

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E  
PESQUISA  
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ALEXANDRE CAMPOS DA SILVA**

**PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO MOLECULAR  
(RT-PCR) DO VÍRUS DA HEPATITE A (HAV)**

**ARACAJU/SE  
2005**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ALEXANDRE CAMPOS DA SILVA**

**PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO MOLECULAR  
(RT-PCR) DO VÍRUS DA HEPATITE A (HAV)**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como um dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde [Área de Concentração: Estudos Clínicos e Laboratoriais em Saúde]

**ORIENTADOR: PROF. DR. ALEXANDRE LUNA CÂNDIDO**

**ARACAJU/SE  
2005**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Saúde/UFS

S586p Silva, Alexandre Campos da  
Padronização da detecção molecular (RT-PCR) do vírus da hepatite A (HAV) / Alexandre Campos da Silva.—Aracaju, 2005.  
54 f.  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luna Cândido  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa em Medicina.

1. Vírus da hepatite A – Diagnóstico molecular 2. Transcriptase reversa (RT) 3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR) 4. Fígado - Patologia 5. Doenças hepáticas I. Título

CDU 616.36-002

# ALEXANDRE CAMPOS DA SILVA

## PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA HEPATITE A (HAV)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde [Área de Concentração: Estudos Clínicos e Laboratoriais em Saúde]

Aprovado em: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

---

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luna Cândido

---

1ª Examinadora: Profa. Dra. Cláudia Moura Melo

---

2º Examinador: Prof. Dr. José Gerson Rezende Feitosa

### PARECER

---

---

---

---

---

---

---

***A Gabriela, por seu amor e seu sorriso que me encanta e fortalece.***

## **AGRADECIMENTOS**

À minha querida esposa Gabriela Bicca da Silveira por participar ativamente de todos os momentos da minha vida, sempre com muito amor.

Aos meus pais Heronildes Alves da Silva e Marina Campos da Silva, pelos ensinamentos dos valores morais e éticos e por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus sogros Artigas Teixeira da Silveira e Marta Iza Bicca da Silveira pelo carinho e incentivo.

Ao professor Dr. Alexandre Luna Cândido por acreditar no projeto e torná-lo exeqüível, demonstrando-se sempre disponível em compartilhar seus conhecimentos científicos e sua amizade.

Aos amigos Hildebrando Vieira Filho e Salete Dezen sempre presentes, dividindo alegrias e angústias.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, especificamente ao Núcleo de Pós Graduação em Medicina pela oportunidade de qualificação.

Ao Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe, de modo particular o Laboratório de Virologia Comparada que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr e Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz – RJ por ter cedido as amostras dos vírus que foram utilizadas na execução deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde por contribuir com o meu crescimento profissional.

Ao professor Ricardo Queiroz Gurgel pelo incentivo dispensado a todos os alunos da pós-graduação.

À professora Maria Jésia Vieira pelo carinho que transmite aos alunos nos seus ensinamentos.

Aos acadêmicos Matheus Smerim Silva Santos, Luciana Mendonça Moraes Barbosa, Tiago Oliveira Morita, Marcus Vinicius Aragão Batista e André Luís Santana de Jesus que contribuíram incansavelmente com a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de Sergipe (FAPESE), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe (FAP-SE), pelo apoio.

A todos os amigos da pós-graduação em especial a José Jean de Oliveira Toscano, Rubens Souza Santos e Agostinho Gonçalves da Silva Júnior pelos excelentes momentos compartilhados.

Ao amigo e companheiro de orientação Gustavo Tirado Rodrigues pela amizade e exemplo profissional.

A EMBRAPA, na pessoa de Dr. Edmar Ramos de Siqueira pelo apoio.

A Martha Suzana Nunes de Azevedo pela simpatia e atenção dispensada.



## RESUMO

O Vírus da Hepatite A (HAV) é um importante membro da família Picornaviridae, gênero Hepatovírus, geralmente transmitido por alimentos e água contaminados, sendo um problema de saúde pública em todo o mundo. Dentre as proteínas do capsídeo viral, a VP1 é a principal responsável pela imunogenicidade viral devido a sua localização superficial e estrutura molecular, sendo utilizada por vários autores para diagnóstico e análise filogenética. Este trabalho objetivou desenvolver um método molecular de diagnóstico por meio da Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para detecção do vírus da hepatite A em pescado. Com base na seqüência nucleotídica do gene VP1, foram desenhados iniciadores sintéticos para amplificação de um fragmento da amostra HAF-203. Um amplicon com 783 pb foi obtido conforme previsão da análise computacional e sua especificidade foi comprovada por restrição enzimática utilizando as endonucleases de restrição *Bam* H I e *Hae* III. A sensibilidade foi avaliada e revelou-se na ordem de 1 PFU/g a partir da reação de RT-PCR padronizada. Tais resultados sugerem que um procedimento executável de detecção molecular para o HAV foi estabelecido e o amplicon resultante pode ser usado para análise filogenética e como sonda molecular aplicada na investigação da presença do HAV tanto em ambiente como em outros extratos.

**PALAVRAS-CHAVE:** HAV, diagnóstico, RT-PCR

## ABSTRACT

The hepatitis A virus (HAV) is an important member of Picornaviridae family, Hepatovirus genus, usually transmitted by contaminated food and water. Among viral capsid proteins, VP1 is the main responsible for viral immunogenicity due to its superficial localization. This research aims the molecular detection of HAV in fish by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). A set of primers has been designed for RT-PCR amplification of a VP1 fragment from HAF-203 strain. A 783bp amplicon was obtained as predicted by computer analysis and its specificity was tested by restriction with *Bam* H I e *Hae* III. These findings suggest that first, a successful molecular detection procedure has been established for HAV and second, the resulting amplicon can be used for phylogenetic analysis and as molecular probes applied to investigate the presence of the HAV in the environment.

