento bacteriano. Após este período, as culturas foram mantidas a 4°C por até uma semana, sendo então transferidas para novos tubos contendo caldo BHI. As culturas obtidas foram utilizadas como controles nos ensaios de contaminação bacteriana, descritos nos itens 3.13 e 3.14.

3.3 Ostras

As ostras da espécie *Crassostrea gigas* foram adquiridas diretamente com os produtores de três fazendas de cultivo de Florianópolis-SC e utilizadas para a infecção experimental e análise de campo.

3.3.1 Coleta das amostras

Duas dúzias de ostras de cada local foram coletadas mensalmente no período de dezembro de 2002 a julho de 2004, sempre no horário entre 9 e 10h da manhã, com o objetivo de minimizar possíveis variações na amostra. Foram coletadas amostras mensais de três fazendas de cultivo de Florianópolis.

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e mantidas em caixa térmica durante o transporte até o Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da UFSC. Concomitantemente, foi colhida, em frascos de vidro estéreis, uma amostra de aproximadamente 250mL de água do mar em cada ponto de cultivo durante o mesmo período para a determinação do número de coliformes totais e a 45°C. Estas foram transportadas ao LVA juntamente com as amostras de ostras. Assim que as amostras chegaram ao laboratório, as conchas foram lavadas, desinfetadas por 10 min em álcool 70% e abertas assepticamente em uma capela de fluxo laminar.

3.3.2 Dissecção do trato gastrointestinal das ostras para detecção viral

Com auxílio de pinça e bisturi as ostras foram dissecadas para isolamento do trato gastrointestinal que se encontra recoberto por brânquias e outros tecidos. O tecido digestivo dissecado foi triturado com o auxílio de um homogeneizador Ultra-Turrax (Modelo T25 basic, IKA Labortechnik), identificado e aliquoteado em 2 microtubos estéreis de 2mL para posterior análise. Estas amostras foram processadas para análise da contaminação viral, como descrito no item 3.9.

3.3.3 Preparação das amostras de água e ostras para detecção bacteriana

Para análise da contaminação bacteriana, foram utilizadas ostras inteiras trituradas em um frasco de 250mL com o auxílio de um homogeneizador Ultra-Turrax (Modelo T25 basic, IKA Labortechnik). O homogenato obtido foi processado como descrito no item 3.13, para detecção da presença de *Salmonella* spp. na carne das ostras. As amostras de água do mar foram analisadas, conforme descrito no item 3.12 para determinação dos níveis de coliformes.

METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO VIRAL

3.4 Extração do RNA de culturas infectadas pelo HAV.

Para a extração do RNA a partir do sobrenadante de células infectadas (controle positivo) foi utilizado o reagente comercial Trizol LS[®] (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações.

Em 500µL do fluido infeccioso viral foi adicionado igual volume de reagente Trizol LS[®] em um microtubo de 2mL. A lise das células na suspensão da amostra foi obtida através da passagem da suspensão várias vezes através da ponteira da pipeta. As amostras foram então mantidas à temperatura ambiente por 5min. Após, 400µL de clorofórmio foram adicionados aos tubos e os mesmos foram agitados vigorosamente por 15seg e mantidos por 15min à

temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 Xg a 4°C por 15min. Ao final da centrifugação, foi visualizada uma fase inferior vermelha, contendo Trizol LS - clorofórmio; uma interface, que consistia de proteínas e restos celulares; e uma fase aquosa superior incolor, na qual estava presente o RNA. A fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa transferida para outro tubo contendo 2 volumes de álcool isopropílico para precipitação do RNA. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 10min e centrifugadas a 12.000Xg por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e cada amostra acrescida de 2 volumes de etanol 75%, mantido a -20°C, homogeneizada levemente e centrifugada a 10.000Xg, durante 30min a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado, o tubo vertido sob papel absorvente e o material genético foi seco ao ar. Foram adicionados ao precipitado 50µL de água DEPC (água tratada com dietilpirocarbonato, Invitrogen), o RNA total foi quantificado e o tubo foi estocado a -80°C até a utilização.

3.5 Quantificação do RNA total.

A fim de quantificar o RNA viral obtido a partir do fluido viral, após o processo de extração, a amostra foi analisada por espectrofotometria no UV.

A concentração do RNA viral foi medida em espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech), através da leitura da absorbância (densidade ótica, D.O.), nos comprimentos de onda 260 e 280nm, para avaliar a quantidade e a qualidade do RNA obtido na extração (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.6 Reação de RT-PCR para detecção de HAV.

A reação de RT-PCR para detecção do HAV em fluido viral e ostras não dissecadas foi padronizada no LVA por Coelho et al. (2003). No presente trabalho, foram feitas algumas modificações no protocolo original a fim de otimizar a reação para ostras dissecadas.

O par de iniciadores que foi utilizado (HAV-R e HAV-L; Tabela 2) é específico para amplificação da região genômica correspondente à interface dos genes codificadores das proteínas de capsídeo (VP1 e VP3), amplificando

uma seqüência molde de 192 pares de base (TSAI; TRAN; SANGERMANO et al., 1994; SCHWAB; DE LEON; SOBSEY, 1995).

Tabela 2: Sequência de iniciadores específicos utilizados para a amplificação gênica do HAV-HM 175 por RT-PCR

Iniciador	Sequência (5' - 3')
HAV-R	CTCCAGAATCATCTCAAC
HAV-L	CAGCACATCAGAAAGGTGAG

3.6.1 Transcrição reversa

Como se trata de vírus com genoma RNA, a reação de PCR foi precedida de uma etapa de transcrição reversa para síntese do DNA complementar.

A mistura de reação para síntese do DNA complementar (cDNA), foi preparada em sala adequada, conforme o descrito a seguir: em microtubos estéreis de 0,2mL para PCR foi adicionado tampão da enzima na concentração final 1X contendo Tris-Cl 50mM; pH 8,4, KCl 50mM; 5,0mM de MgCl₂; 5,0mM de DDT; 0,5mM de espermidina; 0,2mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP's) ATP, TTP, CTP, GTP; 10U de inibidor de RNAses; 30 pmoles do iniciador HAV-R e 20U de AMV-RT. Em outra sala, amostras de 5,0µL de RNA foram aliquotados em microtubos estéreis de 0,2mL e desnaturadas a 99°C por 5min no termociclador (Techne Flexigene®). Os tubos foram transferidos rapidamente para o gelo por 2min e centrifugados brevemente para a coleta da amostra no fundo do tubo. Em seguida, 25µL da mistura de reação descrita acima foram adicionados a cada tubo. A transcrição reversa do RNA viral foi realizada a 37°C por 90min.

3.6.2 Reação de PCR para HAV

Para realizar a reação de PCR, a mistura de reagentes foi previamente preparada em tubos estéreis, em ambiente adequado, contendo as seguintes concentrações finais: tampão da reação de PCR na concentração final 1X, contendo Tris-HCl 10mM pH 8,0; KCl 50mM; 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de cada

deoxinucleotídeo trifosfatado ATP, TTP, CTP, GTP; 30 pmoles de cada um dos iniciadores e 2,5U de enzima *Taq* Polimerase (Biotools, Madrid).

Um volume de 45µL desta mistura foi distribuído em microtubos estéreis de 0,2mL e acrescentou-se 5,0µL do cDNA produzido na reação anterior. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas brevemente. O programa de temperaturas e ciclos com estes iniciadores demandou um passo inicial de desnaturação a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos: 95°C, 1min; 55°C, 1min; 72°C, 1min e um passo de extensão final a 72°C por 7min.

Em todos os ensaios foram realizados controles negativos (de ostras e dos reagentes da reação), que não continham RNA, o qual foi substituído por 5,0µl de água e controle positivo de RNA viral purificado, além das amostras ou diluições de RNA a serem testadas.

3.6.3 Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação das reações de RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% preparado em tampão Tris-Borato-EDTA 1X (TBE: Tris-HCl 0,09M; ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Uma alíquota de 10µL de cada amostra foi misturada a 2µL de tampão de corrida 6X (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30% p/v em água Milli-Q) e aplicadas no gel, sendo submetidas à eletroforese com voltagem constante de 100V em tampão TBE 1X. Em cada gel, para cada conjunto de amostras, foram aplicados 10µL do marcador de peso molecular, 100pb DNA ladder (Biotools), na concentração de 83ng/mL, a fim de definir o peso molecular dos fragmentos amplificados.

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (Sigma) a 0,5µg/mL em água. Os produtos de amplificação foram visualizados através da exposição à luz ultravioleta, no transiluminador Pharmacia Biotech® e fotografados com o sistema de fotodocumentação Kodak® Digital Science.

3.7 Hibridização molecular para detecção do HAV.

Foram utilizadas duas estratégias para produção de sondas diferentes para a hibridização molecular. Na primeira, optou-se pela clonagem e seqüenciamento do fragmento de 192pb, obtido por RT-PCR a partir de RNA de fluido viral de HAV com os iniciadores descritos no item 3.6. Neste caso, a sonda foi marcada por PCR com digoxigenina ou por iniciadores randômicos com ^{32}P . Na segunda estratégia, optou-se pela marcação terminal com digoxigenina de um oligonucleotídeo de 22pb interno à seqüência amplificada de 192 pb pela enzima terminal transferase.

As etapas de clonagem, seqüenciamento e marcação radioativa da sonda com ^{32}P foram realizadas no laboratório do Prof^o Dr^o David Levin na Universidade de Victória, B.C., no Canadá em estágio financiado pelo Canada-Latin American and the Caribbean Research Exchange Grant (LACREG) promovida pela Association of Universities and Colleges of Canada (AUCC). O laboratório conta com estrutura adequada para trabalhos com radioisótopos, por isso a manipulação da sonda marcada radioativamente se limitou ao período do estágio.

3.7.1 Produção da sonda de 192pb

O cDNA de 192pb obtido por RT-PCR foi clonado e seqüenciado a fim de garantir completa homologia com o vírus. Para a clonagem do fragmento de interesse foi utilizado o kit comercial Invitrogen: Zero BluntTM TOPOTM PCR *Cloning Kit for Sequencing*, com algumas modificações.

3.7.1.1 Purificação do inserto

O produto de 192pb, que foi utilizado como molde na clonagem, foi purificado a partir de um gel de agarose com o Kit GeneClean[®] Turbo Kit (Q.BIOgene), conforme instruções do fabricante. O produto purificado foi eluído em 30 μL de solução final.

3.7.1.2 Ligação do inserto com o vetor

O cDNA purificado foi inserido no plasmídeo (pCR™ 4Blunt-TOPO™ Invitrogen Zero Blunt™ TOPO™ PCR *Cloning Kit for Sequencing*) conforme descrito na Tabela 3:

Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação de ligação do inserto de 192pb com o plasmídeo.

Reagente	Volume
▪ Produto de PCR de 192pb	3µL
▪ Tampão (NaCl 1,2M; MgCl ₂ 0,06M)	1µL
▪ Água estéril	q.s.p. 5µL
▪ Vetor (Plasmídeo)	1µL
▪ Volume final	6µL

A mistura foi mantida em banho de gelo à temperatura ambiente por 30 min.

3.7.1.3 Transformação das bactérias

Foram utilizadas células de *Escherichia coli* cepa DH5™-T1™ quimicamente competentes, armazenadas a -80°C.

Dois microlitros da mistura de reação obtida no item anterior foram adicionados a 50µL da suspensão bacteriana. A mistura foi mantida por 30 min no gelo, aquecida a 42°C por 1 min, e novamente resfriada no gelo. Foi adicionado 1mL de meio de cultura LB (Tryptona 10g/l; extrato de levedura 5g/l; NaCl 10g/l) e a mistura foi mantida por 1h a 37°C sob agitação. O tubo foi centrifugado a 300Xg por 1 min e 700µL do sobrenadante foram desprezados. Todo o volume restante foi plaqueado em ágar LB suplementado com 100µg/mL de ampicilina. As placas foram mantidas a 37°C, durante 16 a 24h.

3.7.1.4 Análise dos clones positivos

A seleção dos clones positivos foi baseada nas características do vetor utilizado. A Figura 3 apresenta a estrutura do vetor de clonagem pCR[®]4Blunt-TOPO: o plasmídeo possui genes de resistência à kanamicina e ampicilina; sítios para iniciadores universais (M13 senso e antisense, T3 e T7); gene letal *lacZ*[®]-*ccdB*; e promotor *lac*.

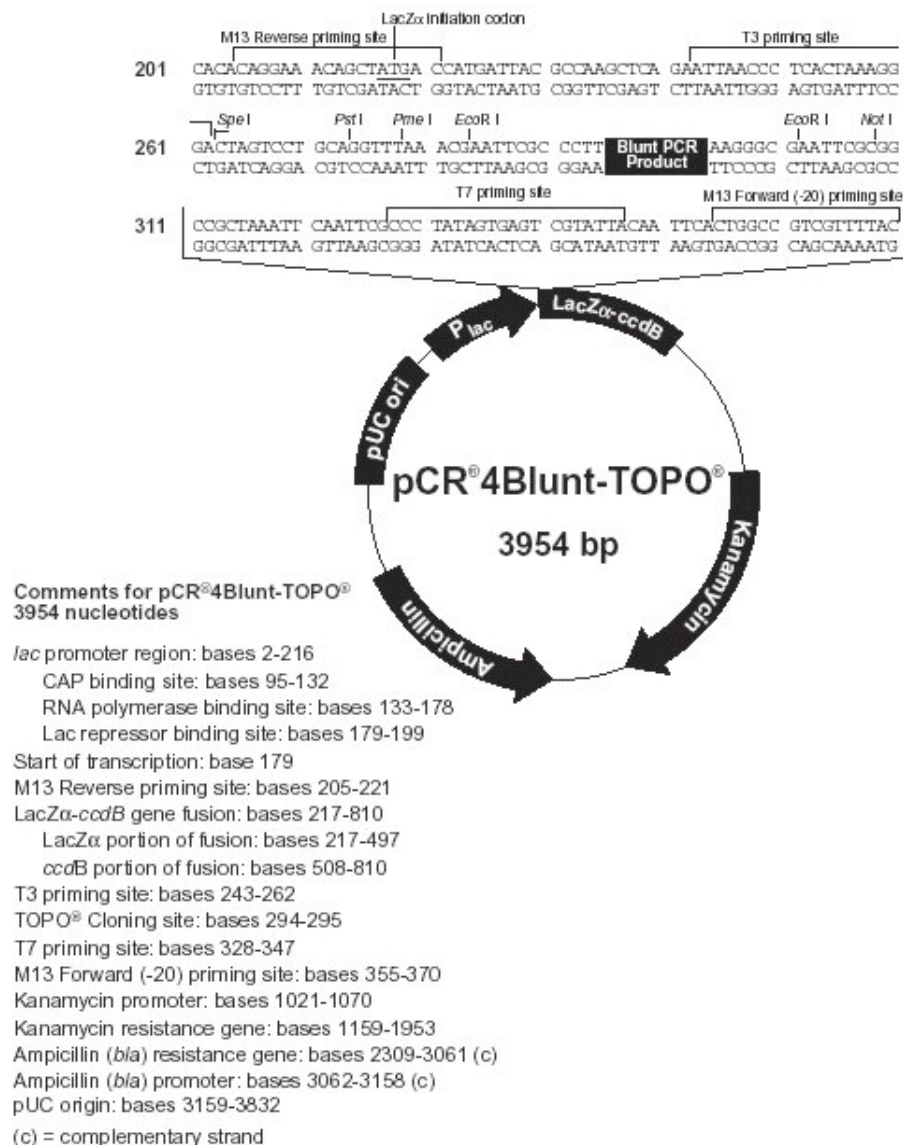


Figura 3 – Representação esquemática do plasmídeo pCR[®]4Blunt-TOPO (INVITROGEN, 2001).

Foram selecionadas pelo menos 10 colônias de cada placa de agar LB suplementado com ampicilina. Células que não continham o vetor foram selecionadas pela ampicilina adicionada às placas de agar LB. Já as células que continham o vetor, mas não o recombinante, foram selecionadas pelo gene letal: o plasmídeo pCR fornecido pelo kit permite a seleção direta dos recombinantes via ruptura do gene letal para *E.coli ccdB* pelo inserto. Sendo assim, células que contêm o vetor não recombinante são mortas após plaqueamento

Cada colônia foi submetida a uma reação de PCR, utilizando-se os iniciadores descritos anteriormente, para confirmação inicial da presença do inserto. Os clones positivos foram semeados em nova placa para manutenção e em caldo LB suplementado com ampicilina para propagação. Os clones selecionados foram propagados em caldo LB com ampicilina por 16h e o DNA plasmidial purificado com o Kit QIAprep Miniprep (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Após quantificação por espectrofotometria, o DNA purificado foi novamente analisado por PCR, para confirmação do inserto, seqüenciado. Este foi realizado pela metodologia proposta por Sanger (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) em um sequenciador da Applied BioSystems (Modelo 370). As seqüências foram analisadas no banco de dados BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) para confirmação da homologia. Os clones positivos foram armazenados a -80°C em caldo LB preparado em 30% de glicerol.

3.7.1.5 Marcação radioativa da sonda com ^{32}P

O fragmento de 192pb a ser marcado, tanto com ^{32}P quanto com digoxigenina, foi purificado a partir de eletroforese em gel de agarose do produto de PCR obtido dos clones positivos. A banda de 192pb foi recortada do gel e purificada através do kit GeneClean[®] Turbo Kit (Q.BIOgene), conforme instruções do fabricante. O produto purificado foi eluído em 30 μL de solução final. A sonda foi marcada com ^{32}P com a utilização de iniciadores randômicos, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Reagentes utilizados na marcação radioativa do fragmento de 192pb com ^{32}P .

Reagente	Volume
▪ Fragmento purificado de 192pb(<1,5µg)	8µL
▪ Água MilliQ	9µL
▪ Iniciador randômico 18 OD260unidades/mL	15µL
▪ dNTP's (dATP+dGAT+dTTP) 0,5mM	1µL
▪ dCTP- α ^{32}P 1mM com 10UCi/µL	5µL
▪ Enzima Polimerase Klenow 3U/mL	2µL
▪ Volume final	40µL

A mistura foi mantida por 1,5h, à temperatura ambiente. O ^{32}P não incorporado foi removido por filtração em gel, em coluna de Sephadex G-50 (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A sonda marcada foi usada imediatamente na reação de hibridização.

3.7.1.6 Marcação não radioativa da sonda com digoxigenina (DIG) pela reação de PCR

O fragmento purificado, conforme descrito no início do item anterior, foi marcado com digoxigenina por PCR, utilizando-se dUTP ligado à digoxigenina (dUTP-DIG) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). O dUTP-DIG foi adicionado à reação em substituição a determinadas proporções de dTTP. Foram avaliadas duas proporções de dTTP:dUTP-DIG, 1:2 e 1:20, a fim de minimizar os gastos com este reagente.

A seqüência molde de 192pb foi marcada com digoxigenina pela incorporação de dUTP-DIG, através de amplificação por PCR.

A mistura de reação foi preparada, conforme item 3.6.2, exceto pela mistura de nucleotídeos, a qual incluiu dTTP:dUTP-DIG na proporção de 1:2 ou 1:20. Os ciclos e temperaturas de amplificação foram feitos conforme anteriormente descrito. O produto obtido foi purificado por precipitação com etanol: em um microtubo de 2mL foram adicionados 50µL da sonda; 0,3M de acetato de sódio pH 5,3; e 2,5 volumes de etanol absoluto (Merck) gelado. A sonda foi precipitada a -80°C por 30 min (ou a -20°C por 2h), centrifugada a 10.000Xg por 30 min a 4°C e ressuspendida em 50µL de tampão TES (Tris 10mM; EDTA 1mM; SDS 0,1% pH 7,5). A eficiência de marcação da sonda e a

perda na precipitação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose (item 3.6.3) e por revelação imunológica da sonda aplicada em membrana de nylon (Sigma), conforme descrito no item 3.7.3.

3.7.2 Produção da sonda de 22pb

A seqüência do oligonucleotídeo interno à seqüência de HAV amplificada pelos iniciadores HAV-R e HAV-L (22pb) foi descrita por Schwab, De Leon e Sobsey.(1995): 5´ TGCTCCTCTTTATCATGCTATG 3´.

3.7.2.1 Marcação não radioativa da sonda com digoxigenina (DIG) pela enzima terminal transferase

A sonda foi marcada pela enzima terminal transferase (Amersham Biosciences), a qual adiciona à seqüência molde uma extremidade composta por dATP e dUTP-DIG. Foram adicionados em um microtubo de 0,2mL os reagentes constantes da Tabela 5.

Tabela 5 - Reagentes utilizadas na marcação não radioativa da seqüência de 192pb com digoxigenina.

Reagente	Concentração
▪ Oligonucleotídeo	100pmoles
▪ Tampão da enzima 5X*	1x
▪ CoCl ₂	5mM
▪ dATP	0,5mM
▪ dUTP-DIG	50µM
▪ Terminal Transferase	25U
▪ Água MilliQ	qsp 20µL

* O tampão da enzima 5X é composto por cacodilato de sódio 500mM, pH 7,2; CoCl₂ 10mM; e 2-β-mercaptoetanol 1mM.

A mistura foi mantida a 37°C por 30 min no termociclador. A reação foi interrompida pela adição de 2,0µL de EDTA 0,2M pH 8,0. A eficiência de marcação da sonda foi analisada pela revelação imunológica da sonda aplicada em membrana de nylon, conforme descrito no item 3.7.4.3.

3.7.3 Aplicação das amostras em membrana de nylon

3.7.3.1 Dot Blot

Os produtos de PCR foram diluídos em tampão de lise (NaOH 0.4M; EDTA 10mM), desnaturados por 10min a 99°C e resfriados diretamente no gelo por 2 min. As amostras foram aplicadas sobre uma membrana de nylon carregada positivamente (Sigma) com o auxílio de um aparato a vácuo (Bioagency Biotechnology, São Paulo, Brazil) específico para este fim. A membrana foi lavada em NaOH 0,4M, em 2X SSC (NaCl 0,3M; citrato de sódio 30mM) e os ácidos nucleicos das amostras a serem confirmadas quanto à presença do HAV foram aplicados e fixados à membrana com luz U.V. por 3 min.

3.7.3.2 Southern Blot bidirecional

Nesta metodologia, as amostras são transferidas para duas membranas simultaneamente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Após a eletroforese em gel de agarose, as amostras foram desnaturadas por 15min em NaOH 0,5M / NaCl 0,5M e neutralizadas por 15min em tampão Tris-HCl 0,5M pH 7,5 / NaCl 1,5M. O gel foi nivelado com auxílio de um bisturi. O sanduíche envolvendo papel toalha, papel Whatman® e duas membranas de nylon foi montado de acordo com o esquema da Figura 4. As membranas, o gel e o papel Whatman® foram umedecidos em 2xSSC. Todo o sistema foi envolto em filme de PVC e prensado com aproximadamente 3Kg. A transferência foi realizada por 20h à temperatura ambiente.

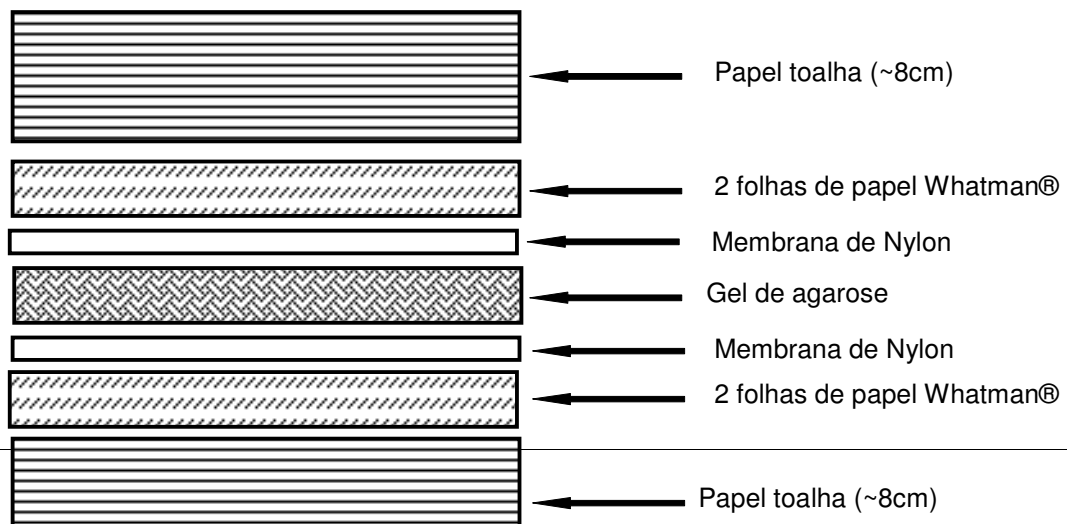


Figura 4 - Esquema representativo da transferência por *Southern blot* bidirecional

3.7.4 Hibridização molecular

Os reagentes utilizados em todas as etapas da hibridização molecular constam da tabela 6.

Tabela 6 - Reagentes utilizados na hibridização molecular e na revelação imunológica

Reagente	Composição
▪ 20X SSC*	NaCl 3M; citrato de sódio 0,3M
▪ Tampão de ácido maléico	Ácido Maléico 0,1M; NaCl 0,15M; pH 7,5
▪ Tampão de lavagem	Tampão de ácido maléico acrescido de 0,3% de Tween 20
▪ Solução de bloqueio 10%	Preparada com reagente de bloqueio (Roche) em tampão de ácido maléico
▪ Solução de bloqueio 1%	Solução de bloqueio 10% diluída sempre fresca em tampão de ácido maléico
▪ Solução de hibridização	5X SSC, solução de Bloqueio 1%, Lauril sarcosinato de sódio 0,1% e SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,02%
▪ Solução de anticorpo	Anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina diluído 1:5.000 em solução de bloqueio a 1%
▪ Tampão de detecção	Tris 0,1M; NaCl 0,1M; pH 9,5
▪ Solução NBT/BCIP	Preparada em tampão de detecção contém 375µg/mL de NBT (cloreto nitroso de azul de tetrazolio) e 188µg/mL de BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoil, sal de toluidina)

*Todas as soluções de SSC em diferentes diluições foram preparadas a partir desta solução-mãe.

3.7.4.1 Pré-hibridização

As membranas foram colocadas em sacos plásticos para hibridização e imersas em solução de hibridização. As amostras foram mantidas por 1h a 65°C em banho-maria com agitação. A solução foi descartada e o procedimento foi repetido por mais uma hora. O volume de solução usado na pré-hibridização foi calculado na razão de 20mL para cada 100cm² de membrana.

3.7.4.2 Hibridização

As quantidades de sonda utilizada nas hibridizações foram diferentes para cada sonda (Tabela 7).

Tabela 7 - Quantidades de cada tipo de sonda utilizadas na hibridização molecular.

Sonda	Quantidade utilizada
Sonda de 192pb marcada com ^{32}P	Todo o volume da reação (40 μL)
Sonda de 192pb marcada com DIG	4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de solução de hibridização
Sonda de 22pb marcada com DIG	10pmoles/mL de solução de hibridização

As sondas de 192pb foram desnaturadas a 99°C por 10 min e resfriadas no gelo por 5 min antes da hibridização.

A solução de pré-hibridização foi removida e foram adicionados 3mL/cm² de membrana de nova solução de hibridização acrescida da sonda. As membranas foram mantidas a 65°C em banho-maria com agitação por no mínimo, 16h.

As lavagens pós-hibridização consistiram em 2x de 15 min à temperatura ambiente com 2X SSC / 0,1% SDS e 2x de 15 min a 65°C com 0,5X SSC / 0,1% SDS.

3.7.4.3 Detecção imunológica

Este procedimento de detecção foi utilizado para as membranas hibridizadas com as sondas marcadas com digoxigenina.

Após as lavagens, as membranas foram enxaguadas brevemente em tampão de lavagem e mantidas por 30min, primeiramente, em solução de bloqueio 1% (50mL/cm² de membrana) e, em seguida, em solução de anticorpo (20mL/cm² de membrana). As amostras foram lavadas 2x de 15min em tampão de lavagem e mantidas de 2 a 3min com tampão de detecção. Todas as reações e lavagens foram efetuadas sob agitação e à temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram mantidas em solução de NBT/BCIP (10mL/cm² de membrana) no escuro e sem agitação. A reação colorimétrica se

desenvolveu entre 5min e 16h e foi interrompida pela adição de água destilada. As membranas foram secas em papel filtro e fotodocumentadas.

3.7.4.4 Detecção em filme de raio-X

Este procedimento de detecção foi utilizado para as membranas hibridizadas com a sonda marcada radioativamente.

Após as lavagens, as membranas foram secas em papel filtro, envoltas em filme de PVC e expostas ao filme de raio-X por 16 a 24h a 70°C.

3.8 Determinação do limite de sensibilidade da detecção do HAV, através da reação de RT-PCR e da hibridização molecular.

Foram realizadas diluições seriadas de razão 10 do fluido viral do HAV em meio de cultura MEM. As concentrações de HAV nas respectivas diluições estão mostradas na Tabela 8.

O RNA viral das diluições foi purificado, conforme descrito no item 3.4; a reação de RT-PCR foi realizada conforme item 3.6; e a hibridização molecular conforme item 3.7.

Tabela 8 - Diluições da suspensão do HAV e suas respectivas concentrações

Diluições da suspensão do HAV	Concentração em FFU/mL
Puro	$1,0 \times 10^9$
10^{-5}	$1,0 \times 10^4$
10^{-6}	$1,0 \times 10^3$
10^{-7}	$1,0 \times 10^2$
10^{-8}	$1,0 \times 10^1$
10^{-9}	1,0
10^{-10}	0,1
10^{-11}	0,01
10^{-12}	0,001

3.9 Avaliação dos protocolos de processamento, extração e purificação de material genético a partir do

tecido digestivo dissecado de ostras contaminadas artificialmente com HAV.

Os protocolos de processamento do tecido digestivo para recuperação de partículas virais foram realizados, utilizando-se tecidos digestivos dissecados e preparados, conforme descrito no item 3.3.2. Foram avaliados três protocolos: P1 (BARARDI; YIP; EMSILE et al., 1999; SANTOS; RIGOTTO; SIMOES et al., 2001), P2 (ATMAR; NEILL; ROMALDE et al., 1995; LE GUYADER; HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000) e P3 (adaptado de P1 e P2), como descritos a seguir. Durante a padronização, os extratos obtidos em cada protocolo de processamento do tecido digestivo dissecado (P1, P2 e P3) foram submetidos a dois diferentes protocolos de purificação e extração de material genético: E1 (ATMAR; NEILL; ROMALDE et al., 1995; LE GUYADER; HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000), E2 (BARARDI; YIP; EMSILE et al., 1999; SANTOS; RIGOTTO; SIMOES et al., 2001; COELHO; HEINERT; SIMOES et al., 2003).

A partir de alíquotas de 2mL de tecido digestivo, foram realizados experimentos utilizando-se três alíquotas por protocolo:

- C- = controle negativo (tecido não infectado);
- C+a = controle positivo infectado no início do processo;
- C+d = controle positivo infectado após o processamento (controle de 100% de recuperação viral).

O inóculo consistiu de fluido do HAV, na concentração final de 5×10^6 FFU/mL de tecido homogeneizado.

Ao total foram seis combinações avaliadas: P1E1, P1E2, P2E1, P2E2, P3E1, P3E2.

3.9.1 Recuperação das partículas virais

3.9.1.1 Protocolo 1 (P1)

Cada alíquota de tecido digestivo de ostra foi transferida para tubos de centrífuga de 50mL contendo 10mL de tampão triptose-fosfato (TPB) 10% (TPB 100% contém 20 g de triptose; 2,0g de glicose; 5,0g de NaCl e 2,5g de

Na₂HPO₄, pH 7,3), preparado em glicina 0,05M, pH 9,0. e homogeneizada com auxílio de um vortex. O homogeneizado foi deixado sob agitação suave a 4°C durante 30min e, posteriormente, centrifugado a 10.000Xg durante 30min, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo as partículas virais foi precipitado em 2,0mL de polietilenoglicol 6.000 (PEG) a 8% (p/v), preparado em TPB 10% e mantido sob agitação durante um mínimo de 2h a um máximo de 16h, a 4°C. Posteriormente a esse período, a suspensão foi centrifugada durante 20min, a 10.000Xg, a 4°C. Ao precipitado foram adicionados 3mL de tampão fosfato de sódio 0,5M, pH 9,0. Os extratos foram transferidos para tubos estéreis, e o pH reajustado para 7,5. As amostras foram estocadas em freezer a -80°C até extração e purificação do material genético.

3.9.1.2 Protocolo 2 (P2)

Cada alíquota de tecido digestivo de ostra foi transferida para tubos de centrífuga de 50 mL contendo 4,0 mL de PBS modificado (145mM NaCl; 7,7mM Na₂HPO₄; 2,3mM NaH₄PO₄ pH 7,4) e agitada no vortex até completa homogeneização. Ao homogenato foi adicionado igual volume de Freon 113 ou Clorofórmio:Butanol (1:1). Os tubos foram novamente homogeneizados no vortex durante 30seg em velocidade máxima e, em seguida, centrifugados a 10.000Xg durante 15min a 4°C. A fase aquosa (superior) foi transferida para novos tubos de centrífuga contendo 3mL de PEG 24% / NaCl 1,2M e os tubos agitados por 1h a 4°C. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000Xg a 4°C durante 20min e ao sedimento foram adicionados 3 mL de água milliQ estéril. As amostras foram estocadas em freezer a -80°C até extração e purificação do material genético.

3.9.1.3 Protocolo 3 (P3)

Cada alíquota de tecido digestivo de ostra foi transferida para tubos de centrífuga de 50 mL contendo 4,0 mL de TPB 10% preparado em glicina 0,05M pH 9,0 e agitado no vortex até completa homogeneização. Ao homogenato foi adicionado igual volume de Freon 113 ou Clorofórmio:Butanol (1:1). Os tubos foram novamente homogeneizados no vortex durante 30seg em velocidade máxima e, em seguida, centrifugados a 10.000Xg durante 15min a 4°C. A fase

aquosa (superior) foi transferida para novos tubos de centrifuga contendo igual volume de PEG 24% / NaCl 1,2M e os tubos agitados por 1h a 4°C. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000Xg a 4°C durante 20min e ao sedimento adicionados 3 mL de água milliQ estéril. As amostras foram estocadas em freezer a -80°C até extração e purificação do material genético.

3.9.2 Extração e purificação do material genético

Quando o protocolo de processamento não contemplou uma etapa de clarificação com Freon 113 (P1), a etapa inicial consistiu na adição a 500µL do extrato de um mesmo volume de Freon 113 ou clorofórmio:butanol (1:1). Os tubos foram agitados por 1 min em vortex e centrifugados a 12.000Xg durante 5min a 4°C. A fase aquosa (superior) foi separada e o protocolo foi realizado conforme descrito abaixo.

3.9.2.1 Protocolo E1

Aliquotas de 500µL de extrato de ostras, provenientes de um dos três protocolos de processamento (P1, P2 ou P3), foram tratadas durante 30min a 37°C com 200µg/mL da enzima proteinase K (Gibco-BRL) juntamente com o tampão da enzima com a seguinte composição: Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 5mM; SDS 0,5% (p/v). Em seguida, foram adicionados às amostras 500µL da mistura dos solventes orgânicos fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 25:24:1. Os tubos foram agitados por 30seg e centrifugados a 6.000Xg durante 7min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e acrescida de 500µL de clorofórmio, agitados por 1 min e centrifugadas como descrito anteriormente. A fase aquosa foi novamente transferida para outro tubo contendo acetato de sódio 3M pH 5,3 na concentração final de 0,3M e 2,5 volumes de etanol absoluto mantido a -20°C. As amostras foram incubadas durante pelo menos 2h a -20°C ou, alternativamente, durante 30min a -80°C. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 10.000Xg durante 30min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 1,5mL de água milliQ estéril aquecida a 56°C. Em seguida, foram adicionados 600µL de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, Sigma) na concentração de 5%(p/v) preparado em NaCl (Sigma) 1,2M, sendo as amostras incubadas à

temperatura ambiente durante 15min. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000Xg durante 30min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido primeiramente com 150µL de NaCl 1M. Em seguida, o tubo foi lavado com 300µL de água milliQ estéril. A solução resultante foi transferida para outro tubo contendo acetato de sódio 3M pH 5,3 na concentração final de 0,3M e 2,5 volumes de etanol absoluto mantido a -20°C. As amostras foram incubadas durante, pelo menos, 2h a -20°C ou, alternativamente, durante 30min a -80°C. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 10.000Xg durante 30min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e cada amostra acrescida de 2 volumes de etanol 75%, mantido a -20°C, homogeneizada levemente e centrifugada a 10.000Xg, durante 30min a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado, o tubo vertido sob papel absorvente e o material genético foi seco ao ar. O precipitado final foi dissolvido em 100µL de água DEPC estéril e estocado a -80°C até a utilização.

3.9.2.2 Protocolo E2

Aliquotas de 500µL de extrato de ostras, provenientes de um dos três protocolos de processamento (P1, P2 ou P3), foram tratadas durante 1h a 37°C com 200µg/mL da enzima proteinase K (Gibco-BRL) juntamente com o tampão da enzima. Após este período, foi adicionado aos tubos brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) na concentração de 1,3 %(p/v) em presença de NaCl (Sigma) 0,7M. As amostras foram incubadas a 56°C durante 30min. Em seguida, foi adicionado às amostras igual volume do reagente Trizol LS[®]. A lise das células na suspensão de amostra foi obtida através da passagem da suspensão várias vezes através da ponteira da pipeta. As amostras foram então incubadas à temperatura ambiente por 5min. Após, 400µL de clorofórmio foram adicionados aos tubos e os mesmos foram agitados vigorosamente por 15seg, e incubados por 15min, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 Xg a 4°C por 15min. A fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa transferida para outro tubo contendo 2 volumes de álcool isopropílico para precipitação do RNA. As amostras foram incubadas durante 10min, à temperatura ambiente seguida de centrifugação a 12.000Xg

por 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e cada amostra acrescida de 2 volumes de etanol 75%, mantido a -20°C, homogeneizada levemente e centrifugada a 10.000Xg, durante 10min a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado, o tubo vertido sob papel absorvente e o material genético foi seco ao ar. Foram adicionados ao precipitado 100µL de água DEPC estéril e o tubo estocado a -80°C até a utilização.

3.10 Determinação do limite de sensibilidade do protocolo escolhido para detecção do HAV em ostras.

Após avaliação dos protocolos de processamento, extração e purificação de RNA a partir de tecido digestivo dissecado de ostras por RT-PCR, fez-se necessário a determinação do limite de sensibilidade de detecção do material genético do protocolo melhor avaliado. Esta determinação foi realizada por duas metodologias descritas a seguir.

3.10.1 Infecção das ostras por inoculação direta

Alíquotas de 2mL de tecido digestivo dissecado de ostras foram diretamente inoculadas com diluições crescentes do HAV nas concentrações finais de 10⁵ FFU/mL a 0,0001 FFU/mL de tecido. As amostras foram processadas pelo protocolo melhor avaliado (item 3.9). A detecção do HAV foi feita por RT-PCR (item 3.6) e por hibridização molecular. (item 3.7.4). A maior diluição, na qual foi possível a detecção do HAV por RT-PCR, foi determinada como o limite de sensibilidade da técnica.

3.10.2 Infecção das ostras por bioacumulação

Foi utilizada a técnica de bioacumulação para infecção das ostras a fim de mimetizar o que ocorre no meio ambiente. Esta metodologia foi previamente padronizada por Vinatea (2002) e será descrita a seguir.

Foram utilizados três aquários de plástico contendo 10l de água do mar filtrada com salinidade de 35‰ (55 x 45 x 15cm) para a bioacumulação viral; e 1 aquário de vidro contendo 10l de água do mar filtrada (35 x 25 x 20cm) para os controles negativos (onde não houve inóculo de vírus). Foram colocados no fundo dos aquários barras de aeração. A sala onde se encontrava o sistema foi

climatizada (aproximadamente 25°C) e iluminada durante todo o experimento. Para os ensaios de bioacumulação viral, concentrações decrescentes de fluido viral do HAV (uma diluição por dia em triplicata a partir de 10 FFU/mL) foram preparadas em suspensão de microalgas (*Tetraselmis tetrahele*) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC, na concentração aproximada de 6×10^4 células/mL. A mistura permaneceu em repouso por 30min e, em seguida, foi misturada à água dos três aquários maiores. Foram colocadas três ostras por aquário onde permaneceram durante 3h para que ocorresse a bioacumulação das partículas virais. Ao final deste período, as ostras foram retiradas dos aquários e mergulhadas por 5min em solução de 0,5% de hipoclorito de sódio para desinfecção das conchas. As ostras foram abertas em capela de fluxo laminar com material estéril, dissecadas conforme descrito no item 3.3.2 e processadas pelo protocolo melhor avaliado descrito no item 3.9. A detecção de HAV foi feita por RT-PCR (item 3.6) e por hibridização molecular. (item 3.7.4). A maior diluição, na qual foi possível a detecção de HAV por RT-PCR na maioria das amostras, foi o limite de sensibilidade da técnica.

Controles negativos também foram realizados para cada ensaio de bioacumulação, os quais consistiram de três ostras colocadas no aquário menor e submetidas às mesmas condições descritas acima, mas sem adição da suspensão do HAV.

3.11 Avaliação da contaminação por HAV das amostras de campo, coletadas entre dezembro de 2002 e julho de 2004.

Após a padronização dos ensaios, as amostras de ostras coletadas conforme descrito no item 3.3.1 foram processadas e analisadas por RT-PCR e hibridização molecular para verificar a possível presença do HAV. Os resultados foram comparados com os níveis de contaminação bacteriana encontrados e com fatores ambientais como sazonalidade, temperatura e condições climáticas, analisadas no momento da coleta.

METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE BACTÉRIAS NAS AMOSTRAS DE CAMPO

As amostras de campo (água e ostras), coletadas e preparadas conforme descrito nos itens 3.3.1 e 3.3.3, foram analisadas para verificação da contaminação bacteriana. As amostras de água foram diretamente analisadas para determinação dos níveis de coliformes totais e a 45°C, e as amostras de ostras para determinação da presença de *Salmonella* spp.

3.12 Determinação dos níveis de coliformes em águas de cultivo.

Inicialmente, a metodologia escolhida para determinação dos níveis de coliformes totais e a 45°C nas águas de cultivo foi a técnica dos tubos múltiplos, pela determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes em 100mL de água. Porém, por motivos de viabilidade técnica, em novembro de 2003 optou-se pelo kit Petrifilm (3M) que faz a detecção de coliformes totais e *Escherichia coli*.