**KEYWORDS:** HAV, diagnosis, RT-PCR

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema do RNA do HAV, mostrando as principais proteínas por ele codificadas..... 16
- Figura 2.** Gel de agarose 2%, TBE 1 X, 110V 2 horas. Canaleta 1: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder. Canaleta 5: produto amplificado da reação de RT-PCR com 783bp..... 42
- Figura 3.** Gel de poliacrilamida 5%, TBE 1 X, 108V 1 hora e 30 minutos. Canaleta 1: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder. Canaleta 2: amplicon da reação de 783bp. Canaleta 3: Amplicon purificado. Canaleta 4: produto da digestão com Bam H I (732bp). Canaleta 5: produto da digestão com Hae III (a300bp e b431bp)..... 42

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Características dos primers utilizados na amplificação de um fragmento da amostra HAF-203 do HAV.....	40
--	----

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1 Histórico da Hepatite A .....	13
2.2 Vírus da Hepatite A (HAV).....	14
2.3 Transmissão do vírus da hepatite A .....	18
2.4 Epidemiologia.....	19
2.5 Relação do Pescado com a Hepatite A .....	23
2.6 Técnica de RT-PCR utilizada na detecção da Hepatite A .....	26
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	33
4.1 Cultivo celular.....	33
4.2 Isolamento do vírus.....	33
4.3 Inóculo de HAV.....	33
4.4 Extração do RNA da amostra viral.....	34
4.5 Análise da seqüência do gene VP1 do nucleocapsídeo do HAV.....	35
4.6 Síntese de cDNA .....	36
4.7 PCR da amostra.....	36
4.8 Restrição enzimática.....	37
4.9 Análise de Sensibilidade da Reação de RT-PCR.....	38
<b>5 RESULTADOS</b> .....	39
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

## **1 INTRODUÇÃO**

As hepatites virais constituem-se em um importante problema de saúde pública em todo o mundo, representando uma considerável causa de mortalidade e morbidade. Podem ser classificadas de acordo com as vias de transmissão, sexual, parenteral e entérica.

A ocorrência da hepatite A está intimamente relacionada com a situação sanitária e sócio-econômica das populações, sendo endêmica especialmente naquelas com baixos níveis sócio-econômicos. O vírus da hepatite A é extremamente estável, sendo transmitido primariamente pela rota fecal-oral, diretamente de pessoa para pessoa ou através de água ou alimento contaminado.

O pescado pode ser veiculador de vários microrganismos patogênicos para o homem, a maior parte deles fruto da contaminação ambiental. O lançamento de esgotos nas águas de reservatórios, lagos, rios e no próprio mar é a causa poluidora mais comum registrada no mundo inteiro.

As normas de controle sanitário de alimentos são definidas pelo Ministério da Agricultura e Ministério da Saúde, que priorizam exames indiretos ou de isolamento e identificação dos possíveis agentes patogênicos ou de referência. Esses exames, entretanto, são onerosos, laboriosos, demorados e pouco sensíveis, representando uma dificuldade real na solução de problemas de qualidade sanitária em diversos alimentos, incluindo o pescado. Tal problema é agravado ainda pela grande diversidade de espécies e de subprodutos derivados deste.

Com o intuito de proteger os consumidores de pescado, seria ideal que todos os patógenos fossem monitorados. Entretanto, isso não ocorre. Atualmente as técnicas moleculares constituem uma importante ferramenta utilizada para este fim. Tais tecnologias combinam rapidez, grande sensibilidade, especificidade e possibilita uma análise epidemiológica molecular. A amplificação de moléculas de DNA ou RNA *in vitro*, bem como de hibridização e análise filogenética, garantem uma avaliação mais adequada de possíveis contaminantes e suas interações epidemiológicas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Histórico da Hepatite A**

A hepatite A é conhecida desde as antigas civilizações chinesa, grega e romana, mas o primeiro relato escrito foi a descrição de uma epidemia na ilha de Minorca no século XVIII. A seguir, muitos outros relatos de epidemias foram feitos, e a denominação de *icterícia catarral* foi dada por Virchow, devido à quantidade de trombos biliares observados nas necropsias, admitindo o autor que a obstrução biliar era a causa da doença. Essa denominação foi utilizada até a década de 40 (SILVA, 1995).

Uma suspeita mais justificada da etiologia virótica da doença só foi feita em 1931 por Findlay et al., citado por Pereira e Gonçalves (2003) que, em relato a Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, discorreram sobre a história da doença e de uma epidemia recente, admitindo que fosse causada por um vírus, agente ultramicroscópico, que só infecta o homem.

Estudos epidemiológicos e experimentos realizados durante a Segunda Guerra Mundial em voluntários, demonstraram a transmissão da doença entre seres humanos e confirmaram a etiologia viral da doença, diferenciando a hepatite infecciosa da então chamada icterícia sérica, que tinha um tempo de incubação muito maior. Esses experimentos demonstraram que ela era transmitida pela ingestão de fezes e, excepcionalmente de soro, se esse fosse originado de um indivíduo nos primeiros dias da doença (MELNICK, 1995). Nessa época, houve a proposta da utilização do nome hepatite A para a hepatite infecciosa e hepatite B para a icterícia sérica. Tinha-se idéia clara da etiologia viral, mas não havia



segurança se o vírus era o mesmo ou se havia diferentes vírus (PEREIRA; GONÇALVES, 2003).

A transmissão da doença para o homem, devido ao consumo de pescado contaminado pelo vírus, foi primeiramente descrita em 1956 com a confirmação de um surto de hepatite A provocado pela ingestão de moluscos contaminados (LEGEAY et al., 2000).

O HAV foi finalmente identificado por Feinstone et al. (1973), citado por Melnick (1995), quando estes pesquisadores encontraram uma partícula vírus-símile em fezes de voluntários infectados experimentalmente com a amostra MS-1. A partícula viral foi detectada pelo método de imunoeletromicroscopia, e possuía aproximadamente 27 nm de diâmetro.

## **2.2 Vírus da Hepatite A (HAV)**

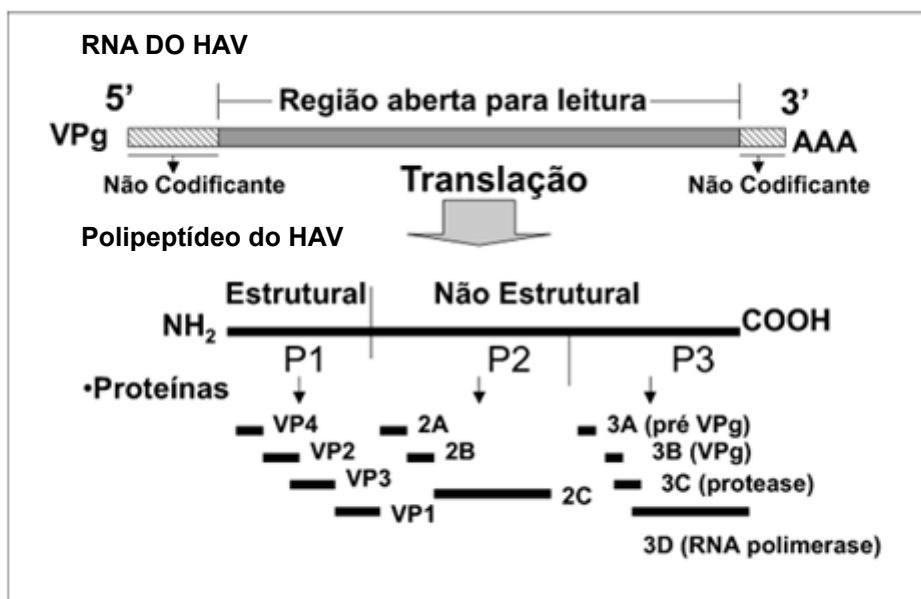
O HAV pertence à família Picornaviridae, gênero Hepatovírus (HOLLINGER; TICEHURST, 1996; KOFF, 1998). O RNA viral é de fita simples, com localização citoplasmática e sentido positivo, portanto, pronto para a tradução. O RNA genômico está associado covalentemente à proteína VPg na extremidade 5' não codificante, tendo esta, papel importante na iniciação da transcrição. Ela forma o sítio de acoplamento do ribossoma. O RNA genômico e algumas proteínas não estruturais associadas são envoltos em um capsídeo com simetria icosaédrica sem envelope (CUTHBERT, 2001).

Inicialmente o HAV foi classificado como um enterovírus devido a suas características biofísicas, como sua forma icosaédrica, seus coeficientes de

sedimentação, densidade e diâmetro, por ser um vírus não envelopado de fita simples, linear e que se replica no citoplasma, além de detectável nas fezes (HOLLINGER; TICEHURST, 1996). Porém, estudos mais recentes demonstraram que o HAV possui algumas características distintas, que o difere de outros enterovírus, como por exemplo, sua seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos; suas características físico-químicas; tropismo hepático; capacidade de causar doença hepatocelular; presença de apenas um sorotipo e um sítio imunodominante de neutralização; e por fim; não reatividade com anticorpos monoclonais e específicos para outros enterovírus (YOKOSUKA, 2000).

O genoma do HAV possui 7474 nucleotídeos e é semelhante ao dos demais vírus da família Picornaviridae. A cadeia de RNA consiste de três regiões: uma região não codificadora na extremidade 5' de 732 a 740 nucleotídeos, uma parte intermediária, codificadora, com 2.225 a 2.227 nucleotídeos e uma parte não codificadora na extremidade 3' com 40 a 80 nucleotídeos (PEREIRA; GONÇALVES, 2003).

A parte intermediária codifica uma poliproteína que, por meio de clivagem, por proteólise, se transforma na proteína viral madura. Esta região é dividida em P1, que possui as proteínas do capsídeo 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) e 1D (VP1) e em regiões P2 e P3 que englobam as proteínas não estruturais (2A, 2B, 2C e 3A, 3B e 3C), reguladoras da expressão gênica, necessárias para a replicação viral (HOLLINGER; TICEHURST, 1996; YOKOSUKA, 2000) (FIGURA 1).



**FIGURA 1** – Esquema do RNA do HAV, mostrando as principais proteínas por ele codificadas

Apesar de ter apenas um sorotipo, o HAV possui várias amostras, sendo as mais bem caracterizadas: HM175, CR326, MS-1, SD11, I.A, HAS15, MBB, GBM e PA21. Todas estas, exceto a última, são consideradas amostras humanas (HOLLINGER; TICEHURST, 1996). Apesar da grande distribuição geográfica do vírus, não existe significativa variação antigênica entre as amostras de HAV. Isto ocorre porque a seqüência de aminoácidos das proteínas do capsídeo tem alta taxa de conservação, havendo apenas 2,9% de variação entre as amostras HM175 e PA21 (LEMON, 1992).