3.12.1 Técnica dos tubos múltiplos

A determinação dos níveis de coliformes a 45°C e totais em águas de cultivo foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP) por tubos múltiplos sumarizada por Vanderzant e Splittstoesser (1992).

- **Teste presuntivo:** Três volumes de água (10,0; 1,0 e 0,1mL) foram adicionados a séries de três tubos contendo 10mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e tubos de Durham para coleta de gás. Os tubos foram mantidos a 35°C por 24h e observados se houvesse crescimento com produção de gás. Em caso positivo (crescimento e produção de gás) os itens subseqüentes foram realizados. Em caso negativo (crescimento e/ou produção de gás), os tubos foram mantidos até completar 48h e a leitura foi repetida, passando para os itens subseqüentes, em caso de crescimento com produção de gás. Caso contrário a amostra foi considerada negativa para a presença de bactérias do grupo coliformes.

- **Teste confirmatório para coliformes totais:** todos os tubos com LST e com produção de gás foram transferidos para tubos com Caldo Verde Brilhante Bile (VB) e mantidos a 35°C por 24 - 48h. Se houvesse crescimento com produção de gás, o resultado seria confirmatório para a presença de coliformes totais. O número de tubos positivos com VB determinou o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais presentes em 100mL da amostra em uma tabela de NMP apropriada às diluições inoculadas.
- **Teste confirmatório para coliformes a 45°C:** todos os tubos com LST e com produção de gás foram transferidos para tubos com Caldo *E. coli* (EC) e mantidos em banho-maria a 44,5°C por 24 -48h. Se houvesse crescimento com produção de gás, o resultado seria confirmatório para a presença de coliformes a 45°C. O número de tubos positivos com EC determinou o NMP de coliformes a 45°C presentes em 100mL de amostra em uma tabela de NMP adequada às diluições inoculadas.

As cepas bacterianas de *E. coli* (coliforme a 45°C) e *E. aerogenes* (coliformes totais), descritas no item 3.2.1, foram utilizadas como controles nos experimentos.

3.12.2 Kit Petrifilm®

As placas de Petrifilm® (3M) foram inoculadas com 1 mL de água de cada local e incubadas em estufa à 35°C por 24h para a contagem de coliformes totais (colônias de coloração vermelha associadas com gás). Após esta primeira contagem as placas foram incubadas por mais 24h para a contagem de *E. coli*. (colônias vermelho-azuladas com gás associado). O resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (de coliformes totais ou *E. coli*) por 100mL de água.

3.13 Determinação da presença de *Salmonella* spp.

Assim como a determinação dos níveis de coliformes, a presença de *Salmonella* spp. foi determinada por um segundo método (Kit Reveal®), a partir de novembro de 2003, por questões de viabilidade técnica.

3.13.1 Crescimento em meios seletivos e testes bioquímicos

A determinação da presença de *Salmonella* spp. na carne das ostras foi realizada por metodologias clássicas descritas por Vanderzant & Splittstoesser (1992), a partir do homogenato de ostras. Todos os meios utilizados foram da marca Oxoid.

- **Enriquecimento não-seletivo:** a partir do homogenato de ostras (item 3.3.3), 25g de amostra foram homogeneizados com 225mL de caldo lactosado e mantidas a 35°C por 24h, após ajuste de pH a $6,8 \pm 0,2$.
- **Enriquecimento seletivo:** porções de 1mL da cultura anterior foram transferidos para três tubos contendo 10mL de: Caldo Selenito-Cistina (SC), Caldo Tetrionato (TT) e Caldo Rappaport modificado. Os tubos foram mantidos, respectivamente, a 35, 43 e $42 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24h.
- **Plaqueamento em meios seletivos:** cada um dos tubos provenientes do enriquecimento seletivo foi inoculado em três placas contendo: Ágar Sulfito de Bismuto (SB), Xilose-lisina desoxicolato (XLD) e Hektoen entérico (HE). As placas foram mantidas a 35°C por 24h. As placas de ágar SB foram mantidas por mais 24h, caso não houvesse crescimento bacteriano.
- **Identificação bioquímica:** para os testes bioquímicos, as colônias suspeitas (típicas e atípicas) foram repicadas para tubos contendo ágar inclinado TSI (Triple Sugar Iron) e LIA (Lysine Iron Agar) como testes presuntivos. Somente culturas com perfil bioquímico suspeito foram submetidas à seguinte bateria bioquímica: Urease (ágar uréia), Citrato (ágar Citrato de Simmons), Malonato (Caldo Malonato), Indol (Caldo triptona), Vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), glicose, lactose, sacarose e dulcitol.
- **Teste sorológico:** foi utilizado o antígeno polivalente de *Salmonella* para aglutinação em lâmina. Cada colônia suspeita, proveniente dos tubos de TSI e LIA, foi repicada para ágar nutriente inclinado. Após 24h de crescimento, a 35°C, todas as colônias da superfície foram homogeneizado em 0,5mL de salina estéril para obter uma suspensão espessa. Foram utilizadas duas gotas desta suspensão para cada gota do antígeno. Após homogeneização por 2min foi considerada positiva a amostra que apresentou aglutinação nítida.

3.13.2 Determinação da presença de *Salmonella* spp. em ostras por kit comercial

A partir de novembro de 2003 foi utilizado o kit REVEAL *Salmonella* Test System® (NEOGEN Corporation) para a determinação da presença de *Salmonella* spp. nas amostras de campo.

- **Pré-Enriquecimento:** a partir do homogenato de ostras (item 3.3.3), 25g de amostra foram homogeneizados com 200mL do meio de pré-enriquecimento REVIVE®. As amostras foram mantidas por 2h a 36°C ± 1°C.
- **Enriquecimento seletivo:** após o pré-enriquecimento, adicionou-se 200mL do caldo de enriquecimento seletivo Selenito de Cistina (SC) ao caldo de pré-enriquecimento, e as amostras foram mantidas por 24h a 42°C ± 1°C.
- **Dispositivo teste:** após o enriquecimento seletivo, gotejou-se cinco gotas das amostras nos dispositivos testes que detectam a presença de *Salmonella* spp., através de reações imunoenzimáticas (antígeno – anticorpo) e cromatográficas. Os resultados foram interpretados conforme orientações do fabricante.

3.14 Análise dos resultados.

Em todas as determinações, foram utilizadas cepas controles para assegurar as condições dos meios de cultura e reagentes. Os resultados das determinações de *Salmonella* spp. para carne de ostras foram interpretados conforme a Resolução da ANVISA, RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, para pescados e produtos de pesca (item 7a). As determinações dos níveis de coliformes a 45°C e totais em águas de cultivo foram interpretadas segundo o Art 8º da Resolução do CONAMA, nº 20, de 18 de junho de 1986.

4 Resultados

4.1 Titulação do HAV por imunofluorescência indireta.

O título viral foi determinado por imunofluorescência indireta. Após 7 dias de infecção em células FrhK-4, o título da suspensão-estoque do HAV foi de 1×10^9 FFU/mL. A Figura 5 mostra a fluorescência de células FrhK-4 infectadas com o HAV, ao microscópio ótico.

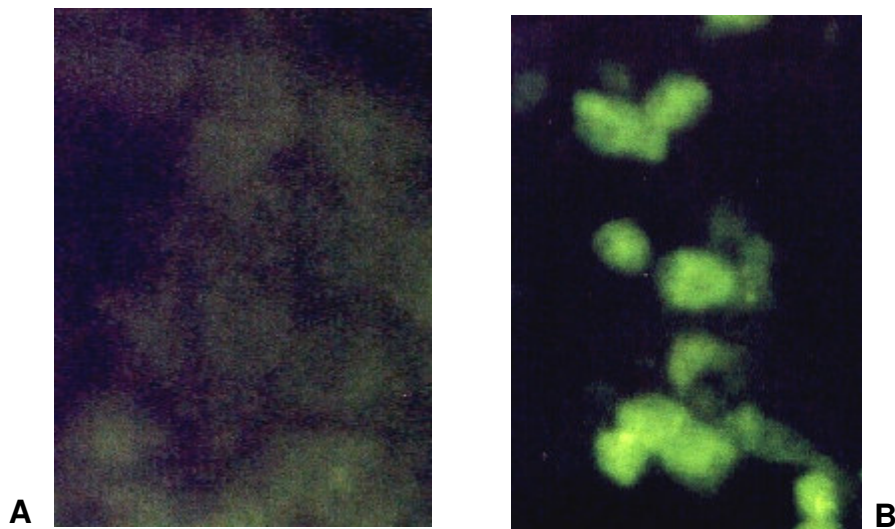


Figura 5 - Aspecto da fluorescência de células FrhK-4 infectadas com HAV. A - controle negativo; B - células após 7 dias de infecção (microscópio ótico de epifluorescência, aumento de 200x).

4.2 Extração de material genético a partir de fluido viral do HAV e quantificação do RNA total.

A eficácia da técnica de extração de RNA a partir de fluido viral foi avaliada pela concentração e pureza do RNA através de espectrofotometria. A concentração média de RNA purificado com Trizol LS[®] foi de $84,4 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$, apresentando um valor de 1,95 para a relação entre as absorvâncias de 260/280nm. As amostras não apresentaram traços de fenol (avaliadas em 320nm).

4.3 Reação de RT-PCR para detecção do HAV.

As condições da RT-PCR para HAV, descritas no item 3.6, destacando-se as concentrações de $MgCl_2$ (2,5mM) e de cada iniciador (30pmoles), permitiram uma amplificação específica do produto de 192pb utilizando como molde o RNA extraído a partir do fluido viral do HAV, purificado com o reagente Trizol LS[®] (Figura 6).

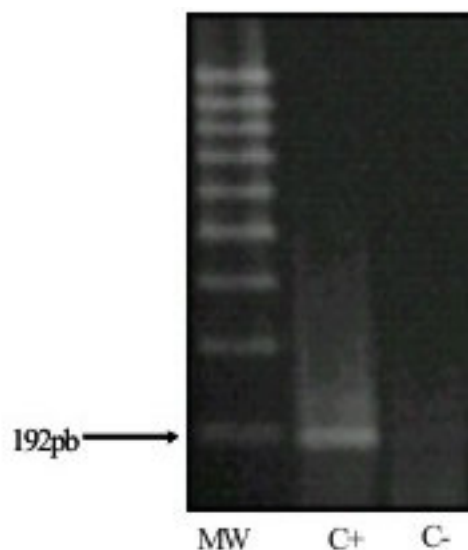


Figura 6 - Gel de agarose a 2% dos produtos da reação de RT-PCR para detecção de HAV a partir de RNA purificado de fluido viral. C+, produto obtido a partir de 420ng de RNA; C-, controle negativo da reação; MW, marcador de peso molecular 100p ladder

4.4 Hibridização molecular para detecção do HAV.

4.4.1 Produção da sonda de 192pb

4.4.1.1 Clonagem

Para a clonagem do fragmento de 192pb foi utilizado um kit comercial da Invitrogen: Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit for Sequencing. A metodologia foi descrita no item 3.7.1.

Foram analisadas, diretamente por PCR, 45 colônias das placas de ágar LB suplementadas com ampicilina. Dos 45 clones analisados, 23 apresentaram a banda de 192pb do inserto (Figura 7). Os clones positivos foram semeados em nova placa para manutenção e em caldo LB contendo 100µg/mL de

ampicilina para propagação. O DNA plasmidial extraído a partir desses clones foi novamente submetido à reação de PCR, e a positividade (presença do inserto) se manteve. A metodologia utilizada para clonagem do fragmento de 192pb foi bastante efetiva, resultando em 51% de positividade.

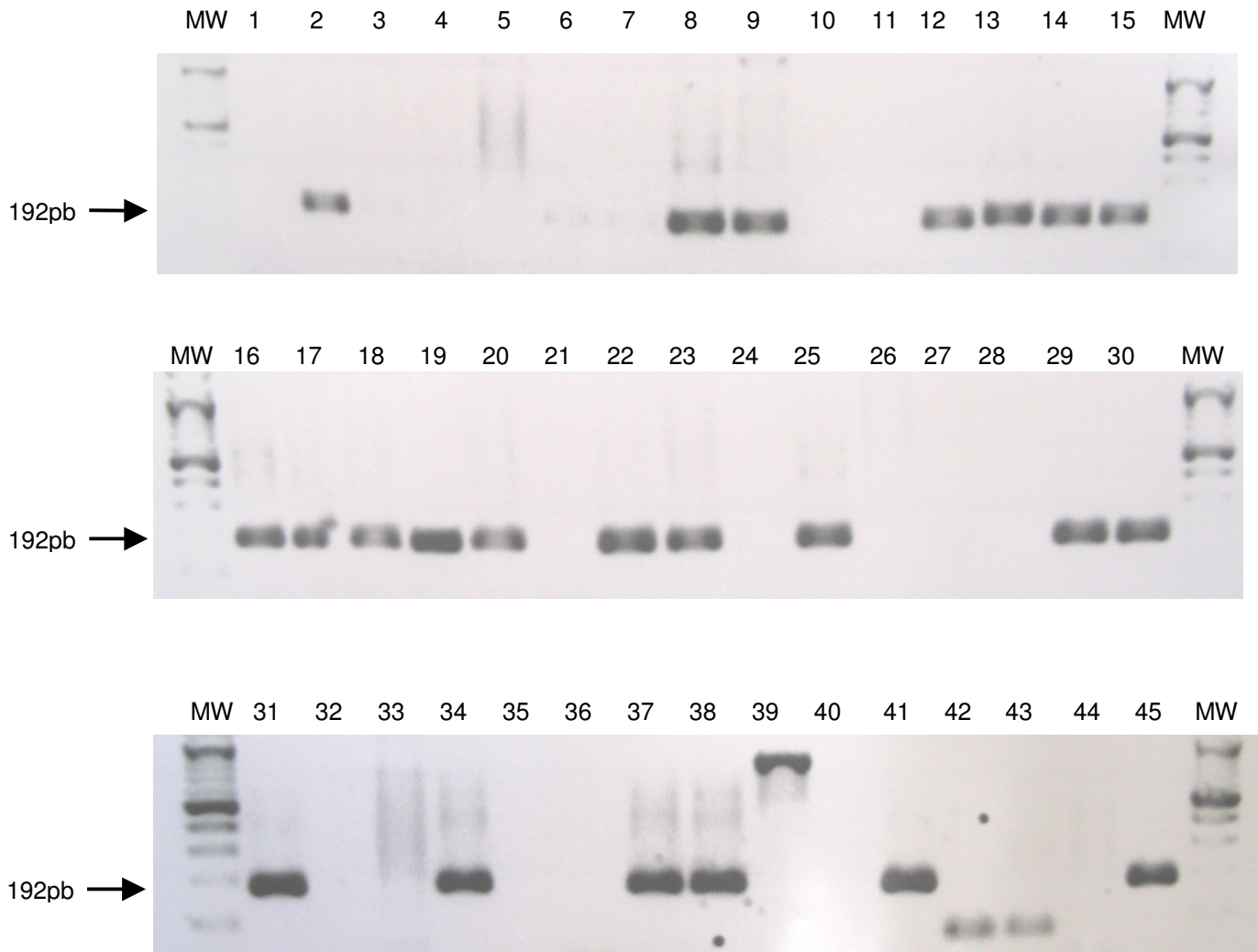


Figura 7 - Gel de agarose a 2% dos produtos da reação de PCR das colônias analisadas para a seleção dos clones.

4.4.1.2 Seqüenciamento

O DNA plasmidial extraído dos 23 clones positivos foram seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas no banco de dados BLASTn para análise de homologia.

Todas as 23 seqüências obtidas foram idênticas e apresentaram 192pb com 100% de homologia com a seqüência do HAV cepa HM-175 depositada no GenBank. A seqüência do inserto e os escores obtidos no BLAST estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultado da análise de seqüências obtidas no seqüenciamento

Seqüência	5' CAGCACATCAGAAAGGTGAGTACACTGCCATTGGGAAGCTTATTGTGT ATTGTTATAACAGATTGACCTCTCCTTCTAACGTTGCTTCCCATGTCAGA GTGAATGTTTATCTTTTCAGCAATTAAGTTGGAATGTTTTGCTCCTCTTTAT CATGCTATGGATGTTACTACACAAGTTGAGATGATTCTGGAG 3'
Escore obtido no BLASTn	Escore de 365 para seqüências do HAV ($e=10^{-98}$), e nenhum alinhamento significativo com o banco de dados de amostras ambientais

4.4.1.3 Marcação radioativa da sonda com ^{32}P

A marcação do fragmento de 192pb com ^{32}P foi efetiva como se pode observar na Figura 8. A aplicação da amostra na membrana e a hibridização molecular estão descritas, respectivamente, nos itens 3.7.3 e 3.7.4.

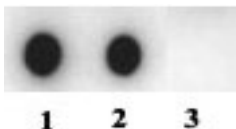


Figura 8 - Membrana de nylon mostrando a hibridização molecular do produto de 192pb com a sonda marcada com ^{32}P . 1 e 2, controle positivo; 3, controle negativo.

4.4.1.4 Marcação não radioativa da sonda com digoxigenina (DIG) pela reação de PCR

Primeiramente, foram avaliadas duas proporções de dTTP:dUTP-DIG a serem usadas nas marcações: 1:2 e 1:20. As duas proporções marcaram efetivamente o fragmento de 192pb por PCR. Isto pode ser verificado pela eletroforese da sonda marcada (Figura 9), a qual migra mais lentamente que o produto não marcado, e também através da revelação imunológica da sonda aplicada em membrana de nylon (Figura 10).

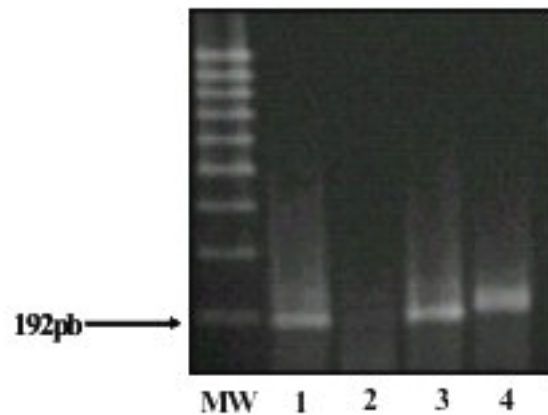


Figura 9 - Gel de agarose a 2% da sonda de 192pb marcada com digoxigenina por PCR na proporção de 1:2 e 1:20 de dUTP-DIG:dTTP. MW - marcador de peso molecular;1, Controle de produto não marcado;2, Controle negativo; 3, Sonda 1:20 dUTP-DIG : dTTP; 4, Sonda 1:2 dUTP-DIG : dTTP.

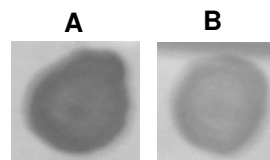


Figura 10 - Membrana de nylon mostrando a revelação imunológica da sonda de 192pb marcada com digoxigenina por PCR na proporção de 1:2 (A) e 1:20 (B) de dUTP-DIG:dTTP.

O fragmento de 192pb marcado com digoxigenina também foi efetivo na hibridização com produto não marcado, como pode ser observado na Figura 11.

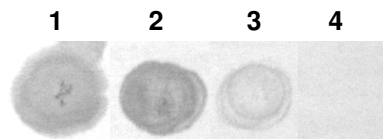


Figura 11 - Membrana de nylon mostrando a hibridização molecular do produto de 192pb não marcado com a sonda de 192pb marcada com digoxigenina. 1, 2 e 3, controle positivo nas diluições 1, 1:100, 1:1000 respectivamente; 4, controle negativo.

4.4.2 Produção da sonda de 22pb

O oligonucleotídeo interno à seqüência de 192pb marcado com digoxigenina foi efetivamente marcado como mostra a Figura 12. Porém não apresentou bons resultados na hibridização com produto não marcado de 192pb (Figura 13), sendo o sinal muito fraco ou inexistente.

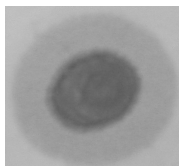


Figura 12 - Revelação imunológica da sonda de 22pb marcada com digoxigenina.

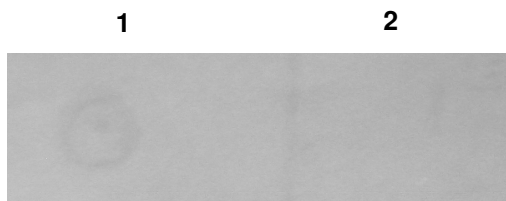


Figura 13 - Membrana de nylon mostrando a hibridização molecular do produto de 192pb não marcado com a sonda de 22pb marcada com digoxigenina. 1, controle positivo; 2, controle negativo.

Assim, a sonda de 192pb marcada com digoxigenina foi escolhida para utilização nos experimentos subseqüentes, tanto por apresentar forte sinal na hibridização quanto por se tratar de marcação não radioativa (factível nas condições do nosso laboratório).

4.5 Determinação do limite de sensibilidade da detecção do HAV, através da reação de RT-PCR e da hibridização molecular.

Foi avaliado o limite de sensibilidade da RT-PCR na detecção de HAV pela análise do RNA obtido de diluições seriadas no controle positivo (fluido viral). Nas condições experimentais descritas o limite de detecção foi de 0,1FFU/mL (Figura 14). Os produtos obtidos por RT-PCR foram transferidos para membrana de nylon tanto por Dot Blot como por Southern Blot e hibridizados com a sonda de 192pb marcada com digoxigenina. Neste caso o limite de detecção aumentou 2log passando para 0,001FFU/mL conforme mostra a figura 14 B e C respectivamente.

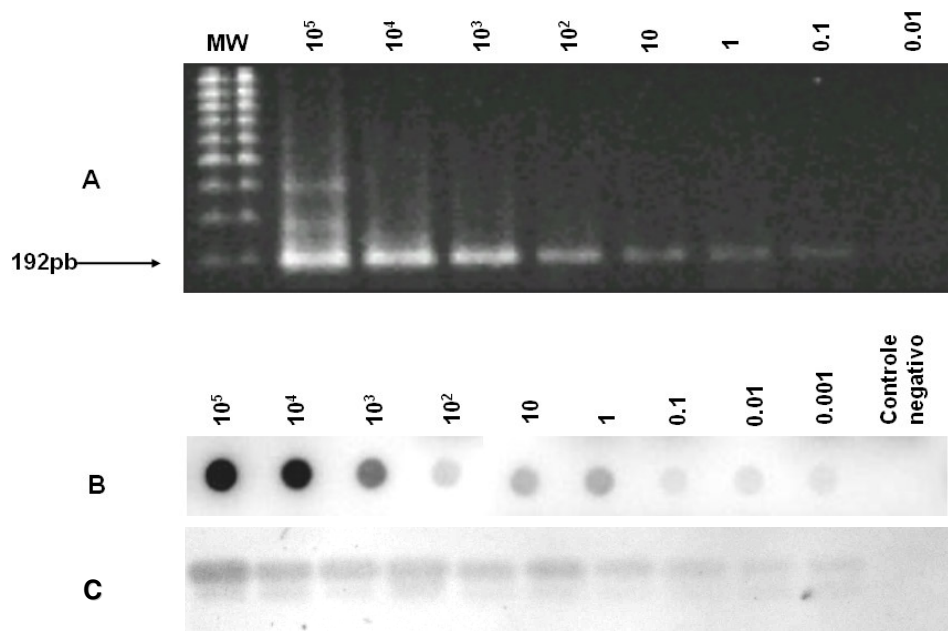


Figura 14 - Limite de detecção de HAV a partir de fluido viral. (A) RT-PCR (Gel de agarose a 2%); (B) Hibridização molecular dos produtos de PCR, aplicados por Dot Blot em membrana de nylon, com a sonda de 192pb marcada com digoxigenina; (C) Hibridização molecular dos produtos de PCR, transferidos por Southern Blot em membrana de nylon, com a sonda de 192pb marcada com digoxigenina. MW - 100 bp ladder (Biotools) (Valores expressos em FFU/mL).

4.6 Avaliação dos protocolos de processamento, extração e purificação de material genético a partir de tecido digestivo dissecado de ostras contaminadas artificialmente com HAV.

Foram avaliadas seis combinações de protocolos de recuperação viral e extração de RNA total a partir de tecido digestivo dissecado de ostras. A seleção da melhor combinação de protocolos foi realizada por RT-PCR. Foi selecionado o protocolo que apresentou maior intensidade de sinal tanto no controle semeado antes do processo (C+a) como no controle de 100% de recuperação viral semeado após o processo (C+d). Como mostra a figura 15 o protocolo melhor avaliado foi aquele denominado P3E2 (descrito no item 3.9). Este protocolo foi utilizado na extração e purificação de RNA para todos os experimentos subsequentes.

Os protocolos P1E2 e P2E1 também apresentaram resultados satisfatórios, porém pode-se observar na figura 15 alguns rastros e uma fraca banda inespecífica de maior peso molecular que o desejado, o que não foi observado em P3E2.

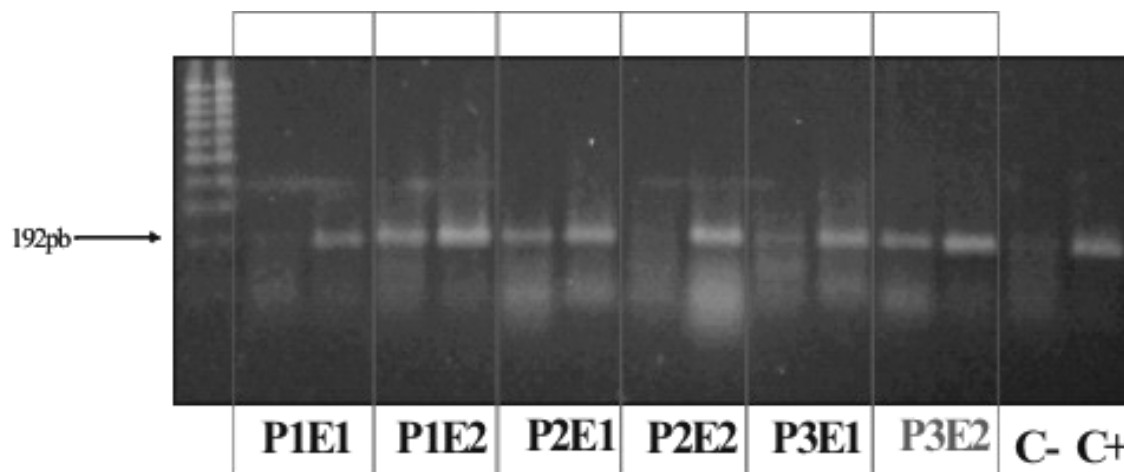


Figura 15: Gel de agarose a 2%, dos produtos da reação de RT-PCR obtidos a partir de tecido digestivo dissecado de ostras, utilizando-se diferentes protocolos de concentração viral e extração de RNA. C-, controle negativo da reação; C+, controle positivo da reação (RNA de fluido viral). O primeiro sinal de cada protocolo corresponde ao tecido de ostra inoculado com HAV antes do processamento e o segundo, após o processamento.

4.7 Determinação do limite de sensibilidade do protocolo escolhido (P3E2) para detecção de HAV em ostras, através da reação de RT-PCR e da hibridização molecular.

O limite de sensibilidade do protocolo P3E2 foi avaliado primeiramente através da inoculação direta de diluições crescentes de fluido viral de HAV em tecido digestivo dissecado de ostras. As amostras foram processadas conforme o protocolo P3E2 e analisadas por RT-PCR e hibridização molecular.

Os resultados foram iguais aos obtidos para o controle positivo: a RT-PCR foi capaz de detectar 0,1FFU/mL de HAV e a hibridização molecular dos produtos de PCR aumentou este limite para 0,001FFU/mL (Figura 16).

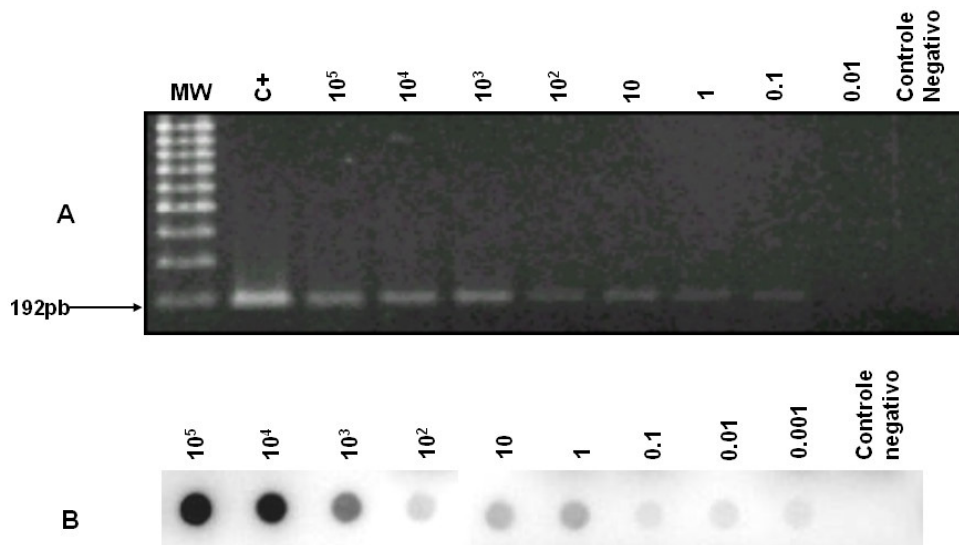


Figura 16 - Limite de detecção de HAV a partir de tecido digestivo dissecado de ostras processado conforme protocolo P3E2. (A) RT-PCR (gel de agarose a 2%); (B) Hibridização molecular dos produtos de PCR, aplicados por Dot Blot em membrana de nylon, com a sonda de 192pb marcada com digoxigenina; MW - 100 bp ladder (Biotools) (Valores expressos em FFU/mL).

4.8 Determinação do limite de sensibilidade do protocolo escolhido (P3E2) para determinação do HAV em ostras, através da reação de RT-PCR e da hibridização molecular.

A fim de mimetizar ao máximo as condições ambientais, o limite de sensibilidade do protocolo P3E2 também foi avaliado por bioacumulação viral em aquários contendo água do mar conforme descrito no item 3.10.2. Neste ensaio, ostras foram submetidas por 3h à bioacumulação do HAV semeado em água do mar. Foram avaliadas quatro diluições de HAV em triplicata: os resultados estão apresentados na Tabela 10. A reação de RT-PCR foi capaz de detectar 2/3 das amostras que bioacumularam 0,1 FFU/mL de HAV. Após a hibridização molecular este limite aumentou para 2/3 amostras que bioacumularam 0,01 FFU/mL.

Tabela 10 - Resultados da detecção de HAV em ostras contaminadas através de bioacumulação. Os resultados estão indicados como o número de réplicas com resultado positivo na RT-PCR e na hibridização molecular.

Concentração de HAV	RT-PCR	Hibridização
Controle Negativo	0/3	0/3
10 FFU/ml	2/3	3/3
1 FFU/ml	3/3	3/3
0.1 FFU/ml	2/3	2/3
0.01 FFU/ml	1/3	2/3

4.9 Avaliação da contaminação microbiológica das amostras de campo, coletadas entre dezembro de 2002 a julho de 2004.

4.9.1 Detecção do HAV

Após a padronização das metodologias para extração e purificação de RNA, RT-PCR e hibridização molecular, utilizando controle positivo purificado de HAV e tecido digestivo dissecado experimentalmente inoculado, foram analisadas amostras de ostras de cultivo, coletadas durante os meses de dezembro de 2002 a julho de 2004 em três fazendas do norte da Ilha de Santa Catarina. Os resultados da detecção de HAV nestas amostras estão apresentados na Tabela 11.

Quando a reação de RT-PCR foi aplicada, a porcentagem de amostras positivas para HAV foram 10,5%, 21,1% e 0% para os sítios 1, 2 e 3, respectivamente. Após a hibridização molecular, os índices de detecção aumentaram para 47,4%, 79,0% e 31,8%, respectivamente. Somente uma amostra positiva por RT-PCR (Sítio 1, abril de 2003) não foi confirmada como positiva pela hibridização molecular.

Tabela 11 - Resultados da detecção da presença do HAV por RT-PCR e hibridização molecular nas amostras de ostras coletadas entre dezembro de 2002 e julho de 2004 nos três locais de cultivo em Florianópolis.

Mês da coleta	Sítio 1		Sítio 2		Sítio 3	
	RT-PCR	Hibridização	RT-PCR	Hibridização	RT-PCR	Hibridização
Dez/02	-	+	-	+	-	-
Jan/03	-	+	-	+	-	-
Fev/03	+	+	+	+	-	-
Mar/03	-	+	-	+	-	-
Abr/03	+	-	+	+	-	-
Mai/03	-	+	-	+	-	-
Jun/03	-	+	-	+	-	-
Jul/03	-	-	-	+	-	-
Ago/03	-	+	-	+	-	+
Set/03	-	-	-	-	-	+
Nov/03	-	-	-	+	-	-
Dez/03	-	-	-	+	-	-
Jan/04	-	-	-	+	-	-
Fev/04	-	-	-	+	-	+
Mar/04	-	-	-	-	-	+
Abr/04	-	-	-	-	-	+
Mai/04	-	-	-	-	-	-
Jun/04	-	+	+	+	-	-
Jul/04	-	+	+	+	-	+
Total de positivos / nº total	2/19	9/19	4/19	15/19	0/19	6/19
Porcentagem de positivos	10,5%	47,4%	21,1%	79,0%	0,0%	31,6%

4.9.2 Determinação dos níveis de coliformes

Como descrito no item 3.12, de dezembro de 2002 a agosto de 2003 os resultados dos níveis de contaminação fecal das amostras de água foram expressos em NMP de coliformes a 45°C (nova denominação para coliformes fecais) em 100mL de água. A partir de novembro de 2003, com a alteração da metodologia, os resultados passaram a ser expressos em UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de *E. coli* em 100mL de água. A metodologia utilizada nas análises a partir de novembro de 2003 é mais sensível do que a utilizada

anteriormente; conseqüentemente, os resultados apresentaram um significativo aumento (Tabela 12).

Tabela 12 - Determinação dos níveis de coliformes a 45°C ou *E. coli* em amostras de água do mar coletadas entre dezembro de 2002 e julho de 2004.

Mês da Coleta	Condições climáticas	Sítio 1		Sítio 2		Sítio 3	
		CF NMP	CT NMP	CF NMP	CT NMP	CF NMP	CT NMP
Dez/02	Sol	43	43	120	120	7	7
Jan/03	Sol	13	13	2	2	21	21
Fev/03	Chuva	43	43	11	93	23	23
Mar/03	Sol	23	23	43	43	4	9
Abr/03	Sol	23	43	240	240	4	43
Mai/03	Sol	23	23	43	43	9	9
Jun/03	Sol	23	43	150	460	7	7
Jul/03	Sol	11	11	43	43	4	4
Ago/03	Chuva	9	23	23	23	4	4
Set/03	Sol	23	23	93	93	20	20
		<i>E. coli</i> UFC	CT UFC	<i>E. coli</i> UFC	CT UFC	<i>E. coli</i> UFC	CT UFC
Nov/03	Chuva	1500	1800	300	400	200	200
	Sol (muita chuva na semana da coleta)	100		1000		100	
Dez/03			1300		1800		200
Jan/04	Sol	200	4400	2200	6000	0	2600
Fev/04	Sol	500	4400	100	2000	0	1900
Mar/04	Sol	200	2200	300	5400	100	600
Abr/04	Sol	200	1800	300	800	0	600
Mai/04	Sol	100	2000	100	1700	0	1000
Jun/04	Sol	300	3000	200	1200	0	700
Jul/04	Sol	100	2000	100	1500	0	800

CF NMP = Coliformes a 45°C NMP/100mL de água; CT NMP = Coliformes totais NMP/100mL de água; *E. coli* UFC = *E. coli* UFC/100mL de água; CT UFC = Coliformes totais UFC/100mL de água.

4.9.3 Determinação da presença de *Salmonella* spp

A presença de *Salmonella* spp foi detectada em junho de 2003 no sítio 1 e em novembro de 2003 no sítio 2. A amostra de junho de 2003 do sítio 1 foi analisada pela metodologia clássica de enriquecimento seletivo e testes bioquímicos, enquanto que a amostra de novembro de 2003 do sítio 2 foi avaliada pelo kit REVEAL[®].

5 Discussão

5.1 Titulação do HAV por imunofluorescência indireta.

Por ser o HAV um vírus de difícil adaptação ao cultivo *in vitro*, as técnicas disponíveis para determinação do título infeccioso viral são escassas e nem sempre apresentam bons resultados.

A metodologia mais comum relatada na literatura para titulação do HAV é a de formação de placas de lise. Esta técnica, empregada para vírus líticos, como o poliovírus (DULBECCO; VOGT, 1954), foi aplicada ao HAV por Cromeans et al (1987), a partir do isolamento de um variante citopático do HAV em células FrhK-4. Esta variante possuía replicação rápida e máximo de produção viral em dois dias, características necessárias à formação das placas de lise. Porém, como pode-se constatar na prática laboratorial, a técnica e algumas de suas variações (ZHANG; CHAO; PING et al., 1995; MULLENDORE; SOBSEY; SHIEH, 2001) não apresentaram bons resultados.

Outra técnica simples, e bastante utilizada para qualquer vírus que possua efeito citopático (ECP), é o método das diluições limite (REED; MUENCH, 1938), cujos resultados são expressos em TCID₅₀/mL. O título é determinado por leitura visual e calculado a partir da recíproca da maior diluição em que seja possível a observação do ECP viral. Os resultados também não são muito satisfatórios para o HAV, devido ao longo tempo de incubação necessário (7 dias). Após este tempo, é muito difícil diferenciar as células danificadas pelo efeito citopático viral daquelas danificadas pelo tempo de incubação, sendo o resultado final muito subjetivo e aproximado.

Recentemente, um ensaio imunoenzimático *in situ* foi desenvolvido para uma cepa do HAV, isolada de pacientes do Rio de Janeiro. O ensaio utiliza um anticorpo policlonal ligado à peroxidase como um indicador de infecção (VILLAR; AMADO; GASPAR, 2004), e é uma alternativa ao ensaio de radioimunofoco (MILLARD; APPLETON; PARRY, 1987), sendo mais rápido, simples e seguro por não requerer radioisótopos.

Finalmente, mas pouco utilizada devido ao alto custo dos anticorpos, a imunofluorescência indireta é uma alternativa mais específica na determinação do título viral do HAV. No presente trabalho, utilizou-se como primeiro anticorpo, o anticorpo monoclonal anti HAV Mab 8241 (Chemicon) e, como segundo anticorpo, um anti igG de camundongo conjugado a FITC. O ensaio de titulação foi realizado com sucesso apesar da fluorescência celular não ser muito intensa. As células positivas infectadas apresentaram fluorescência citoplasmática granular característica e núcleo não fluorescente (DAEMER; FEINSTONE; GUST et al., 1981; BINN; LEMON; MARCHWICKI et al., 1984). Observou-se também uma leve fluorescência de fundo que auxiliou na contagem das células realmente fluorescentes.

5.2 Extração de material genético a partir de fluido viral de HAV e quantificação do RNA total.

5.3 Reação de RT-PCR para detecção do HAV.

A reação de RT-PCR descrita neste trabalho foi eficiente na amplificação de um produto de 192pb, tanto a partir de RNA isolado de fluido viral, quanto a partir de RNA isolado de trato gastrointestinal de ostras dissecadas.

As condições da RT-PCR para HAV aqui descritas foram previamente padronizadas por Coelho (2001) para RNA isolado de fluido viral e de extratos tissulares de ostras inteiras.

A escolha dos iniciadores é fundamental para garantir a especificidade e a sensibilidade da amplificação gênica (COELHO, 2001; ROMALDE; RIBAO; LUZ VILARINO et al., 2004). Os iniciadores utilizados flanqueiam uma região altamente conservada do genoma viral e são amplamente utilizados na literatura (TSAI; TRAN; SANGERMANO et al., 1994; SCHWAB; DE LEON; SOBSEY, 1995; CHUNG; JAYKUS; SOBSEY, 1996; SAIR; D'SOUZA; MOE et al., 2002; COELHO; HEINERT; SIMOES et al., 2003).

Outro fator determinante no sucesso desta reação foi a concentração do $MgCl_2$. A influência dos íons magnésio ocorre em diversas etapas da reação, tais como o anelamento dos iniciadores, a especificidade dos produtos, a temperatura de dissociação das fitas, a formação de dímeros de iniciadores, e a atividade e a especificidade das enzimas que requerem cátions divalentes (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A curva da concentração ideal de $MgCl_2$, previamente definida, demonstrou que para a RT-PCR de RNA purificado (controle positivo do HAV) foram necessários 2,5mM de $MgCl_2$, enquanto que para extratos de ostras foram necessários 3,0mM. Neste trabalho, o mesmo protocolo foi aplicado para RNA isolado de ostras dissecadas, exceto pela concentração de $MgCl_2$ que foi reduzida para 2,5mM (a mesma utilizada para RNA do controle positivo). Isto pode ser devido ao fato de que a dissecação das ostras foi eficiente na remoção de inibidores da RT-PCR, tais como proteínas, carboidratos e outros compostos orgânicos presentes na carne das ostras.

Resultados falsos positivos são uma preocupação constante quando da utilização de técnicas de amplificação gênica. Com o objetivo de minimizar a possibilidade de ocorrência desse fato, todas as etapas da RT-PCR e da hibridização molecular foram controladas. Além disso, em todos os ensaios foram incluídos controles negativos e positivos para avaliação da qualidade dos reagentes.

5.4 Hibridização molecular para a detecção do HAV.

A clonagem e o seqüenciamento do vírus da hepatite A (COHEN; TICEHURST; FEINSTONE et al., 1987) e de outros enterovírus trouxe novas possibilidades no desenvolvimento de metodologias sensíveis para a detecção viral. Principalmente em se tratando de vírus não cultiváveis (como os norovírus) ou de difícil adaptação ao cultivo *in vitro* (como é o caso do HAV), técnicas como a RT-PCR, a hibridização molecular e todas as suas variantes foram fundamentais na detecção destes patógenos nas mais diversas amostras.