Em estudos de avaliação da variação genética entre as amostras, analisa-se a região VP1/2A, que é a região com maior variabilidade do vírus. Existem sete genótipos, o I (IA e IB), II, III (IIIA e IIIB), IV, V, VI, VII, sendo que as amostras pertencentes a um mesmo genótipo têm pelo menos 85% de identidade na seqüência de bases. Os genótipos mais frequentemente encontrados nas infecções humanas são dos tipos I e III (PEREIRA; GONÇALVES, 2003).

O HAV tem alto grau de estabilidade físico-química, sendo estável em pH 1,0 durante 5 horas à temperatura ambiente e durante 90 minutos à 38°C (SCHOLZ et al, 1989). O vírus pode sobreviver por 671 dias a 4°C e por 25 dias a 25°C (MELNICK, 1995), é relativamente resistente ao calor (60°C por uma hora), ao tratamento com éter e a detergentes. Outra característica importante deste vírus é que o mesmo permanece infectante após o congelamento (SEYMOUR; APPLETON, 2001). Por outro lado, desinfetantes a base de aldeídos são bastante eficientes para inativar o vírus, assim como irradiação ultravioleta e formalina (LEMON, 1992).

O HAV após absorção na mucosa digestiva atinge a corrente circulatória e chega aos hepatócitos pela circulação portal e pela circulação sistêmica, através dos espaços inter-endoteliais dos sinusóides e espaço de Disse, sendo capturado pelos hepatócitos através de um possível receptor. O vírus se multiplica nos hepatócitos a partir de uma cadeia de RNA com sentido negativo, originada a partir da cadeia com sentido positivo por ação de uma RNA polimerase viral. O vírus montado é eliminado através da membrana apical do hepatócito, chegando aos canalículos biliares e daí, juntamente com a bile, ao intestino. A partir da membrana basolateral chega ao sangue. Os mecanismos de eliminação do vírus na bile e no sangue não são conhecidos, mas independe da necrose do hepatócito, já que altos títulos de vírus são observados nas fezes antes de manifestações clínicas ou laboratoriais da infecção, ou seja, antes de fenômenos de necrose hepatocitária (PEREIRA; GONÇALVES, 2003).

## **2.3 Transmissão do vírus da Hepatite A**

A forma mais comum de transmissão é a oral, através da ingestão de alimentos ou água contaminados pelo HAV. Nos países subdesenvolvidos a transmissão se dá pela ingestão de água, alimentos e objetos contaminados, sendo a infecção precoce, ocorrendo após os oito meses de idade, quando os anticorpos maternos começam a desaparecer. Nos países em desenvolvimento, a transmissão clássica e precoce diminui na medida em que as condições higiênicas melhoram (CLEMENS et al., 2000). Nessas regiões, e nos países desenvolvidos, o número de adolescentes e adultos jovens susceptíveis é grande e os surtos epidêmicos podem surgir por ingestão de alimentos contaminados como vegetais e pescados em geral (PINHO et al., 1998). Casos esporádicos surgem em pessoas que viajam para áreas endêmicas, sem proteção vacinal (CUTHBERT, 2001).

Como o período de viremia é curto e a concentração de vírus no sangue é baixa, a transmissão por sangue ou material por ele contaminado é rara, mas pode ocorrer se o material injetado (soro ou sangue) tiver sido originado de um indivíduo no período de incubação ou na primeira semana da doença. Casos esporádicos têm sido relatados após transfusão sanguínea em neonatos, transfusão de plasma e de plaquetas e de fatores de coagulação e na população usuária de drogas injetáveis (PEREIRA; GONÇALVES, 2003).

O vírus entérico é muito resistente à inativação química e física, podendo permanecer nos alimentos após o preparo (CASAS; SUÑÉN, 2001). O longo período de incubação do vírus contribui com a dificuldade na associação da doença com o consumo do alimento contaminado (COELHO et al., 2003).

Um dos alimentos mais relacionados com a transmissão do HAV são os moluscos bivalves quando consumidos crus ou levemente cozidos, pois estes acumulam na massa visceral todos os agentes biológicos que se encontram na água onde vivem (CASAS; SUÑÉN, 2000; LEGEAY et al., 2000; GIRONES; LUCENA, 2000; MUNIAIN-MUJICA; ROMALDE et al., 2001; DI PINTO et al., 2003; HEWITT; GREENING, 2004).

## **2.4 Epidemiologia**

A avaliação da prevalência da infecção pelo HAV em uma população, é um importante subsídio para determinar a política que deverá ser implementada para controlar esta infecção, bem como a de outras infecções de transmissão oro fecal (PINHO et al., 1998).

O HAV tem distribuição mundial (DI PINTO et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2004), sendo o mais freqüente agente causador da hepatite humana e por isso, considerada um problema de saúde pública (GRAFF; TICEHURST; FLEHMING, 1993; ANON, 1998). A excepcional estabilidade do HAV, sua alta endemicidade em países em desenvolvimento e a grande mobilidade das populações na atualidade, contribuem para a difusão da doença. Além disso, a elevação da idade média dos pacientes acometidos pela hepatite A tende a aumentar a ocorrência da doença em idades produtivas e a demanda por internações hospitalares (GAZE; CARVALHO; WERNECK, 2002).