Em amostras ambientais, a hibridização molecular foi aplicada na detecção de HAV, rotavírus e outros enterovírus, antes mesmo da RT-PCR (ZHOU; ESTES; JIANG et al., 1991; LE GUYADER; APAIRE-MARCHAIS; BRILLET et al., 1993; VANCUYCKGANDRE; GRATIER; BURCKHART et al., 1994). Entretanto, a técnica se mostrava pouco sensível, sendo necessário, em algumas amostras, milhões de partículas virais para uma reação positiva (ZHOU; ESTES; JIANG et al., 1991; KOGAWA; NAKATA; UKAE et al., 1996).

Com a padronização da PCR para detecção viral, a hibridização molecular passou a ser utilizada como teste confirmatório da mesma (LE GUYADER; HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000; LEGGITT; JAYKUS, 2000; LE GUYADER; NEILL; DUBOIS et al., 2003). Esta estratégia contorna os principais problemas de ambas as técnicas quando se trata de amostras ambientais: a susceptibilidade a inibidores da PCR e a baixa sensibilidade da hibridização molecular quando aplicada diretamente. A amplificação inicial da seqüência alvo por PCR tornou a hibridização muito mais eficaz, e por não envolver reações enzimáticas, foi muito menos susceptível à ação de inibidores presentes nas amostras.

Nesta abordagem, sondas freqüentemente utilizadas nas reações de hibridização são oligonucleotídeos (marcados radioativamente ou não) complementares a uma seqüência interna àquela amplificada por PCR. A utilização da mesma seqüência do produto de PCR como sonda e utilizado em hibridizações com os próprios produtos de PCR ainda não foi descrita na detecção de vírus em moluscos. O emprego do próprio produto de PCR como sonda apresentou algumas vantagens como menor custo na marcação (já que a mesma pode ser feita por PCR utilizando-se os mesmos reagentes) e maior sensibilidade de detecção (já que são duas fitas complementares à seqüência alvo). As desvantagens referentes a dúvidas quanto à completa homologia com o vírus a ser detectado podem ser contornadas pelo seqüenciamento da sonda.

O presente trabalho teve como um dos seus objetivos a padronização da hibridização molecular como teste confirmatório da RT-PCR, buscando assim, maior sensibilidade na detecção de HAV e maior confiabilidade nos resultados. Na escolha da sonda foram avaliadas duas seqüências: uma de 192pb

(clonada e seqüenciada a partir do produto de PCR obtido com os iniciadores aqui descritos) e outra de 22pb interna à seqüência de 192pb amplificada por PCR.

Para a clonagem do fragmento de 192pb foi utilizado o kit comercial da Invitrogen: Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR *Cloning Kit for Sequencing*. Este kit utiliza uma estratégia de clonagem de alta eficiência e rapidez pela inserção direta do produto de PCR desejado em um vetor plasmidial para seqüenciamento. O plasmídeo, pCR[®] 4Blunt-TOPO[®], é linearizado com a topoisomerase I do vírus da vaccínia covalentemente ligada a extremidade 3' do vetor (chamado vetor ativado). A topoisomerase I liga-se ao DNA dupla fita em sítios específicos e cliva a ligação fosfodiéster após 5'-CCCTT, em uma das fitas. A energia liberada da quebra da ligação fosfodiéster é conservada para a formação de uma ligação covalente entre o fosfato 3' da fita clivada e um resíduo de tirosina (Tyr-274) da topoisomerase I. A ligação fosfotirosil entre o DNA e a enzima pode, subseqüentemente, ser atacada pela extremidade 5'hidroxila da fita originalmente clivada, revertendo a reação e liberando a enzima (INVITROGEN, 2001).

O seqüenciamento foi realizado utilizando-se os iniciadores universais M13 diretamente do DNA plasmidial purificado. O grau de homologia encontrado no banco de dados BLASTn com a seqüência do HAV obtida neste trabalho não deixou dúvida quanto à identidade da sonda e à eficácia da estratégia de clonagem utilizada.

A marcação não radioativa de sondas com digoxigenina (DIG) por PCR foi inicialmente utilizada para marcação de sondas destinadas à hibridização de DNA genômico, mas devido a algumas vantagens como baixo custo e alta sensibilidade (JUNG; CHAE, 2005) esta metodologia foi adotada no presente trabalho.

Amplificações inespecíficas de DNA ocorrem particularmente quando mais do que 30 ciclos de amplificação são usados. O DNA não especificamente amplificado pode ocasionalmente migrar em uma região similar àquela esperada para o amplicom vírus-específico. Se isso acontecer, o produto não específico pode ser interpretado como positivo para a seqüência viral

investigada, se somente a eletroforese for utilizada para análise dos produtos de PCR. A hibridização molecular é a técnica mais simples para interpretar e confirmar os resultados da RT-PCR (ATMAR; ESTES, 2001). As técnicas mais comuns incluem a hibridização em *dot blot* ou *slot blot* e em *Southern blot* (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A hibridização molecular requer que as condições de reação sejam adaptadas ao tamanho e à seqüência da sonda. O estabelecimento de condições ótimas requer o conhecimento do T_m da sonda. Em termos estruturais, o T_m pode ser definido como a temperatura na qual 50% dos pares de bases em uma dupla fita estão desnaturados (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). É uma função direta da composição das bases, composição da solução de hibridização e do tamanho da dupla fita. Há várias regras e equações disponíveis na literatura para se estimar o T_m de uma sonda. Porém, os valores encontrados são apenas de referência, pois as temperaturas de hibridização devem ser padronizadas empiricamente para a otimização dos resultados. Em geral, a hibridização molecular é realizada em temperaturas de 5-10°C abaixo do valor do T_m (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Devido às grandes diferenças no tamanho das sondas (22pb e 192pb) diferentes estratégias tiveram de ser utilizadas para a determinação das condições ideais de hibridização molecular.

Para a sonda de 22pb, a equação proposta para seqüências curtas (com 15 a 20 nucleotídeos) e soluções de alta força iônica (1M NaCl ou 6xSSC) foi utilizada como ponto de partida: $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$. De acordo com esta equação, o T_m calculado para a sonda de 22pb foi 56°C, e a hibridização inicialmente foi realizada a 50°C. Como os resultados obtidos com a utilização desta sonda foram negativos, outras condições foram posteriormente testadas: redução da temperatura de hibridização, redução da estringência das lavagens e maior tempo de hibridização. Porém, os sinais obtidos continuaram muito fracos ou ausentes. Acredita-se que outros fatores desconhecidos influenciaram estes resultados, já que se trata de uma seqüência amplamente utilizada na literatura. A principal diferença está na utilização de kits de marcação. Enquanto os autores que utilizam esta sonda sempre citam um kit

comercial de marcação (ROMALDE; TORRADO; RIBAO et al., 2001), o presente trabalho utilizou os mesmos reagentes, porém comprados separadamente a fim de reduzir os custos.

Com relação à sonda de 192pb, a mesma temperatura de hibridização encontrada para a sonda de 22pb foi inicialmente utilizada para facilitar operacionalmente o trabalho. Entretanto, reações inespecíficas foram muito freqüentes na temperatura de 50°C. Por este motivo, outras temperaturas e condições de estringência foram avaliadas, chegando-se a uma temperatura ótima de 65°C.

5.5 Avaliação dos protocolos de processamento, extração e purificação de material genético a partir de tecido digestivo dissecado de ostras contaminadas artificialmente com HAV.

Na década de 90, foram realizados muitos estudos para padronização da reação de RT-PCR para a detecção de vírus entéricos em moluscos semeados em laboratório (ATMAR; METCALF; NEILL et al., 1993; GOSWAMI; KOCH; CEBULA, 1993; JAYKUS; DELEON; SOBSEY, 1993; LE GUYADER; DUBOIS; MENARD et al., 1994; LEES; HENSHILWOOD; DORE, 1994; JAYKUS; DELEON; SOBSEY, 1995, 1996; CROMEANS; NAINAN; MARGOLIS, 1997). Estes trabalhos geralmente mostravam que a abordagem é viável, mas também que a carne dos moluscos é inibitória desta reação. A partir daí, as pesquisas se concentraram no refinamento dos protocolos de recuperação viral, extração e purificação de ácidos nucleicos para contornar este problema de inibição. Em trabalhos anteriores do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (SANTOS; RIGOTTO; SIMOES et al., 2001; VINATEA, 2002; COELHO; HEINERT; SIMOES et al., 2003; RIGOTTO; SINCERO; SIMOES et al., 2005), esta preocupação se concentrava nas etapas de purificação do RNA viral com detergentes catiônicos e enzimas proteolíticas. Outras tentativas com este mesmo objetivo foram realizadas por ATMAR et al. (1995) e SCHWAB et al. (1998), que determinaram a concentração de inibidores, encontrados em diferentes partes dissecadas de ostras inoculadas

experimentalmente ou contaminadas no ambiente com vírus entéricos. Esses autores encontraram maior concentração de inibidores no músculo adutor, seguido do trato gastrointestinal e hemolinfa. Segundo Dubois et al.(2004); LE GUYADER et al. (2000), SCHWAB et al. (2001), as análises baseadas em tecidos dissecados oferecem outra vantagem, além da redução significativa da concentração de inibidores: os resultados obtidos são mais representativos da contaminação global dos moluscos, já que 10g de tecido dissecado representam aproximadamente 12 ostras. Além disso, a hibridização *in situ* demonstrou que o HAV foi detectado, principalmente, no trato gastrointestinal das ostras (estômago e hepatopâncreas) (ROMALDE; ESTES; SZUCS et al., 1994). Por estas razões, todas as ostras utilizadas no trabalho foram dissecadas antes de qualquer ensaio.

O desenvolvimento de protocolos eficientes para extração de vírus entéricos a partir de tecidos de moluscos e a posterior concentração dos mesmos em um volume pequeno de amostra são etapas importantes na padronização das metodologias de detecção viral, sejam elas moleculares, como a reação de PCR, ou convencionais, como a cultura de vírus em células (LEES, 2000). Estes protocolos são divididos em duas categorias: extração-concentração e adsorção-eluição-concentração (BOUCHRITI; GOYAL, 1993; LEES, 2000).

Geralmente, nos métodos de extração-concentração, normalmente a extração viral é realizada diretamente a partir dos tecidos do molusco com éter etílico, clorofórmio ou Freon[®] e os procedimentos de concentração constam de precipitação ácida e/ou floculação polieletrólítica com Cat-Floc (BOUCHRITI; GOYAL, 1993; ATMAR; NEILL; ROMALDE et al., 1995; LEES, 2000; DUBOIS; MERLE; ROQUIER et al., 2004).

No presente trabalho, as ostras inoculadas com o HAV foram processadas por três protocolos, baseados no método de adsorção-eluição-precipitação, visando extrair as partículas virais dos tecidos dos moluscos e concentrar as amostras em volumes menores. Os protocolos avaliados baseiam-se no princípio de que os vírus (que são partículas polares e de alto peso molecular) podem ser separados dos sólidos presentes nos extratos

tissulares dos moluscos quando as concentrações salinas e o pH são controlados (SOBSEY; CARRICK; JENSEN, 1978; WYN-JONES; SELLWOOD, 2001).

O primeiro protocolo (P1) era utilizado no Laboratório para processamento das amostras de ostras não dissecadas (COELHO; HEINERT; SIMOES et al., 2003; RIGOTTO; SINCERO; SIMOES et al., 2005). A eluição alcalina direta em tampão glicina (pH 9 a 10) e a posterior precipitação das partículas virais com polietilenoglicol (PEG) é rápida e comumente utilizada por vários pesquisadores (KINGSLEY; MEADE; RICHARDS, 2002; MUNIAIN-MUJICA; GIRONES; TOFINO-QUESADA et al., 2002; DI PINTO; CONVERSANO; FORTE et al., 2004; SUNEN; CASAS; MORENO et al., 2004).

A escolha do meio de eluição das partículas virais a partir dos tecidos dos moluscos deve ser feita com cuidado. Outros tampões são citados na literatura, porém a eluição em glicina pH 10 apresenta os melhores resultados quando comparada à eluição em tampão borato pH 9,5, glicina pH 7,5 ou Tween 80 (MUNIAIN-MUJICA; GIRONES; LUCENA, 2000).

Outro fator que deve ser analisado nos métodos de eluição-precipitação é o peso molecular do PEG. Este influi diretamente na eficácia da recuperação viral, podendo aumentar em até 30% o número de partículas virais recuperadas (LEWIS; METCALF, 1988; TRAORE; ARNAL; MIGNOTTE et al., 1998). Para o HAV, o PEG 6000 apresentou os melhores resultados (LEWIS; METCALF, 1988; COELHO, 2001), sendo utilizado no presente trabalho para precipitação das partículas virais

O protocolo P2 propõe algumas modificações no que foi originalmente descrito por Atmar (1995) e modificado por Le Guyader (2000). A metodologia descrita por esses autores é baseada na extração-precipitação das partículas virais, e propõe uma clarificação inicial dos extratos tissulares com reagentes orgânicos e a precipitação das partículas virais com uma maior concentração de PEG. Em P2 optou-se pela utilização do triclorotrifluoroetano (Freon[®]) como agente clarificante anterior à precipitação com PEG. Este procedimento auxiliou na redução da quantidade de matéria orgânica presente nos tecidos dos moluscos. Porém, este protocolo não apresenta uma etapa inicial de eluição

das partículas virais da matéria orgânica, o que pode levar a perdas significativas na recuperação viral. Sendo assim, com o objetivo de unir as vantagens da eluição alcalina, da clarificação com solvente orgânico e da maior concentração de PEG foi elaborado o protocolo P3.

As amostras originadas de cada um dos três protocolos testados foram avaliadas por dois processos de extração e purificação do material genético. O principal objetivo de todas as etapas de cada protocolo é a remoção eficiente de inibidores das amostras.

Visando remover os inibidores das reações de PCR a partir dos concentrados, inúmeras técnicas de complexidade variável estão disponíveis para a extração dos ácidos nucleicos, desde a simples fervura da amostra, até métodos mais elaborados envolvendo lise celular em tampão salino na presença de detergentes e enzimas proteolíticas, seguidas por extração orgânica (ARNAL; FERRE-AUBINEAU; BESSE et al., 1999). Atualmente, as estratégias de extração e purificação de ácidos nucleicos em amostras ambientais se baseiam na utilização de metodologias mais sofisticadas e, conseqüentemente, mais dispendiosas, como captura com oligo dT em colunas de celulose, kits comerciais otimizados e a imunocaptura magnética (KINGSLEY; RICHARDS, 2001; DI PINTO; FORTE; TANTILLO et al., 2003; RIBAO; TORRADO; VILARINO et al., 2004; SUNEN; CASAS; MORENO et al., 2004).

No presente trabalho, duas metodologias para extração e purificação de ácidos nucleicos foram utilizadas (Tabela 14): a metodologia (E1) proposta por Le Guyader et al. (2000), utilizando fenol-clorofórmio e dupla precipitação, e a metodologia (E2) utilizando o reagente TRIZOL[®]. Ambas incluem a desproteinização enzimática da amostra como passo inicial e a purificação do material genético com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) em diferentes etapas.

Os extratos tissulares de ostras obtidos após a precipitação com PEG foram submetidos à digestão com a enzima proteinase K, a fim de degradar as proteínas da amostra, e à purificação com cetiltrimetilamônio (CTAB), que é um detergente catiônico utilizado na precipitação seletiva dos ácidos nucleicos e

eliminação de polissacarídeos das amostras (ARNAL; FERRE-AUBINEAU; BESSE et al., 1999; SHIEH; CALCI; BARIC, 1999; LEES, 2000).

De acordo com a força iônica da solução, o CTAB pode ser utilizado com diferentes finalidades. Em soluções de alta força iônica, o CTAB forma complexos com proteínas e polissacarídeos, mas não precipita ácidos nucléicos (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O complexo CTAB / proteínas / polissacarídeos pode ser removido da solução por extração com solventes orgânicos. Esta estratégia foi utilizada na purificação dos ácidos nucléicos do protocolo E2.

Já em soluções de baixa força iônica, como aquela utilizada no protocolo E1, os ácidos nucléicos são precipitados e as proteínas e polissacarídeos permanecem em solução. Após recuperação por centrifugação, os ácidos nucléicos são dissolvidos em solução de alta força iônica e precipitados com etanol (MANFIOLETTI; SCHNEIDER, 1988; SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

O protocolo E1 utiliza fenol-clorofórmio na extração, e por este motivo, ao final do procedimento é obtido DNA/RNA total presente na amostra. Por outro lado, a extração com Trizol LS[®] permite a recuperação seletiva de RNA na fase aquosa. Na prática, o protocolo E1 foi muito trabalhoso e com resultados poucos reprodutíveis devido à precipitação do CTAB juntamente com os ácidos nucléicos.

Conforme apresentado nos resultados, a combinação que apresentou os melhores resultados por RT-PCR foi a denominada P3E2 (descrita no item 3.9). O sinal obtido na reação, com esta combinação de protocolos, além de mais intensa, não apresentou bandas inespecíficas na eletroforese em gel de agarose. As combinações, P1E2 e P2E1, também apresentaram intensidade do sinal satisfatória, porém, pôde-se observar na figura 15, rastros e uma fraca banda inespecífica de maior peso molecular que o desejado, o que não foi observado em P3E2. Estes resultados podem ser corroborados analisando-se duas etapas determinantes na remoção de inibidores presentes no tecido digestivo das ostras, e na purificação do material genético. A primeira é a clarificação prévia com Freon[®] (P2 e P3); e a segunda, a utilização do reagente Trizol LS[®] na purificação do RNA. Como observado, as combinações de

protocolos com os melhores resultados, contêm pelo menos uma destas duas etapas. Sendo assim, o protocolo P3E2 foi utilizado nos ensaios de limite de sensibilidade de detecção e nas amostras de campo.

5.6 Análise comparativa entre os limites de detecção do HAV, obtidos com fluido viral e com o trato gastrointestinal de ostras.

Alta sensibilidade e especificidade são características almejadas no desenvolvimento de qualquer metodologia de detecção de microrganismos. Diferentemente do que é bastante encontrado em amostras clínicas, no ambiente os patógenos encontram-se muito dispersos (ATMAR; ESTES, 2001). Por este motivo, as metodologias destinadas à detecção viral em amostras ambientais devem apresentar a mais alta sensibilidade possível. Além disso, as doses infectantes dos vírus costumam ser baixas, 10 a 100 partículas virais para o HAV e para norovírus (BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004), reforçando ainda mais a necessidade de altos índices de sensibilidade nas técnicas de detecção. Entretanto, a busca por técnicas altamente sensíveis prejudica a especificidade das mesmas, sendo necessária a utilização de técnicas confirmatórias como a hibridização molecular ou o sequenciamento dos produtos amplificados por RT-PCR.

No presente trabalho, foi avaliado o limite de detecção da RT-PCR, antes e após a hibridização molecular, a partir de RNA obtido de fluido viral e do trato gastrointestinal (TGI) de ostras. O objetivo desta comparação foi avaliar se o protocolo selecionado (P3E2) de concentração, extração e purificação de material genético foi eficiente na eliminação de inibidores das reações enzimáticas.

Os valores encontrados para a detecção de HAV a partir de fluido viral (controle positivo) foram os mesmos encontrados para TGI de ostras (diretamente inoculados) antes e após a hibridização molecular (0,1 e 0,001FFU/mL ou mg de tecido dissecado, respectivamente). Além de demonstrar a eficiente remoção de inibidores pelo protocolo P3E2, estes índices demonstram que a hibridização molecular dos produtos de PCR foi

capaz de incrementar o limite de detecção em de 2log quando comparado com a RT-PCR sozinha. Estes resultados figuram entre os melhores índices de sensibilidade citados na literatura (Tabela 15), corroborando o fato da amplificação do sinal promovida pela hibridização molecular (JUNG; CHAE, 2005).

Apesar das várias diferenças entre as metodologias, tipo de amostra e entre as unidades de concentração viral expressas nos resultados, vários trabalhos podem ser analisados comparativamente no que diz respeito ao limite de detecção viral. Conforme apresentado na Tabela 10 observa-se um aumento progressivo do limite de detecção do HAV com a evolução das técnicas durante os anos. Os melhores índices são obtidos por trabalhos que utilizam kits comerciais, tanto para extração do material genético quanto para otimizar a reação de RT-PCR (SAIR; D'SOUZA; MOE et al., 2002; RIBAO; TORRADO; VILARINO et al., 2004; SUNEN; CASAS; MORENO et al., 2004).

Em trabalho realizado no LVA, Coelho et al (2003), utilizando ostras não dissecadas e processadas conforme protocolo P1, detectaram, por RT-PCR, 3,5 PFU do HAV por volume de reação. As principais diferenças que contribuíram para o aumento do limite de detecção obtido foram a dissecação das amostras, a clarificação inicial com Freon[®], a extração com Trizol LS[®] e a hibridização molecular.

A contaminação dos moluscos por sementeira do patógeno na água do mar em aquários, estimulando a bioacumulação, já foi utilizada anteriormente, com o objetivo de mimetizar o que ocorre no ambiente e, conseqüentemente, obter uma avaliação mais confiável da técnica de detecção do vírus em estudo, quando aplicada em amostras naturalmente contaminadas (CROMEANS; NAINAN; MARGOLIS, 1997; VINATEA, 2002). Com esta finalidade, os limites de sensibilidade da RT-PCR e da hibridização molecular foram determinados a partir de ostras submetidas à bioacumulação de diferentes concentrações do HAV adsorvido em uma suspensão de microalgas.

O tempo de bioacumulação de 3h foi selecionado, com base no volume de água do aquário (10L) e na taxa de filtração dos moluscos, que pode chegar a 8L/hora (WARD, 1996). O tempo só começou a ser contado a partir do

momento em que as ostras se abriram e iniciaram o processo de filtração (após aproximadamente 15 min). As microalgas adicionadas como alimento estimularam a alimentação por filtração e permitiram o monitoramento visual do processo com a clarificação progressiva do aquário.

Os resultados dos ensaios de bioacumulação foram analisados como o número de amostras positivas de três experimentos. Pela reação de RT-PCR, 2/3 dos experimentos foram positivos para a concentração de 0,1FFU/mL e somente 1/3 para a concentração de 0,01FFU/mL de água do mar. Estes resultados são coerentes com o observado para a sementeira com o controle positivo e para ostras diretamente infectadas (limite de detecção do HAV de 0,1FFU/mL, para ambos), mostrando a eficiência da bioacumulação e do processo de recuperação viral utilizado. A hibridização molecular confirmou como positivos 2/3 dos experimentos na concentração de 0,01FFU/mL.

Tabela 15 - Tabela comparativa das técnicas utilizadas e dos limites de sensibilidade na detecção do HAV de vários trabalhos publicados

Referência	Amostra	Recuperação viral	Extração de ácidos nucleicos	Deteção	Alvo dos iniciadores	Sensibilidade
(ATMAR; NEILL; ROMALDE et al., 1995)	1,5g de ostras e mariscos dissecados	PEG 6000	Proteinase K / fenol-clorofórmio	RT-PCR e hibridização	VP1, 248pb	70PFU/g
(REYNOLDS; GERBA; ABBASZADEGAN et al., 2001)	Ostras	ND	ND	ICC-PCR	ND	1MPN, após 96h
(SAIR; D'SOUZA; MOE et al., 2002)	6g de hambúrguer	Glicina pH 9 / freon / 2x PEG 8000	QIAamp™ Viral RNA Mini Kit + QIAshredder™	RT-PCR de um passo (MasterAmp 2X PCR Premix A)	VP1-VP3, 192pb	1,5PFU/g
(DI PINTO; FORTE; TANTILLO et al., 2003)	Ostras	ND	Oligo dT	RT-PCR	ND	0,024PFU/g
(COELHO; HEINERT; SIMOES et al., 2003)	20g de ostras	Glicina pH 9 / PEG 6000	Proteinase K / fenol-clorofórmio	RT-PCR	VP1-VP3, 192pb	3,5PFU/reação
(SUNEN; CASAS; MORENO et al., 2004)	25g de mariscos	Glicina pH 7,5/ treonina/ 2x PEG 6000/ clorofórmio	Nucleospin R RNA virus extraction kit + imunocaptura magnética	RT-nested PCR	VP1-VP3, 192pb	6NMP/g
(RIBAO; TORRADO; VILARINO et al., 2004)	1g de mexilhões dissecados	ND	Total Quick RNA Cells & Tissues	RT-PCR (Superscript™ One-Step RT-PCR System)	VP1, 248pb	0,1 a 1PFU/g

ND=não descrito / PFU=unidades formadoras de placas / FFU=unidades formadoras de fluorescência

5.7 Avaliação da contaminação microbiológica das amostras de campo, coletadas entre dezembro de 2002 a julho de 2004.

5.7.1 Detecção do HAV

A técnicas de RT-PCR e hibridização molecular para detecção do HAV, empregadas neste trabalho, foram aplicadas para acessar a contaminação viral em três locais de cultivo de ostras de Florianópolis, por um período de 19 meses. Durante as análises, foram incluídos controles positivos, utilizando-se uma das amostras coletadas e semeando-as com fluido viral do HAV. Este procedimento é importante porque o tipo e a concentração de inibidores enzimáticos presentes na carne do molusco podem diferir de acordo com a estação do ano e a localização geográfica em que foi realizada a coleta (HURST; KNUDSEN; MCINERNEY et al., 1997).

As porcentagens de amostras positivas por RT-PCR foi 10,5% e 21,1% para os sítios 1 e 2, respectivamente. Nenhuma amostra do sítio 3 foi considerada positiva por RT-PCR. Após a hibridização molecular dos produtos de PCR a positividade das amostras aumentou para 47,4%, 70% e 31,6%, respectivamente, para os sítios 1, 2 e 3. Estes resultados refletiram o aumento de sensibilidade proporcionado pela hibridização molecular como teste confirmatório da RT-PCR, mas também revelaram um alto grau de contaminação das ostras consumidas em Florianópolis. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Coelho et al. (2003), que encontraram 22% de positividade em amostras coletadas no ano de 2002 na Grande Florianópolis por RT-PCR.

Um fator importante a ser considerado na análise destes resultados é a validade dos mesmos para a saúde pública. Se de um lado, as técnicas moleculares não são capazes de diferenciar entre partículas viáveis e não viáveis, de outro estas mesmas técnicas são as únicas disponíveis para detecção do HAV com a sensibilidade exigida para amostras ambientais.

Tem sido difícil estabelecer uma relação confiável entre a presença do genoma viral (como detectado por RT-PCR) e da partícula infecciosa viral (como detectado por cultura celular). A reação de PCR amplifica ácidos nucléicos que poderiam estar presentes em partículas virais viáveis, danificadas ou não infecciosas. Recentemente, Bhattacharya et al. (2004) demonstraram que a detecção de HAV por RT-PCR se correlaciona positivamente com a presença de partículas infecciosas. Amostras contaminadas com HAV, que foram inativadas pelo calor ou por radiação UV, produziram um sinal significativamente menos intenso do que aqueles obtidos a partir de amostras contaminadas com vírus viáveis. Por outro lado, Arnal et al. (1998) testaram a estabilidade do HAV em água do mar artificial estéril por RT-PCR e por cultura celular. O genoma do HAV foi detectado por RT-PCR durante um período de 232 dias, enquanto que partículas infecciosas foram detectadas por cultura celular por apenas 35 dias, sugerindo que a detecção do genoma do HAV por RT-PCR não é um indicador confiável da presença de partículas viáveis.

Entretanto, não está claro se esta questão seria importante no caso da detecção de vírus em amostras ambientais, especialmente em moluscos. Todos os vírus entéricos de maior impacto na saúde pública possuem genoma RNA, o qual é inerentemente muito susceptível à degradação por ribonucleases celulares. Portanto, é pouco provável que um genoma RNA que não esteja protegido por um capsídeo, permaneça intacto por longos períodos em um meio rico em ribonucleases, como são os casos do trato digestivo dos moluscos e de efluentes (LEES, 2000).

Além disso, têm sido demonstradas a estabilidade e a viabilidade do HAV de outros vírus entéricos, por longos períodos, em vários ambientes aquosos (BIZIAGOS; PASSAGOT; CRANCE et al., 1988; ABAD; PINTO; BOSCH, 1994; CRANCE; GANTZER; SCHWARTZBROD et al., 1998), e, também, em tecidos de ostras (SANTOS; RIGOTTO; SIMOES et al., 2002; KINGSLEY; RICHARDS, 2003; HEWITT; GREENING, 2004). Estudos prévios no LVA demonstraram que os rotavírus, os adenovírus e os poliovírus não são inativados em ostras e permanecem viáveis, mesmo após a preparação de

extratos tissulares com tampões de pH alcalino, homogeneização de tecidos e sonicação (SANTOS; RIGOTTO; SIMOES et al., 2002; VINATEA, 2002; RIGOTTO; SINCERO; SIMOES et al., 2005).

Mais estudos ainda são necessários a fim de se estabelecer uma relação entre a determinação do nível de contaminação viral detectado por PCR nos moluscos e sua potencial infectividade após o consumo. Vários pontos podem ser analisados, mas entre eles, a dose infectante do HAV e a imunidade da população afetada são os mais diretamente relacionados. Para o HAV, estima-se uma dose infectante de 10 a 100 partículas virais (BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004), mas a imunidade da população varia de acordo com o caráter endêmico do vírus e com as condições de saneamento e educação. Nos países em desenvolvimento (áreas endêmicas da doença), a exposição, infecção e imunidade são quase universais na infância. A hepatite A em adultos é muito rara nesses países. Em países desenvolvidos, melhorias no sistema de tratamento de esgotos e nos hábitos de higiene têm reduzido a frequência da infecção entre as crianças, conseqüentemente, muitos adultos jovens não apresentam imunidade contra o HAV e estão susceptíveis à infecção. Porém, 40% das pessoas nascidas antes de 1970 nesses países foram expostas e são imunes ao HAV (STEINKE; WESTON; MORRIS et al., 2002; KHUROO, 2003).

Os moluscos bivalves têm sido freqüentemente associados a surtos de hepatite A (TANG; WANG; XU et al., 1991; CONATY; BIRD; BELL et al., 2000; SANCHEZ; PINTO; VANACLOCHA et al., 2002; FURUTA; AKIYAMA; KATO et al., 2003); porém, devido ao tempo de incubação da doença ser de quatro a seis semanas, a relação causa-efeito é mais difícil de ser estabelecida (POTASMAN; PAZ; ODEH, 2002). Por isso, é necessária uma análise de risco, que inclua o monitoramento constante da presença de vírus entéricos nas ostras cultivadas e vendidas à população, com o objetivo de prevenir surtos de hepatite A e outras doenças veiculadas por moluscos.

5.7.2 Determinação dos níveis de coliformes

A bactéria *Escherichia coli* é um indicador de contaminação fecal de origem humana, de outros mamíferos e aves, enquanto os coliformes totais podem ser provenientes, também, de outros animais bem como do solo e da própria decomposição vegetal (NEILL, 2004). Os níveis de *E. coli* (ou de coliformes fecais) somente significam que há um risco de outros patógenos intestinais estarem presentes; portanto, baixos níveis destes indicadores não garantem a ausência do patógeno em questão (LEE; YOUNGER, 2002).

A determinação dos níveis de coliformes fecais foi realizada nas amostras de águas de cultivo, inicialmente através da técnica dos tubos múltiplos e, a partir de novembro de 2003, através do kit Petrifilm® (3M).

A determinação do NMP de coliformes fecais, através da técnica dos tubos múltiplos, baseia-se na capacidade dos coliformes fecais se replicarem a 45°C, enquanto que os coliformes totais não se multiplicam nesta temperatura (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 1992).

A placa Petrifilm® para contagem de *E. coli* e coliformes é um sistema comercial de meio de cultura que contém os nutrientes do ágar vermelho-violeta bile (VRBA), um agente gelificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glicuronidásica (5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-glicuronídeo) e um indicador de tetrazólio para facilitar a enumeração das colônias (3M, 2001).

A alteração da metodologia empregada resultou em diferenças significativas nos valores encontrados devido à extrapolação dos resultados obtidos com 1mL de água nas placas de Petrifilm® para 100mL de água. Neste caso, uma única colônia representa 100 UFC/100mL de água. Por este motivo, além da diferença na unidade (NMP e UFC), e no indicador expresso (coliformes fecais e *E. coli*), os resultados das duas metodologias não puderam ser comparados diretamente entre eles. Entretanto, o padrão de contaminação fecal se manteve entre os locais analisados, mesmo com a troca dos métodos. Comparando-se os valores das amostras entre si (Tabela 16), podem ser identificados três níveis de contaminação fecal: alta (sítio 2), média (sítio 1) e baixa (sítio 3), de acordo com o número de coliformes a 45°C ou de *E. coli*. Mesmo com a proximidade geográfica dos três locais, a contaminação fecal

refletiu a maior ou menor proximidade dos cultivos com a costa e as saídas de esgoto clandestino, muito comuns na região (Diário Catarinense, 29/06/1999).

Tabela 16 - Médias dos valores de contaminação fecal encontrada nos três locais analisados, utilizando-se duas metodologias diferentes.

	Média dos valores		
	Sítio 1	Sítio 2	Sítio 3
Tubos Múltiplos (NMP de coliformes fecais/100mL de água)	23,4	76,8	10,3
Petrifilm® (UFC de E.coli/100mL de água)	355,6	511,1	44,4
Nível de contaminação relativo	Médio	Alto	Baixo
% de amostras > 14NMP de coliformes a 45° C/100mL	70%	80%	30%
% de amostras > 43NMP de coliformes a 45° C/100mL	0%	40%	0%

Entretanto, se as amostras fossem avaliadas de acordo com o preconizado pela legislação brasileira vigente para águas de cultivo de animais que serão ingeridos crus (CONAMA, 1986), quando os níveis de coliformes fecais não devem exceder 14NMP/100mL de água, com não mais de 10% das amostras acima de 43NMP/100mL, todos os locais deveriam ser considerados impróprios para o cultivo. Contudo, os resultados obtidos pela técnica do Petrifilm® não são ainda aceitos pela atual legislação. Com isso, o sítio 1 e o sítio 3 poderiam ser classificados como próprios para o cultivo de moluscos, apesar dos níveis de contaminação encontrados.

O único critério que utiliza os níveis de coliformes totais na classificação das áreas de cultivo é o proposto pelo Codex Alimentarius (CODEX, 2004), como segue:

- **Área proibida:** Número mais provável (NMP) de coliformes acima de 700/ 100 mL de água - é proibida a criação, extração ou estocagem de moluscos bivalves;

- **Área limitada:** Número mais provável (NMP) de coliformes entre 70 e 700/ 100mL de água - é permitida a criação, extração ou estocagem de moluscos bivalves, sendo indispensável o tratamento destes através de depuração;

- **Área livre:** Número mais provável (NMP) de coliformes inferior a 70/100mL de água - é permitida a criação, extração ou estocagem de moluscos bivalves.

De acordo com estes critérios, e, ainda excluindo os valores após novembro de 2003, os sítios 1 e 3 poderiam ser classificados como área livre para o cultivo e o sítio 2 como área restrita, sendo necessária a depuração em 50% das amostras (níveis acima de 70NMP/100mL).

A depuração não é uma prática entre os maricultores de Florianópolis. Além de não contar com a estrutura necessária para tal, os mesmos afirmam que durante o período de depuração os animais ovulam, perdem peso e, conseqüentemente, valor de mercado.

A depuração é uma estratégia desenvolvida para o controle do risco de intoxicações e gastroenterites de origem bacteriana ou viral, decorrentes do consumo de moluscos bivalves. Nesta técnica, os mesmos são colocados em tanques apropriados, onde realizam o processo de filtração (próprio do seu hábito alimentar) em água do mar limpa. Acredita-se que vários fatores são importantes na obtenção de uma depuração eficiente. Entre esses estão o desenho do tanque, a salinidade, a temperatura, a oxigenação, a taxa de renovação, a qualidade inicial de água, a capacidade de depuração do molusco (que é diferente para cada tipo de patógeno) e o tempo de purificação (LEE; YOUNGER, 2002).

Entretanto, as taxas de eliminação de bactérias e vírus são diferentes. Enquanto 90% das bactérias são eliminadas num período de 24h a 48h (DORE; LEES, 1995; MUNIAIN-MUJICA; GIRONES; TOFINO-QUESADA et al., 2002), as partículas virais podem levar mais de quatro semanas para que isto ocorra (KINGSLEY; RICHARDS, 2003). De Médici (DE MEDICI; CROCI; DI PASQUALE et al., 2001) desenvolveu uma sofisticada técnica de depuração, incluindo banhos de água desinfetada por ozônio e UV e controle de temperatura e salinidade. Após 48h de depuração, houve uma redução de mais de 3logs na carga viral, mas após 120h de depuração, uma quantidade residual de partículas viáveis ainda foi detectada por ICC-PCR. Estes resultados

mostram que a depuração, mesmo em condições bastante controladas, pode não garantir a eliminação de vírus nos moluscos.

5.7.3 Determinação da presença de *Salmonella* spp

As metodologias clássicas para detecção de *Salmonella* spp baseiam-se no enriquecimento seletivo da amostra, no plaqueamento em meios de cultivo seletivos e em uma bateria de testes bioquímicos. Os resultados obtidos são confiáveis, porém todo o processo é muito trabalhoso e demorado. Visando facilitar operacionalmente a detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de ostras no laboratório, foi adotado, a partir de novembro de 2003, o kit microbiológico REVEAL Salmonella Test System[®] da NEOGEN. Porém, todos os resultados positivos eram confirmados por testes bioquímicos.

Este kit baseia-se na detecção imunoenzimática dos antígenos bacterianos (ensaio imunocromático de corrida lateral). O dispositivo REVEAL contém anticorpos adsorvidos em sua matriz, com alta especificidade para antígenos de *Salmonella*. Esses anticorpos estão ligados a ouro coloidal e, separadamente, a um suporte sólido. Qualquer antígeno de *Salmonella* presente na amostra se ligará ao anticorpo conjugado presente no colóide, formando um complexo antígeno-anticorpo colorido. Esse complexo migra através da membrana e é, subseqüentemente, reconhecido por um anticorpo imobilizado na membrana. Isto leva o complexo antígeno-anticorpo-ouro a precipitar, formando uma linha rosa visível, que indica o resultado positivo, conforme exemplificado na Figura 17.

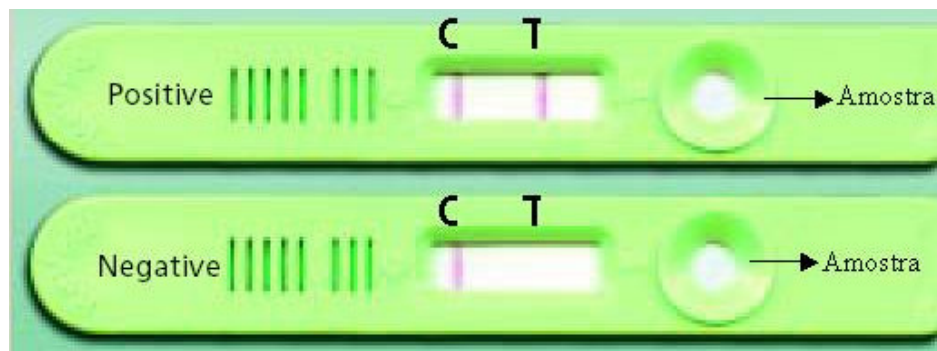


Figura 17: Visualização de resultados de detecção de contaminação por *Salmonella* spp. através do dispositivo REVEAL. Fonte: (NEOGEN, 2004)

Somente duas amostras foram positivas para *Salmonella* spp., cada qual com uma das metodologias de detecção utilizadas. Estes resultados demonstraram que, ao contrário do que ocorreu com a determinação de coliformes, a alteração de metodologias na determinação de *Salmonella* spp. não aumentou o número de amostras positivas.

Segundo a legislação brasileira vigente (ANVISA, 2001), que determina a ausência de *Salmonella* spp. em produtos de pesca, as amostras dos meses de junho e novembro de 2003, respectivamente, para os sítios 1 e 2, não estavam aptas para o consumo.

5.8 Influência da contaminação bacteriana e de fatores ambientais na presença do HAV no trato gastrointestinal de ostras de cultivo.

Santa Catarina é o maior produtor brasileiro de ostras e mexilhões, porém, ainda são restritos, em área e em volume de amostras, os estudos sobre a contaminação viral dos moluscos cultivados no Estado (VINATEA, 2002; COELHO; HEINERT; SIMOES et al., 2003; RIGOTTO; SINCERO; SIMOES et al., 2005).

A média de amostras positivas encontradas neste estudo (50%) é maior do que o encontrado em países desenvolvidos como França (15%) (LE GUYADER; HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000) e os EUA (15%) (CHUNG; JAYKUS; SOBSEY, 1996). Isto pode ser reflexo de uma rede de saneamento básico pouco eficiente, em conjunto com a endemicidade do HAV no Brasil, onde a soroprevalência é de 50% entre adultos jovens de 31 a 40 anos (TANAKA, 2000).

Os resultados obtidos no presente trabalho são difíceis de interpretar e o período de tempo analisado foi curto (19 meses) para permitir uma clara demonstração de sazonalidade ou uma relação entre os indicadores fecais e a presença do HAV.

De fato, um dos objetivos secundários deste trabalho foi avaliar a viabilidade de um monitoramento mensal da contaminação viral em moluscos. Muitos fatores ambientais (chuvas, temperatura, eficiência do tratamento de

esgoto, esgotos clandestinos, etc) e/ou populacionais (circulação viral endêmica ou epidêmica) ajudariam na interpretação dos dados.

O nível de chuvas, a radiação UV, a direção do vento, as marés e a temperatura (reflexo das estações do ano) podem influenciar diferentemente os níveis de coliformes e de vírus presentes no ambiente marinho. O índice pluviométrico e a temperatura são os dois fatores que mais influenciam a contaminação dos moluscos (CRANCE; GANTZER; SCHWARTZBROD et al., 1998; LEWIS; MOLLOY; GREENING et al., 2000; MIOSSEC; LE GUYADER; HAUGARREAU et al., 2000; TANAKA, 2000; HERNROTH; CONDEN-HANSSON; REHNSTAM-HOLM et al., 2002), sendo que o primeiro influi diretamente na dispersão das partículas e o segundo na sobrevivência dos vírus no ambiente.