Em países pobres, com baixo índice de facilidades sanitárias, a infecção tem incidência muito alta ocorrendo precocemente e, mais de 90% das crianças têm

sorologia positiva para o HAV antes dos dez anos de idade, nestas regiões a hepatite aguda é menos freqüente nos nativos e as epidemias mostram-se raras (PEREIRA; GONÇALVES, 2003). Como a doença em crianças é, na maioria das vezes, assintomática, a detecção da existência do vírus nessas comunidades só é percebida por sorologia ou pelo aparecimento da doença em algum visitante (MELNICK, 1995).

Embora a hepatite A seja endêmica em países em desenvolvimento, sua prevalência tem declinado devido à melhoria das condições higiênicas e sanitárias e a aplicação de programas de saúde pública. Nessas regiões a hepatite aguda é mais freqüente, representando risco para os susceptíveis não vacinados e surtos epidêmicos podem ocorrer devido à contaminação acidental de alimentos e da água (KOFF, 1998; PINHO et al., 1998; VITRAL et al., 1998; ROMALDE et al., 2001; CHIRONNA et al., 2002).

A mudança no padrão epidemiológico da hepatite A vem ocorrendo em várias regiões do mundo, com aumento de adolescentes e adultos jovens susceptíveis, com idade crescente, aumentando o número de casos da doença nesse grupo etário, levantando a discussão da vacinação nessas regiões, tendo em vista que a gravidade da doença é maior em adultos (PEREIRA; GONÇALVES, 2003).

Em regiões desenvolvidas, com pouca migração, a incidência pode ser muito baixa e o pico de prevalência de pacientes com sorologia positiva para o HAV ocorre tardiamente, em adultos. Nessas áreas, a doença é muito pouco freqüente geralmente adquirida por pessoas que viajaram para áreas de maior endemicidade e

os surtos epidêmicos são raros (ROMALDE et al., 2001; GAZE; CARVALHO; WERNECK, 2002).

Na América Latina e no Brasil, estudos sobre este vírus têm demonstrado que a prevalência da exposição ao agente começa a sofrer um desvio de alta para média prevalência (PINHO et al., 1998; VITRAL et al., 1998; FERREIRA et al., 2002). A prevalência é maior na região norte do Brasil quando comparada com a região sul e sudeste (CLEMENS et al., 2000).

Segundo Clemens et al. (2000), a prevalência de anti-HAV total em algumas cidades brasileiras mostra padrões variáveis, sendo alta nas regiões Norte e Centro-Oeste, com padrões semelhantes aos observados em regiões subdesenvolvidas, e decrescente da região Sudeste para a região Sul, onde a prevalência na primeira década, mesmo nas populações de mais baixa renda era menor do que a observada na região Norte.

Segundo Seymour e Appleton (2001), o agente da hepatite A é o segundo vírus e o sexto agente infeccioso mais frequentemente envolvido em infecções veiculadas por alimentos contaminados nos EUA. Aproximadamente 7% dos casos de infecção por HAV no mundo são associados com o consumo de moluscos (MUNIAIN-MUJICA; GIRONES; LUCENA, 2000; DE MEDICI et al., 2001).

Como a incidência de hepatite A em países desenvolvidos tem decaído, o número de indivíduos susceptíveis aumentou e, portanto, a possibilidade de ocorrerem epidemias, principalmente onde a fonte de infecção são alimentos, também aumentou (MELNICK, 1995; SEYMOUR; APPLETON, 2001). Nesses casos de epidemias muitas vezes os alimentos contaminados são aqueles importados de



países em desenvolvimento, onde há ocorrência da hepatite A endêmica, uma vez que o vírus permanece infectante após refrigeração e congelamento (SEYMOUR; APPLETON, 2001).

Em 1988, o consumo de moluscos contaminados foi apontado como causa de mais de 300.000 casos de infecção por HAV em Xangai, China (DE MEDICI et al., 2001).

Na Itália, de acordo com o Sistema Epidemiológico Integrado para Hepatite Viral Aguda (SEIEVA), no período de 1995 a 1997, 71% dos casos notificados de hepatite viral aguda foram causados pelo HAV, e o consumo de moluscos foi responsabilizado por 72% destes casos no sul da Itália (DE MEDICI et al., 2001).

Em setembro de 1999, um importante surto de hepatite A atingiu 188 pessoas em Valença, Espanha, uma área não endêmica para esta doença. Estudos demonstraram a associação com o consumo de moluscos importados do Peru (ROMALDE et al., 2001).

No Brasil as enfermidades de origem alimentar não são de notificação compulsória, o que compromete a real avaliação do problema no país (SOARES; GERMANO, 2004).

Na epidemiologia e avaliação de risco, verifica-se que a dose infecciosa mínima de alguns vírus entéricos, aproxima-se da dose mínima detectável em ensaios laboratoriais, utilizando cultura de células (MELNICK, 1995).

A maioria dos pesquisadores recomenda como medida de controle de qualidade sanitária do pescado, evitar a contaminação fecal direta ou indireta. No caso dos moluscos, a vigilância das áreas onde são capturados, utilizando os indicadores de sanidade (bactéria), e a autodepuração, utilizando água hiperclorada (BARROS; MENDES; SANTOS, 2002; SOARES; GERMANO, 2004).