Em períodos de chuvas intensas, ocorre uma maior contaminação fecal das águas de cultivo devido ao maior fluxo de efluentes despejados no mar (HERNROTH; CONDEN-HANSSON; REHNSTAM-HOLM et al., 2002). De fato, isto pode ser observado em janeiro de 2004, quando fortes chuvas antecederam à coleta. Os altos níveis de coliformes neste mês não foi mais observado, durante todo o período de análises, mesmo com tempo chuvoso. Entretanto, o comportamento oposto também pode ser esperado, pois, se de um lado as chuvas favorecem a dispersão do esgoto aumentando a contaminação fecal (MIOSSEC; LE GUYADER; HAUGARREAU et al., 2000), de outro, diminuem a salinidade e, conseqüentemente, a taxa de filtração das ostras (YOUNGER; LEE; LEES, 2003). Este fato pode levar a valores de contaminação fecal baixos, mesmo com chuvas intensas.

Uma bactéria fecal pode não sobreviver tanto tempo no ambiente quanto vírus e cistos de protozoários (GABUTTI; DE DONNO; BAGORDO et al., 2000). Portanto outros microrganismos patogênicos podem estar presentes no ambiente, mesmo quando as concentrações dos indicadores bacterianos estiverem baixas (LEE; YOUNGER, 2002). Por isso, há um consenso de que baixos índices de coliformes fecais não garantem a ausência de vírus, protozoários e outras enterobactérias (GABUTTI; DE DONNO; BAGORDO et al., 2000; LEE; YOUNGER, 2002), já que, conforme demonstrado, o tempo

necessário para reduzir em 90% a contaminação em águas salinas varia de acordo com o microrganismo. Os coliformes fecais são mais rapidamente eliminados do que outros patógenos, como por exemplo, *Salmonella* spp. Para reduzir em 90% (T90) a quantidade de coliformes fecais em águas salinas são necessárias 48-72h e para *Salmonella* spp., 56-80h (GABUTTI; DE DONNO; BAGORDO et al., 2000). Para partículas virais, o T90 parece ser bem maior e depende em grande parte da temperatura. Crance et al. (1998) determinou a variação do título infeccioso do HAV em água do mar artificialmente contaminada mantida a diferentes temperaturas; os resultados mostraram que o T90 foi de 11 dias a 25°C e 24 dias a 19°C, e o título infeccioso permaneceu estável a 4°C durante os 92 dias do experimento.

Estes dados que mostram a maior resistência dos vírus em água do mar em relação às bactérias indicadoras poderiam explicar a grande prevalência do HAV nas amostras analisadas, já que os resultados aqui apresentados não mostraram qualquer relação entre os níveis de contaminação fecal e a presença do HAV.

Romalde et al. (2002) e Le Guyader et al. (2000), mostraram a correlação existente entre a presença de indicadores bacterianos e de vírus entéricos somente em locais que são altamente afetados por atividades humanas, principalmente descarte de efluentes, enquanto que em outros locais levemente poluídos ou somente ocasionalmente contaminados, tal correlação raramente ocorre.

Como esperado, os dados obtidos no presente trabalho mostram que, dentro de cada sítio analisado, a densidade de população humana mostrou clara influência no nível de contaminação das amostras. Em geral, os locais mais poluídos são os mais próximos da costa, pois se presume que os locais limpos estejam localizados em áreas menos populosas e mais afastados das saídas de esgoto pluvial.

Os resultados mostraram um nível elevado de contaminação das ostras cultivadas em Florianópolis pelo HAV. No Brasil não se têm dados relacionando os casos de hepatite A e outras gastroenterites virais com o consumo de moluscos. Porém, em países como França e Espanha (grandes produtores

mundiais de moluscos bivalves) a ocorrência de tais patologias está relatada e parece ser maior no inverno (LE GUYADER; HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000; FORMIGA-CRUZ; TOFINO-QUESADA; BOFILL-MAS et al., 2002).

Há, pelo menos dois fatores responsáveis pela sazonalidade das gastroenterites associadas ao consumo de moluscos. Primeiro, o patógeno viral deve estar presente na população. A prevalência de vírus entéricos nos efluentes flutua sazonalmente, com maiores níveis ocorrendo no inverno e menores no verão (SIMKOVA; CERVENKA, 1981). Segundo, os patógenos virais devem sobreviver em ambiente estuarino por um período longo o suficiente para afetar a área de produção de moluscos, sendo que a sobrevivência viral em águas de estuário é modulada pela temperatura e exposição à luz solar (LO; GILBERT; HETRICK, 1976; GRANCE; GANTZER; SCHWARTZBROD et al., 1998; BURKHARDT; CALCI; WATKINS et al., 2000). A ocorrência de doenças relacionadas ao consumo de moluscos corresponde, geralmente, a períodos nos quais a temperatura da água e a intensidade da radiação solar são ou estão próximas de seus mais baixos níveis. Burkhardt e Calci (2000) sugerem um terceiro fator influenciando a sazonalidade destas doenças: a capacidade dos moluscos em bioacumular seletivamente partículas virais, como demonstrado pela maior acumulação de colifagos F⁺ em relação a *E. coli*. Moluscos acumulam preferencialmente microrganismos durante períodos de baixas temperaturas nas águas (entre 11,5 e 21,5°C), quando a taxa de filtração é maior, o qual resulta em uma alta incidência de gastroenterites virais humanas, adquiridas através do consumo de moluscos durante estes períodos (GRIFFIN; DONALDSON; PAUL et al., 2003). Este aspecto de acumulação seletiva pode ser atribuído ao mecanismo pelo qual os moluscos se alimentam. A acumulação de vírus pelos moluscos durante a alimentação é devido, em parte, à ligação iônica das partículas virais aos mucopolissacarídeos presentes no muco produzido pelos moluscos. O nível de muco produzido, por sua vez, corresponde geralmente ao conteúdo de glicogênio do tecido conectivo e gonadal em desenvolvimento. Mais estudos são necessários para determinar se há uma correlação entre a concentração de glicogênio, a qual é maior no período do inverno, e o período de ocorrência

da doença (BURKHARDT; CALCI, 2000; BEURET; BAUMGARTNER; SCHLUEP, 2003). Esta acumulação preferencial de microrganismos pelos moluscos, associada com a maior sobrevivência das partículas virais a baixas temperaturas e à circulação dos vírus na população, poderiam explicar a sazonalidade das doenças virais associadas ao consumo de moluscos (GRIFFIN; DONALDSON; PAUL et al., 2003).

São poucos os dados nacionais sobre a sazonalidade da infecção por HAV. Em estudo realizado no Rio de Janeiro (VILLAR; DE PAULA; GASPAR, 2002), observou-se que a infecção pelo HAV ocorre o ano todo; porém, uma variação sazonal foi notada com maior incidência na primavera e no verão, e pico nos meses mais chuvosos (dezembro a março). A eliminação de vírus nas fezes ocorre duas semanas antes dos sintomas clínicos e pode se prolongar até cinco meses, após a infecção (KOOPMANS; VON BONSDORFF; VINJE et al., 2002). Isto significa que a população infectada no verão estaria excretando vírus nas fezes no inverno, favorecendo a contaminação de águas e, conseqüentemente, dos moluscos durante todo esse período.

Apesar de ainda serem necessárias melhorias nas técnicas moleculares (tal como a quantificação viral através do PCR em tempo real) e, uma maior compreensão do significado epidemiológico da contaminação viral em amostras ambientais, os métodos atuais permitem a detecção rápida e sensível de vírus no ambiente. Por isso, os dados aqui apresentados poderão ser úteis no estabelecimento de um programa de segurança alimentar, visando a comercialização de ostras com qualidade sanitária assegurada para o consumo.

6 Conclusões

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A RT-PCR foi eficiente na detecção do HAV, tanto nos controles positivos como no trato gastrointestinal de ostras inoculadas;
 - Foi possível a padronização de um protocolo ideal de processamento, extração e purificação de material genético viral a partir de tecido digestivo dissecado de ostras que resultou em melhores resultados na detecção do HAV por RT-PCR (0,1FFU/mL);
 - A hibridização molecular se mostrou eficiente como teste confirmatório da RT-PCR para detecção do HAV, em fluido viral, e em tecido digestivo dissecado de ostras, aumentando o limite de detecção viral para 0,001FFU/mL;
 - A presença do HAV foi detectada em 10,5% das amostras de campo, coletadas entre Dezembro de 2002 a Julho de 2004 e analisadas por RT-PCR; Após a hibridização molecular a positividade aumentou para 52,6%;
 - Os resultados das análises bacteriológicas para coliformes indicaram três níveis de contaminação dos locais de cultivo: alto (sítio 2), médio (sítio 1) e baixo (sítio 3), podendo refletir a contaminação dos cultivos com esgotos clandestinos, no entanto, a presença do HAV não se correlacionou com os níveis de coliformes analisados nas amostras de águas;
-

7 Perspectivas

Apesar de todo o progresso alcançado na pesquisa de um método de detecção viral ideal, alguns problemas permanecem. Apesar da maioria dos ensaios moleculares serem sensíveis, específicos, rápidos e com adequado custo-benefício, não há um consenso na utilização de um método padronizado. O uso de anticorpos e seqüências genéticas para captura viral surge como uma promessa para o isolamento de partículas virais a partir do material particulado inibitório encontrado nas amostras ambientais. O uso de Chips genéticos, com sua teórica capacidade de detectar genomas virais individuais e simultaneamente detectar vários tipos de vírus, poderá ser útil nos ensaios de monitoramento ambiental, quando combinado com protocolos de captura do alvo, cultura celular e PCR.

Em um futuro não tão distante, pode ser que o clima e as condições marítimas sejam usados em modelos para prever o risco para a saúde humana dos ambientes marinhos. Como os estudos já realizados têm mostrado, o índice pluviométrico, a salinidade e a temperatura da água podem se correlacionar com a ocorrência e a infectividade virais.

A atual limitação para o desenvolvimento acurado de um modelo de avaliação de riscos para a saúde pública é a falta de estudos integrados, os quais caracterizariam fatores, tais como tipo de solo, sistema de descarte de esgoto tratado, densidade populacional e influência do clima com a ocorrência de patógenos e de microrganismos indicadores. Muitas ferramentas já estão disponíveis para conduzir estes tipos de estudos e possibilitariam uma avaliação global da poluição viral, nos mais diversos ambientes e amostras.

Com estes objetivos em mente e como forma de aprofundamento dos resultados aqui encontrados, seria interessante correlacionar a presença do HAV no ambiente com a incidência da doença na população. Assim como verificar a homologia das seqüências encontradas de HAV no meio ambiente com àquelas encontradas na população através do seqüenciamento dos produtos da amplificação gênica.

REFERÊNCIAS

3m. **Placa para Contagem de E. coli e Coliformes. Manual de Instruções.** St. Paul: Microbiology Products. 2001

Abad, F. X.; R. M. Pinto; A. Bosch. Survival of enteric viruses on environmental fomites. **Appl Environ Microbiol**, v.60, n.10, Oct, p.3704-10. 1994.

Abbaszadegan, M.; M. S. Huber; C. P. Gerba; I. L. Pepper. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. **Appl Environ Microbiol**, v.59, n.5, May, p.1318-24. 1993.

Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. **Ministério da Saúde** 2001.

Apaire-Marchais, V.; B. H. Robertson; V. Aubineau-Ferre; M. G. Le Roux; F. Leveque; L. Schwartzbrod; S. Billaudel. Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. **Appl Environ Microbiol**, v.61, n.11, Nov, p.3977-80. 1995.

Arnal, C.; J. M. Crance; C. Gantzer; L. Schwartzbrod; R. Deloince; S. Billaudel. Persistence of infectious hepatitis A virus and its genome in artificial seawater. **Zentralbl Hyg Umweltmed**, v.201, n.3, Sep, p.279-84. 1998.

Arnal, C.; V. Ferre-Aubineau; B. Besse; B. Mignotte; L. Schwartzbrod; S. Billaudel. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. **J Virol Methods**, v.77, n.1, Jan, p.17-26. 1999.

Atmar, R. L.; M. K. Estes. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.1, Jan, p.15-37. 2001.

Atmar, R. L.; T. G. Metcalf; F. H. Neill; M. K. Estes. Detection of Enteric Viruses in Oysters by Using the Polymerase Chain-Reaction. **Appl Environ Microb**, v.59, n.2, FEB, p.631-635. 1993.

Atmar, R. L.; F. H. Neill; J. L. Romalde; F. Le Guyader; C. M. Woodley; T. G. Metcalf; M. K. Estes. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. **Appl Environ Microbiol**, v.61, n.8, Aug, p.3014-8. 1995.

Barardi, C. R.; K. R. Emslie; G. Vesey; K. L. Williams. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. **J Virol Methods**, v.74, n.1, Sep, p.31-8. 1998.

Barardi, C. R. M.; H. Yip; K. R. Emsile; G. Vesey; S. R. Shanker; K. L. Williams. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **Int J Food Microbiol**, v.49, n.1-2, AUG 1, p.9-18. 1999.

- Beard, M. R.; G. Abell; M. Honda; A. Carroll; M. Gartland; B. Clarke; K. Suzuki; R. Lanford; D. V. Sangar; S. M. Lemon. An infectious molecular clone of a Japanese genotype 1b hepatitis C virus. **Hepatology**, v.30, n.1, JUL, p.316-324. 1999.
- Beuret, C.; A. Baumgartner; J. Schlupe. Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. **Appl Environ Microb**, v.69, n.4, APR, p.2292-2297. 2003.
- Bhattacharya, S. S.; M. Kulka; K. A. Lampel; T. A. Cebula; B. B. Goswami. Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. **J Virol Methods**, v.116, n.2, Apr 15, p.181-7. 2004.
- Binn, L. N.; S. M. Lemon; R. H. Marchwicki; R. R. Redfield; N. L. Gates; W. H. Bancroft. Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell cultures. **J Clin Microbiol**, v.20, n.1, Jul, p.28-33. 1984.
- Biziagos, E.; J. Passagot; J. M. Crance; R. Deloince. Long-term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water. **Appl Environ Microbiol**, v.54, n.11, Nov, p.2705-10. 1988.
- Blackmer, F.; K. A. Reynolds; C. P. Gerba; I. L. Pepper. Use of integrated cell culture-PCR to evaluate the effectiveness of poliovirus inactivation by chlorine. **Appl Environ Microbiol**, v.66, n.5, May, p.2267-8. 2000.
- Bosch, A.; R. M. Pinto; F. X. Abad. Differential Accumulation and Depuration of Human Enteric Viruses by Mussels. **Water Sci Technol**, v.31, n.5-6, p.447-451. 1995.
- Bouchriti, N.; S. M. Goyal. Methods for the concentration and detection of human enteric viruses in shellfish: a review. **New Microbiol**, v.16, n.1, Jan, p.105-3. 1993.
- Burkhardt, W., 3rd; K. R. Calci. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. **Appl Environ Microbiol**, v.66, n.4, May, p.1375-8. 2000.
- Burkhardt, W.; K. R. Calci; W. D. Watkins; S. R. Rippey; S. J. Chirtel. Inactivation of indicator microorganisms in estuarine waters. **Water Res**, v.34, n.8, JUN, p.2207-2214. 2000.
- Butt, A. A.; K. E. Aldridge; C. V. Sanders. Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections. **Lancet Infect Dis**, v.4, n.4, May, p.201-12. 2004.
-

Carducci, A.; N. Lucchesi; B. Casini; F. Mazzoni; D. Liaci; M. Verani. Virological analysis of shellfish for food safety and control. **Water Sci Technol**, v.50, n.1, p.137-9. 2004.

Chung, H.; L. A. Jaykus; M. D. Sobsey. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. **Appl Environ Microbiol**, v.62, n.10, Oct, p.3772-8. 1996.

Codex. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION
Twenty-seventh Session
Geneva, 28 June – 2 July 2004. **JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME** 2004.

Coelho, C. **Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction**. UFSC, Florianópolis, 2001.

Coelho, C.; A. P. Heinert; C. M. Simoes; C. R. Barardi. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J Food Prot**, v.66, n.3, Apr, p.507-11. 2003.

Cohen, J. I.; J. R. Ticehurst; S. M. Feinstone; B. Rosenblum; R. H. Purcell. Hepatitis A virus cDNA and its RNA transcripts are infectious in cell culture. **J Virol**, v.61, n.10, Oct, p.3035-9. 1987.

Conama. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. **Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente** 1986.

Conaty, S.; P. Bird; G. Bell; E. Kraa; G. Grohmann; J. M. Mcanulty. Hepatitis A in New South Wales, Australia, from consumption of oysters: the first reported outbreak. **Epidemiol Infect**, v.124, n.1, FEB, p.121-130. 2000.

Costa-Mattioli, M.; A. Di Napoli; V. Ferre; S. Billaudel; R. Perez-Bercoff; J. Cristina. Genetic variability of hepatitis A virus. **J Gen Virol**, v.84, n.Pt 12, Dec, p.3191-201. 2003.

Costa-Mattioli, M.; V. Ferre; D. Casane; R. Perez-Bercoff; M. Coste-Burel; B. M. Imbert-Marcille; E. C. Andre; C. Bressollette-Bodin; S. Billaudel; J. Cristina. Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. **Virology**, v.311, n.1, Jun 20, p.51-9. 2003.

Crance, J. M.; C. Gantzer; L. Schwartzbrod; R. Deloince. Effect of temperature on the survival of hepatitis A virus and its capsid antigen in synthetic seawater. **Environ Toxic Water**, v.13, n.1, FEB, p.89-92. 1998.

- Croci, L.; E. Suffredini. [Microbiological risk associated with seafood consumption]. **Ann Ist Super Sanita**, v.39, n.1, p.35-45. 2003.
- Cromeans, T.; M. D. Sobsey; H. A. Fields. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. **J Med Virol**, v.22, n.1, May, p.45-56. 1987.
- Cromeans, T. L.; O. V. Nainan; H. S. Margolis. Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. **Appl Environ Microb**, v.63, n.6, JUN, p.2460-2463. 1997.
- Cuthbert, J. A. Hepatitis A: old and new. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.1, Jan, p.38-58. 2001.
- Daemer, R. J.; S. M. Feinstone; I. D. Gust; R. H. Purcell. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. **Infect Immun**, v.32, n.1, Apr, p.388-93. 1981.
- De Medici, D.; L. Croci; S. Di Pasquale; A. Fiore; L. Toti. Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR. **Lett Appl Microbiol**, v.33, n.5, November 06, 2001, p.362-366. 2001.
- DeLong, E. F. Microbiology: reconstructing the wild types. **Nature**, v.428, n.6978, Mar 4, p.25-6. 2004.
- Di Pinto, A.; M. C. Conversano; V. T. Forte; G. La Salandra; C. Montervino; G. M. Tantillo. A comparison of RT-PCR-based assays for the detection of HAV from shellfish. **New Microbiol**, v.27, n.2, May, p.119-24. 2004.
- Di Pinto, A.; V. T. Forte; G. M. Tantillo; V. Terio; C. Buonavoglia. Detection of hepatitis A virus in shellfish (*Mytilus galloprovincialis*) with RT-PCR. **J Food Prot**, v.66, n.9, Oct, p.1681-5. 2003.
- Dore, W. J.; D. N. Lees. Behavior of Escherichia coli and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. **Appl Environ Microbiol**, v.61, n.8, Aug, p.2830-4. 1995.
- Dubois, E.; G. Merle; C. Roquier; A. L. Trompette; F. Le Guyader; C. Cruciere; J. J. Chomel. Diversity of enterovirus sequences detected in oysters by RT-heminested PCR. **Int J Food Microbiol**, v.92, n.1, May 1, p.35-43. 2004.
- Dulbecco, R.; M. Vogt. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. **J Exp Med**, v.99, n.2, Feb, p.167-82. 1954.
- Durborow, R. M. Health and safety concerns in fisheries and aquaculture. **Occup Med**, v.14, n.2, Apr-Jun, p.373-406. 1999.
- Epagri. **Biologia e Cultivo de Mexilhões**: Epagri. 2000
-

- Epagri/Cedap. Situação da Maricultura em Santa Catarina. Comunicação pessoal por e-mail. Florianópolis 2004.
- European Communities. Council Directive of 15th of July 1991 laying down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalve molluscs (91/492/EEC). **Off. J. Eur. Communities**, v.L268, p.1-14. 1991.
- Fiore, A. E. Hepatitis A transmitted by food. **Clin Infect Dis**, v.38, n.5, MAR 1, p.705-715. 2004.
- Formiga-Cruz, M.; G. Tofino-Quesada; S. Bofill-Mas; D. N. Lees; K. Henshilwood; A. K. Allard; A. C. Conden-Hansson; B. E. Hernroth; A. Vantarakis; A. Tsibouxi; M. Papapetropoulou; M. D. Furones; R. Girones. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. **Appl Environ Microbiol**, v.68, n.12, p.5990-8. 2002.
- Furuta, T.; M. Akiyama; Y. Kato; O. Nishio. [A food poisoning outbreak caused by purple Washington clam contaminated with norovirus (Norwalk-like virus) and hepatitis A virus]. **Kansenshogaku Zasshi**, v.77, n.2, Mar, p.89-94. 2003.
- Gabutti, G.; A. De Donno; F. Bagordo; M. T. Montagna. Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as an effective indicator of human pollution. **Mar Pollut Bull**, v.40, n.8, AUG, p.697-700. 2000.
- Gantzer, C.; S. Senouci; A. Maul; Y. Levi; L. Schwartzbrod. Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. **J Virol Methods**, v.65, n.2, May, p.265-71. 1997.
- Gerba, C. P.; D. Kayed. Caliciviruses: A major cause of foodborne illness. **J Food Sci**, v.68, n.4, MAY, p.1136-1142. 2003.
- Goswami, B. B.; W. H. Koch; T. A. Cebula. Detection of hepatitis A virus in *Mercenaria mercenaria* by coupled reverse transcription and polymerase chain reaction. **Appl Environ Microbiol**, v.59, n.9, Sep, p.2765-70. 1993.
- Graczyk, T. K.; K. J. Schwab. Foodborne infections vectored by molluscan shellfish. **Curr Gastroenterol Rep**, v.2, n.4, Sep, p.305-9. 2000.
- Green, D. H.; G. D. Lewis. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription PCR and cell culture. **Water Res**, v.33, n.5, APR, p.1195-1200. 1999.
- Greinert, J.; D. Furtado; J. Smith; C. Monte Barardi; C. Simoes. Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in swimming pool filter backwash water concentrates by flocculation and immunomagnetic separation. **Int J Environ Health Res**, v.14, n.6, Dec, p.395-404. 2004.
-

Griffin, D. W.; K. A. Donaldson; J. H. Paul; J. B. Rose. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clin Microbiol Rev**, v.16, n.1, Jan, p.129-43. 2003.