## **2.5 Relação do Pescado com a Hepatite A**

Segundo o artigo 438 do Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal (MINISTÉRIO, 1998), a denominação genérica pescado compreende os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada usados na alimentação humana.

Em nutrição humana, o peixe constitui fonte de proteínas de alto valor biológico, tão importante quanto à carne bovina (LEDERLE, 1991). Em muitos países, principalmente da Europa e da Ásia, é a proteína de origem animal mais consumida (GERMANO, P.; GERMANO M.; OLIVEIRA, 1998).

Como todos os animais, os peixes sofrem de bacterioses, viroses, parasitoses, e podem ser portadores de biotoxinas e, ao se transformarem em alimentos, não somente podem provocar no consumidor problemas sanitários de origem biológica, mas também abióticos, quando as causas envolvem contaminação por metais pesados, resíduos elevados de praguicidas e contaminação por radioisótopos (CONSTANTINIDO, 1994). Pescados têm sido relacionados com toxinfecções, principalmente quando são vendidos em locais com baixas condições sanitárias (GASPAR; VIEIRA, 1997).

As viroses entéricas são as principais causas de doenças virais transmitidas pelo consumo de pescado. Apenas alguns vírus causam efetivamente problemas ao consumidor como o HAV, norwalk, calicivírus e astrovírus (LEGEAY et al., 2000). O HAV pode ser encontrado em águas poluídas e contaminadas por esgotos, e embora não causem patologia no pescado, estes podem veicular a infecção para o homem (CUYCK et al., 1994).

Uma fonte de contaminação importante é o manejo do pescado, desde o momento da captura, ainda nos barcos pesqueiros, até sua destinação final, após passar por inúmeras fases de processamento e transporte (CARDONHA; CASEMIRO; VIEIRA, 1994). No caso particular da pesca marítima, a captura em águas costeiras oferece maiores riscos do que a realizada em alto mar (LIMA, 1997).

Moluscos bivalves são os maiores veículos do vírus da hepatite A (ROMALDE et al., 2001; DI PINTO et al., 2003; HEWITT; GREENING, 2004). Entre eles, a classe *Bivalve* também chamada *Pelecypoda* é formada por moluscos conhecidos por bivalves tais como mexilhões, ostras, vieiras, abalones e outros mariscos. No Brasil, estão distribuídos em 44 famílias com 379 espécies (BARROS; MENDES; SANTOS, 2002).

Os moluscos bivalves alimentam-se de matéria orgânica. Através das brânquias filtram cerca de 19 a 50L/h com alguma ou nenhuma capacidade seletiva acumulando na massa visceral, lúmen do intestino e hepatopâncreas, todos os agentes biológicos e abióticos que se encontram na água onde vivem. As partículas de alimentos são presas pelo muco espalhados pelas lamelas branquiais concentrando-se assim nos tecidos dos músculos (BOFFI, 1979; BEIRÃO; TEIXEIRA; MEINERT, 2000).

No Brasil, o universo de consumidores divide-se em dois pólos distintos; a população de baixa renda, que habita regiões ribeirinhas ou litorâneas; e, a de alta renda, que tem no pescado um alimento que permite manter uma dieta rica em nutrientes e com baixos índices calóricos e, portanto, melhor para a saúde (GERMANO, P.; GERMANO, M.; OLIVEIRA, 1998).

O hábito de ingerir peixes, em especial crus, é de introdução recente no cardápio dos estabelecimentos de alimentos, nas grandes cidades brasileiras. As lojas especializadas em *sashimi* e *sushi*, anteriormente restritas a regiões onde predominavam imigrantes asiáticos, tornaram-se comuns nos bairros das classes mais elevadas, estando presentes em quase todos os shoppings dentro da categoria dos *fast food*, havendo até as lojas especializadas na modalidade de entregas a domicílio (SOARES; GERMANO, 2004).

O conhecimento das enfermidades transmitidas pelo pescado, para o efetivo controle na origem, é uma exigência das grandes entidades mundiais que, através de normas legais, estabelecem o controle obrigatório dos produtos da pesca destinados ao consumo. Na Europa, onde o consumo por pessoa, anual do pescado atinge 19 kg, desde 1991, segue procedimentos chamados de "Filière Qualité Controlée" (Procedimento de Qualidade Controlada) que envolve condições de cultivo, método de sacrifício, tipos de procedimentos, atendendo assim, as exigências dos consumidores na busca de produtos de sanidade garantida (BARROS et al., 2002).

Na União Européia, a legislação que regula o consumo de moluscos apenas especifica parâmetros bacteriológicos para determinar a liberação dos mesmos para consumo (DE MEDICI et al., 2001). Desta maneira, é necessário que o

pescado seja testado para a presença de vírus entéricos para garantir a segurança do consumo pela população (CASAS; SÜÑÉN, 2001).

O Código de Regulamentação Federal dos Estados Unidos não permite importação de produtos da pesca que não sejam elaborados sob sistema de Boas Práticas de Fabricação e Procedimentos Padrões de Higiene Operacional, que na realidade são pré-requisitos do "Sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle" (APPCC), garantindo em qualquer indústria de alimentos a qualidade sanitária e comercial de seus produtos. A Argentina, país membro do Mercosul exporta para a Europa, utilizando normas que controlam a origem dos produtos da pesca, através dos profissionais Médicos Veterinários (BARROS; MENDES; SANTOS, 2002).

A grande maioria dos países que exportam produtos da pesca "in natura", ou processados, realiza o controle higiênico, sanitário e tecnológico buscando oferecer ao consumidor um produto de qualidade (DE MEDICI et al., 2001).