Herrnroth, B. E.; A. C. Conden-Hansson; A. S. Rehnstam-Holm; R. Girones; A. K. Allard. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Appl Environ Microbiol**, v.68, n.9, Oct, p.4523-33. 2002.

Hewitt, J.; G. E. Greening. Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus, and feline calicivirus in marinated mussels. **J Food Prot**, v.67, n.8, Sep, p.1743-50. 2004.

Hurst, C. J.; G. R. Knudsen; M. J. Mcinerney; L. D. Stetzenbach; M. V. Walter. Detection of viruses in environmental waters, sewage, and sludges. Detection of the presence of bacteria and viruses in shellfish. In: (Ed.). **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1997. Detection of viruses in environmental waters, sewage, and sludges. Detection of the presence of bacteria and viruses in shellfish., p.168-175, 203-212

Iino, S. [Epidemiology and prevention of hepatitis A]. **Nippon Rinsho**, v.62 Suppl 8, Aug, p.483-9. 2004.

Invitrogen. **Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit for Sequencing. Instruction Manual**. 2001

Iritani, N.; Y. Seto; K. Haruki; M. Kimura; M. Ayata; H. Ogura. Major change in the predominant type of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka City, Japan, between April 1996 and March 1999. **J Clin Microbiol**, v.38, n.7, Jul, p.2649-54. 2000.

Jaykus, L. A.; R. Deleon; M. D. Sobsey. Application of Rt-Pcr for the Detection of Enteric Viruses in Oysters. **Water Sci Technol**, v.27, n.3-4, p.49-53. 1993.

_____. Development of a molecular method for the detection of enteric viruses in oysters. **J Food Protect**, v.58, n.12, DEC, p.1357-1362. 1995.

_____. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. **Appl Environ Microb**, v.62, n.6, JUN, p.2074-2080. 1996.

Jung, K.; C. Chae. RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe. **J Virol Methods**, v.123, n.2, Feb, p.141-6. 2005.

Khuroo, M. S. Viral hepatitis in international travellers: risks and prevention. **Int J Antimicrob Agents**, v.21, n.2, Feb, p.143-52. 2003.

Kingsley, D. H.; G. K. Meade; G. P. Richards. Detection of both hepatitis A virus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food-borne illness. **Appl Environ Microbiol**, v.68, n.8, Sep, p.3914-8. 2002.

Kingsley, D. H.; G. P. Richards. Rapid and Efficient Extraction Method for Reverse Transcription-PCR Detection of Hepatitis A and Norwalk-Like Viruses in Shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, n.9, September 1, 2001, p.4152-4157. 2001.

_____. Persistence of hepatitis A virus in oysters. **J Food Prot**, v.66, n.2, Mar, p.331-4. 2003.

Kogawa, K.; S. Nakata; S. Ukae; N. Adachi; K. Numata; D. O. Matson; M. K. Estes; S. Chiba. Dot blot hybridization with a cDNA probe derived from the human calicivirus Sapporo 1982 strain. **Arch Virol**, v.141, n.10, p.1949-59. 1996.

Koopmans, M.; E. Duizer. Foodborne viruses: an emerging problem. **Int J Food Microbiol**, v.90, n.1, Feb 1, p.23-41. 2004.

Koopmans, M.; C. H. Von Bonsdorff; J. Vinje; D. De Medici; S. Monroe. Foodborne viruses. **FEMS Microbiol Rev**, v.26, n.2, Jul, p.187-205. 2002.

Laverick, M. A.; A. P. Wyn-Jones; M. J. Carter. Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. **Lett Appl Microbiol**, v.39, n.2, August 01, 2004, p.127-136. 2004.

Lcmm. Projeto BMLP-LCMM: Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos. 2004 2001.

Le Cann, P.; S. Ranarijaona; S. Monpoeho; F. Le Guyader; V. Ferre. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. **Res Microbiol**, v.155, n.1, Jan-Feb, p.11-5. 2004.

Le Guyader, F.; V. Afaire-Marchais; J. Brillet; S. Billaudel. Use of genomic probes to detect hepatitis A virus and enterovirus RNAs in wild shellfish and relationship of viral contamination to bacterial contamination. **Appl Environ Microbiol**, v.59, n.11, Nov, p.3963-8. 1993.

Le Guyader, F.; E. Dubois; D. Menard; M. Pommepuy. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. **Appl Environ Microbiol**, v.60, n.10, Oct, p.3665-71. 1994.

-
- Le Guyader, F.; L. Haugarreau; L. Miossec; E. Dubois; M. Pommepuy. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Appl Environ Microb**, v.66, n.8, AUG, p.3241-3248. 2000.
- Le Guyader, F. S.; F. H. Neill; E. Dubois; F. Bon; F. Loisy; E. Kohli; M. Pommepuy; R. L. Atmar. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. **Int J Food Microbiol**, v.87, n.1-2, OCT 15, p.107-112. 2003.
- Le Marchand, K.; L. Masson; R. Brousseau. Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, p.145-172. 2004.
- Lee, R. J.; A. D. Younger. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. **Int Biodeter Biodegr**, v.50, n.3-4, p.177-183. 2002.
- Lees, D. Viruses and bivalve shellfish. **Int J Food Microbiol**, v.59, n.1-2, JUL 25, p.81-116. 2000.
- Lees, D. N.; K. Henshilwood; W. J. Dore. Development of a Method for Detection of Enteroviruses in Shellfish by Pcr with Poliovirus as a Model. **Appl Environ Microb**, v.60, n.8, AUG, p.2999-3005. 1994.
- Legeay, O.; Y. Caudrelier; C. Cordevant; L. Rigottier-Gois; M. Lange. Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. **J Virol Methods**, v.90, n.1, Nov, p.1-14. 2000.
- Leggitt, P. R.; L. A. Jaykus. Detection methods for human enteric viruses in representative foods. **J Food Prot**, v.63, n.12, p.1738-44. 2000.
- Lewis, G. D.; T. G. Metcalf. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. **Appl Environ Microbiol**, v.54, n.8, Aug, p.1983-8. 1988.
- Lewis, G. D.; S. L. Molloy; G. E. Greening; J. Dawson. Influence of environmental factors on virus detection by RT-PCR and cell culture. **J Appl Microbiol**, v.88, n.4, May, p.633-40. 2000.
- Lo, S.; J. Gilbert; F. Hetrick. Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. **Appl Environ Microbiol**, v.32, n.2, Aug, p.245-9. 1976.
- Manfioletti, G.; C. Schneider. A new and fast method for preparing high quality lambda DNA suitable for sequencing. **Nucleic Acids Res**, v.16, n.7, Apr 11, p.2873-84. 1988.
-

Mbithi, J. N.; V. S. Springthorpe; S. A. Sattar. Effect of Relative-Humidity and Air-Temperature on Survival of Hepatitis-a Virus on Environmental Surfaces. **Appl Environ Microb**, v.57, n.5, MAY, p.1394-1399. 1991.

Medeiros, M. I.; S. N. Neme; P. Da Silva; D. M. Capuano; M. C. Errera; S. A. Fernandes; G. R. Do Valle; F. A. De Avila. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirao Preto-SP, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.43, n.1, Jan-Feb, p.21-4. 2001.

Melnick, J. L. Thermostability of poliovirus and measles vaccines. **Dev Biol Stand**, v.87, p.155-60. 1996.

Millard, J.; H. Appleton; J. V. Parry. Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. Part 1. Procedures for infection and recovery of virus from laboratory-maintained cockles. **Epidemiol Infect**, v.98, n.3, Jun, p.397-414. 1987.

Minor, P. D. **Classification and Nomenclature of Viruses: the fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Vienna, Springer Verlag, p.320. 1991

Miossec, L.; F. Le Guyader; L. Haugarreau; M. Pommepuy. [Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastroenteritis epidemics in human coastal population]. **Rev Epidemiol Sante Publique**, v.48 Suppl 2, Sep, p.2S62-71. 2000.

Monpoeho, S.; A. Dehee; B. Mignotte; L. Schwartzbrod; V. Marechal; J. C. Nicolas; S. Billaudel; V. Ferre. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. **Biotechniques**, v.29, n.1, Jul, p.88-93. 2000.

Mullendore, J. L.; M. D. Sobsey; Y. C. Shieh. Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. **J Virol Methods**, v.94, n.1-2, Jun, p.25-35. 2001.

Muniain-Mujika, I.; R. Girones; F. Lucena. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. **J Virol Methods**, v.89, n.1-2, Oct, p.109-18. 2000.

Muniain-Mujika, I.; R. Girones; G. Tofino-Quesada; M. Calvo; F. Lucena. Depuration dynamics of viruses in shellfish. **Int J Food Microbiol**, v.77, n.1-2, Aug 25, p.125-33. 2002.

Nascimento, I. A. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**. 7: 871-876 p. 1983.

National Shellfish Sanitation Program Manual of Operations Part I: Sanitation of Shellfish-growing areas. **Department of Health and Human Services, Public**

Health Service, U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C.
1995.

Neill, M. Microbiological Indices for total coliform and E. coli bacteria in estuarine waters. **Mar Pollut Bull**, v.49, n.9-10, Nov, p.752-60. 2004.

Neogen. Disponível em:

http://www.neogen.com/pdf/FS_CatalogPages/RevealSalmonella.pdf 2004.

Nicand, E.; R. Teysou; Y. Buisson. Le risque fécal virale. **Virology**, v.2, p.103-116. 1998.

Pearse, V.; J. Pearse; M. Buchsbaum; R. Buchsbaum. **Living Invertebrates**. California: The Boxwood Press. 1987

Perrett, K.; J. Granerod; N. Crowcroft; R. Carlisle. Changing epidemiology of hepatitis A: should we be doing more to vaccinate injecting drug users? **Commun Dis Public Health**, v.6, n.2, Jun, p.97-100. 2003.

Potasman, I.; A. Paz; M. Odeh. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clin Infect Dis**, v.35, n.8, Nov 15, p.921-8. 2002.

Qiao, H.; M. Nilsson; E. R. Abreu; K. O. Hedlund; K. Johansen; G. Zaori; L. Svensson. Viral diarrhea in children in Beijing, China. **J Med Virol**, v.57, n.4, Apr, p.390-6. 1999.

Reed, L. J.; H. Muench. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v.27, n.3, p.493-497. 1938.

Reynolds, K. A.; C. P. Gerba; M. Abbaszadegan; L. L. Pepper. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. **Can J Microbiol**, v.47, n.2, Feb, p.153-7. 2001.

Reynolds, K. A.; C. P. Gerba; I. L. Pepper. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. **Appl Environ Microbiol**, v.62, n.4, Apr, p.1424-7. 1996.

Ribao, C.; I. Torrado; M. L. Vilarino; J. L. Romalde. Assessment of different commercial RNA-extraction and RT-PCR kits for detection of hepatitis A virus in mussel tissues. **J Virol Methods**, v.115, n.2, FEB, p.177-182. 2004.

Rigotto, C.; T. C. Sincero; C. M. Simoes; C. R. Barardi. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Res**, v.39, n.2-3, Jan-Feb, p.297-304. 2005.

Robertson, B. H.; R. W. Jansen; B. Khanna; A. Totsuka; O. V. Nainan; G. Siegl; A. Widell; H. S. Margolis; S. Isomura; K. Ito; Et Al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. **J Gen Virol**, v.73 (Pt 6), Jun, p.1365-77. 1992.

Romalde, J. L.; E. Area; G. Sanchez; C. Ribao; I. Torrado; X. Abad; R. M. Pinto; J. L. Barja; A. Bosch. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. **Int J Food Microbiol**, v.74, n.1-2, Apr 25, p.119-30. 2002.

Romalde, J. L.; M. K. Estes; G. Szucs; R. L. Atmar; C. M. Woodley; T. G. Metcalf. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. **Appl Environ Microbiol**, v.60, n.6, Jun, p.1921-6. 1994.

Romalde, J. L.; C. Ribao; M. Luz Vilarino; J. L. Barja. Comparison of different primer sets for the RT-PCR detection of hepatitis A virus and astrovirus in mussel tissues. **Water Sci Technol**, v.50, n.1, p.131-6. 2004.

Romalde, J. L.; I. Torrado; C. Ribao; J. L. Barja. Global market: shellfish imports as a source of reemerging food-borne hepatitis A virus infections in Spain. **Int Microbiol**, v.4, n.4, p.223-6. 2001.

Roos, B. [Hepatitis epidemic transmitted by oysters.]. **Sven Lakartidn**, v.53, n.16, Apr 20, p.989-1003. 1956.

Sair, A. I.; D. H. D'souza; C. L. Moe; L. A. Jaykus. Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. **J Virol Methods**, v.100, n.1-2, Mar, p.57-69. 2002.

Sambrook, J.; D. Russel, Eds. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v.1, 2 e 3, 2nd ed. 2001.

Sanchez, G.; R. M. Pinto; H. Vanaclocha; A. Bosch. Molecular characterization of hepatitis A virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. **J Clin Microbiol**, v.40, n.11, Dec, p.4148-55. 2002.

Santos, C. S.; C. Rigotto; C. M. O. Simoes; C. R. M. Barardi. Improved method for rotavirus detection in oysters using RT-PCR: Suitability of a commercial PCR kit. **J Shellfish Res**, v.20, n.3, DEC, p.997-1001. 2001.

_____. Detection of viable rotaviruses in shellfish by means of cell culture and immunofluorescence assay. **J Food Sci**, v.67, n.5, JUN-JUL, p.1868-1871. 2002.

Schvoerer, E.; M. Ventura; O. Dubos; G. Cazaux; R. Serceau; N. Gournier; V. Dubois; P. Caminade; H. J. Fleury; M. E. Lafon. Qualitative and quantitative

molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res Microbiol*, v.152, n.2, Apr, p.179-86. 2001.

Schwab, K. J.; R. De Leon; M. D. Sobsey. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, v.61, n.2, Feb, p.531-7. 1995.

_____. Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol*, v.62, n.6, Jun, p.2086-94. 1996.

Schwab, K. J.; F. H. Neill; M. K. Estes; R. L. Atmar. Improvements in the RT-PCR detection of enteric viruses in environmental samples. *Water Sci Technol*, v.38, n.12, p.83-86. 1998.

Schwab, K. J.; F. H. Neill; F. Le Guyader; M. K. Estes; R. L. Atmar. Development of a reverse transcription-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "Norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. *Appl Environ Microbiol*, v.67, n.2, Mar, p.742-9. 2001.

Scipioni, A.; G. Daube; E. Thiry. Contamination of food and water by human pathogenic viruses. *Ann Med Vet*, v.144, n.4, JUL-AUG, p.207-221. 2000.

Shieh, Y. S. C.; K. R. Calci; R. S. Baric. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. *Appl Environ Microb*, v.65, n.11, NOV, p.4709-4714. 1999.

Simkova, A.; J. Cervenka. Coliphages as ecological indicators of enteroviruses in various water systems. *Bull World Health Organ*, v.59, n.4, p.611-8. 1981.

Sobsey, M. D.; R. J. Carrick; H. R. Jensen. Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. *Appl Environ Microbiol*, v.36, n.1, Jul, p.121-8. 1978.

Souza, D. S. M.; J. T. Barreiros; K. M. Papp; M. Steindel; C. M. O. Simões; C. R. M. Barardi. Comparison between immunomagnetic separation, coupled with immunofluorescence, and the techniques of Faust et al. and of Lutz for the diagnosis of *Giardia lamblia* cysts in human feces. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.45, n.6, p.339-342. 2003.

Souza, J. F. Custo de Produção da Ostra Cultivada. *Cadernos de Indicadores Agrícolas*, p.23. 2003.

Steinke, D. T.; T. L. Weston; A. D. Morris; T. M. Macdonald; J. F. Dillon. Epidemiology and economic burden of viral hepatitis: an observational population based study. *Gut*, v.50, n.1, Jan, p.100-5. 2002.

- St-Jean, S. D.; S. C. Courtenay; E. Pelletier; R. St-Louis. Butylin concentrations in sediments and blue mussels (*Mytilus edulis*) of the southern gulf of st. Lawrence, Canada. **Environmental Technology**, v.20, p.181-189. 1999.
- Sunen, E.; N. Casas; B. Moreno; C. Zigorraga. Comparison of two methods for the detection of hepatitis A virus in clam samples (*Tapes spp.*) by reverse transcription-nested PCR. **Int J Food Microbiol**, v.91, n.2, Apr 1, p.147-54. 2004.
- Tahan, V.; O. Ozdogan; N. Tozun. Epidemiology of viral hepatitis in the Mediterranean basin. **Rocz Akad Med Bialymst**, v.48, p.11-7. 2003.
- Tanaka, J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. **Vaccine**, v.18 Suppl 1, Feb 18, p.S57-60. 2000.
- Tang, Y. W.; J. X. Wang; Z. Y. Xu; Y. F. Guo; W. H. Qian; J. X. Xu. A serologically confirmed, case-control study, of a large outbreak of hepatitis A in China, associated with consumption of clams. **Epidemiol Infect**, v.107, n.3, Dec, p.651-7. 1991.
- Tortora, G. J.; B. R. Funk; C. L. Case; K. Casoli. Bactérias. In: (Ed.). **Microbiologia**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. Bactérias, p.295-319
- Traore, O.; C. Arnal; B. Mignotte; A. Maul; H. Laveran; S. Billaudel; L. Schwartzbrod. Reverse transcriptase PCR detection of astrovirus, hepatitis A virus, and poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods. **Appl Environ Microbiol**, v.64, n.8, Aug, p.3118-22. 1998.
- Tsai, Y. L.; B. Tran; L. R. Sangermano; C. J. Palmer. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. **Appl Environ Microbiol**, v.60, n.7, Jul, p.2400-7. 1994.
- Vancuyckgandre, H.; D. Gratier; M. F. Burckhart; J. M. Crance; L. Schwartzbrod. Detection of Hepatitis-a Virus in Oysters. **Int J Food Sci Tech**, v.29, n.2, APR, p.185-193. 1994.
- Vanderzant, C.; D. F. Splittstoesser. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA). 1992
- Villar, L. M.; L. A. Amado; A. M. Gaspar. In situ enzyme immunoassay for titration of a Brazilian hepatitis A virus strain (HAF-203). **Braz J Med Biol Res**, v.37, n.7, Jul, p.1023-7. 2004.
- Villar, L. M.; V. S. De Paula; A. M. Gaspar. Seasonal variation of hepatitis A virus infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.44, n.5, Sep-Oct, p.289-92. 2002.
-

- Vinatea, C. E. B. **Detecção e quantificação de poliovírus em ostras-do-pacífico (*Crassostrea gigas*), através de cultura celular e RT-PCR.** (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- Ward, J. E. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: Particle capture, processing, and fate. *Invertebr Biol*, v.115, n.3, p.218-231. 1996.
- Winkler, S.; A. Grumann; F. Neto; M. Rockzanski. **Cadeias Produtivas do Estado de Santa Catarina: aquicultura e pesca.** Florianópolis: Epagri. 1998
- Wong, K. H.; Y. M. Liu; P. S. Ng; B. W. Young; S. S. Lee. Epidemiology of hepatitis A and hepatitis E infection and their determinants in adult Chinese community in Hong Kong. *J Med Virol*, v.72, n.4, Apr, p.538-44. 2004.
- Wyn-Jones, A. P.; J. Sellwood. Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol*, v.91, n.6, DEC, p.945-962. 2001.
- Younger, A. D.; R. J. Lee; D. N. Lees. Microbiological monitoring of bivalve mollusc harvesting areas in England and Wales - rationale and approach. In: A. Villalba; B. Reguera; J. L. Romalde; R. Beiras (Ed.). **Molluscan Shellfish Safety.** Santiago de Compostela: Conselleria de Pesca da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2003. Microbiological monitoring of bivalve mollusc harvesting areas in England and Wales - rationale and approach, p.265-277
- Zhang, H.; S. F. Chao; L. H. Ping; K. Grace; B. Clarke; S. M. Lemon. An infectious cDNA clone of a cytopathic hepatitis A virus: genomic regions associated with rapid replication and cytopathic effect. *Virology*, v.212, n.2, Oct 1, p.686-97. 1995.
- Zhou, Y. J.; M. K. Estes; X. Jiang; T. G. Metcalf. Concentration and Detection of Hepatitis-a Virus and Rotavirus from Shellfish by Hybridization Tests. *Appl Environ Microb*, v.57, n.10, OCT, p.2963-2968. 1991.
-

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)