## **2.6 Técnica de RT-PCR utilizada na detecção do HAV**

Tanto as hepatites de transmissão enteral, A e E, quanto as de transmissão parenteral, B e C, apresentam elevada frequência de infecções inaparentes e alto custo de diagnóstico etiológico, o que dificulta a realização de estudos que permitam conhecer a sua magnitude e monitorar sua ocorrência, para subsidiar estratégias de prevenção e controle (WHO, 1996; WAKIMOTO; MARZOCHI; HARTZ, 1998; GAZE; CARVALHO; WERNECK, 2002; ).

O HAV não tem sido isolado de alimentos associados a surtos de hepatite A. Devido ao longo período de incubação, o alimento suspeito normalmente não está mais disponível para análise na época dos surtos. Não se dispõe de métodos adequados para testes de rotina em alimentos, contudo, métodos moleculares sensíveis, já utilizados para detectar o HAV na água, poderiam ser úteis na detecção deste vírus em alimentos (FORSYTHE, 2002). A Reação em Cadeia pela Polimerase por Transcriptase Reversa (RT-PCR) demonstrou, no estudo de Chironna et al. (2002), ser uma técnica sensível para a detecção do HAV em mexilhões.

Os métodos tradicionais para detecção de vírus entéricos humanos em pescado utilizam ensaios de infectividade em culturas celulares. Tais métodos, apesar de serem os únicos que revelam a ausência de infectividade, são limitados pela baixa sensibilidade e nem sempre são suficientes para detectar presença de baixa concentração viral. O tempo de análise é muito longo e a susceptibilidade das linhagens celulares em detectar muitos vírus entéricos epidemiologicamente importantes é baixa (CROMEANS; NAINAN; MARGOLIS, 1997; ROMALDE et al., 2002).

Técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia pela Polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR), apresentam alta especificidade e sensibilidade na detecção de vírus entéricos (SHIEH et al., 1999; CASAS; SUÑÉN, 2001; SCHWAB et al., 2001; CHIRONNA et al., 2002). Desta forma, então, métodos eficientes de extração do RNA do HAV em amostras ambientais e clínicas visando o diagnóstico molecular, especialmente em áreas endêmicas para o HAV, como o Brasil, torna-se relevante (DE PAULA; VILLAR; GASPAR, 2003).

A RT-PCR tem sido utilizada com sucesso na detecção de vírus entéricos em pescado (LEGEAY et al., 2000; MUNIAIN-MUJICA; GIRONES; LUCENA, 2000; KINGSLEY; RICHARDS, 2001; ROMALDE et al., 2001; DI PINTO et al., 2003; HEWITT; GREENING, 2004). É um método rápido e econômico que pode ser aplicado para detecção de vírus de difícil ou impossível replicação em cultivos celulares. As maiores limitações para a aplicação da RT-PCR na detecção de vírus entéricos humanos em amostras de pescado são as dificuldades em remover substâncias inibidoras da amplificação, a baixa sensibilidade pelo fato que apenas um pequeno volume da amostra pode ser analisado, e a incapacidade de discernir entre vírus infectante e não infectantes. Diversos procedimentos de extração, concentração e purificação têm sido desenvolvidos para superar estes problemas e executar a amplificação de vírus em pescado pela RT-PCR (TRAORE et al., 1998; ARNAL et al., 1999; CASAS; SUÑÉN, 2001).

A maioria dos procedimentos requer extensas etapas de processamento, o que acarreta a diminuição da sensibilidade na detecção viral em pescado, porque durante a manipulação há uma perda viral. A extração do RNA imediatamente anterior a RT-PCR mostra um aumento na sensibilidade, bem como uma remoção dos inibidores residuais. Diversos métodos para extração de RNA do pescado têm sido descritos (CUYCK et al., 1994; DE MEDICI et al., 2001; DI PINTO et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2004).

Casas e Suñén (2001) avaliaram um método mais simples e efetivo para extração, concentração e purificação de vírus entérico intacto das amostras dos tecidos de mexilhões, por RT-PCR. Para tal, os mexilhões foram processados por eluição alcalina, precipitação em polietileno glicol (PEG), extração em solvente e

nova precipitação em PEG. Os concentrados finais foram avaliados pela infectividade e por RT-PCR após extração do ácido nucléico. Dois métodos de extração de RNA foram avaliados comparativamente para remoção de substâncias inibidoras: extração por tiocinato de guanidina e isolamento pelo sistema Purescript<sup>R</sup> (Invitrogene). Ambos os procedimentos removeram a maioria dos inibidores, permitindo a detecção do RNA viral em níveis de inóculos tão baixos quanto 4 unidades formadoras de placas por grama (PFU/g) para poliovírus. Os inibidores restantes foram eficientemente removidos por cromatografia em coluna sephadex antes da extração do RNA. O método mostrou-se rápido, seguro e de fácil execução.

Pelo fato do HAV ser a maior causa de hepatite infecciosa no mundo, a sua detecção em água ou alimentos contaminados é uma área prioritária nas pesquisas laboratoriais. Um entrave para a utilização da técnica de RT-PCR na detecção do vírus em pescado era a impossibilidade de distinguir entre vírus infectante e inativado. Bhattacharya et al. (2004) estudaram amostras virais inativadas por calor e por Ultra Violeta (UV) que produziram uma reação mais fraca que as amostras de culturas celulares paralelamente infectadas. A menor reação é provavelmente o resultado da perda de RNA viral traduzido por RT-PCR. A correlação entre a infectividade e a reação em PCR foi melhor demonstrada pela inativação por UV do que pelo tratamento térmico. Tal procedimento poderia ser adaptado para outros vírus.

Trinta e cinco amostras de mexilhões coletadas de áreas com dois níveis diferentes de poluição fecal foram analisadas para colifagos somáticos, fagos F-RNA e bacteriófagos infectando *Bacteróides fragilis* HSP40 e RYC2056, utilizando protocolos reconhecidos, e para enterovirus, adenovirus humano e HAV por Nested-PCR e RT-PCR. Quatro métodos para isolamento viral do pescado foram



acompanhados. O primeiro método foi baseado em tampão borato com pH 9,5 como eluente, o segundo foi baseado em tampão glicina com pH 10 como eluente, o terceiro método foi baseado em tampão glicina com pH 7,5 e mudanças na condutividade, e o quarto método em caldo nutritivo com tween 80 como eluente. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e o método baseado no tampão glicina com pH 10 demonstrou ser o mais eficiente e útil para o isolamento de fagos e vírus humanos. Os resultados também mostraram uma diferença na proporção viral em relação à fonte de poluição fecal estar perto ou distante da área de criação do pescado (MUNIAIN-MUJIKÁ; GIRONES; LUCENA, 2000).

Evidências epidemiológicas ligando a transmissão de doenças por vírus entérico ao pescado são conhecidas há muito tempo. Uma variedade de métodos foram descritos para a detecção de contaminantes virais em pescados utilizando-se de RT-PCR. Porém, tal método geralmente inclui numerosos passos, demorados e cansativos para a extração viral dos tecidos de pescados e o isolamento do RNA viral. Um procedimento simplificado baseado na liquefação enzimática dos tecidos digestivos de pescados sem nenhuma etapa de homogenização mecânica, seguido por uma clarificação simples por lisado, com extração por diclorometano, foi descrito. O RNA viral foi isolado diretamente do extrato de pescado pelo método de extração por tiocianato de guanidina sílica, adaptado para o uso em vários sistemas a vácuo. Ensaio de RT-PCR para vírus específicos foram estabelecidos para detecção de seqüências genômicas de vírus como o HAV, Astrovirus e Norwalk (de genogrupos I ou II). A especificidade das amplificações foi finalmente confirmada pela hibridização com sondas específicas. O procedimento total aplicado nas amostras de pescados contaminados com HAV permitiu uma detecção a 20 PFU de HAV por grama de

hepatopâncreas. Além disso, mais de vinte amostras podem ser testadas em 24 horas (LEGEAY et al., 2000).

De Medici et al. (2001) analisaram 142 amostras por RT-nested-PCR (89 mexilhões e outros 53 moluscos bivalves), 49 (34,5%) foram positivos para HAV-RNA e 93 (65,5%) foram negativos. Das amostras positivas, 18 (12,7% do total das amostras) demonstraram a presença de vírus infectante quando examinadas usando o método integrado. HAV-RNA foi detectado após a fase nested em cada uma das amostras positivas, com alta quantidade de RNA viral, detectada após um único ciclo de amplificação (RT-PCR) e nenhum vírus infectante foi detectado nestas amostras.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Desenvolver um método molecular (RT-PCR) de detecção do vírus da hepatite A em pescado.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Cultivar as células FRhK-4
- Produzir e purificar o vírus HAV amostra HAF-203
- Isolar os RNAs virais
- Analisar as seqüências do gene VP1 do nucleocapsídeo do HAV
- Obter os fragmentos do cDNA viral para a Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)
- Padronizar a reação de RT-PCR anti-HAV
- Confirmar, por fragmentação enzimática, o Amplicom
- Analisar a sensibilidade da reação de RT-PCR utilizando diluições do RNA vírico

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Cultivo celular**

Células renais do feto de macacos do gênero Rhesus (FRhK - 4) foram cultivadas a 37°C em garrafas Falcon de 175 cm<sup>2</sup> contendo meio E de Williams, suplementado com soro fetal bovino inativado pelo calor, 2mM de L-glutamina, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais MEM, 25mM de HEPES, 0,18% de bicarbonato de sódio, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Todos os reagentes, meios e drogas foram adquiridos da Sigma Chemical Co., exceto o soro fetal bovino (FSB), que foi produzido pelo Cultilab, Campinas SP.

### **4.2 Isolamento do vírus**

A amostra de HAV, nomeada HAF-203, foi obtida de um paciente em fase aguda inicial de hepatite A. Nessa ocasião, uma amostra de sangue foi coletada e anticorpos IgM anti-HAV foram detectados no soro por ensaio imunoenzimático (EIA). Uma suspensão fecal foi preparada a 10% (m/v) em meio E de Williams com penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), submetida a centrifugação em baixa velocidade e filtrada em uma membrana de 0,45 µm.

### **4.3 Inóculo do HAV**

Culturas de células confluentes, na 43<sup>a</sup> passagem, foram lavadas com solução salina balanceada de Hanks e inoculadas com 2 ml de suspensão fecal a

10%. Após 1 hora de adsorção viral a 37°C, o inóculo foi transferido para um meio E de Williams contendo FBS a 2%. O meio foi substituído em intervalos de 2 semanas.

Passagens sucessivas foram realizadas e o vírus foi obtido tanto de fluido de cultivo tecidual (TCF) de culturas de células infectadas, como de células lisadas (CL) obtidas após 3 ciclos de congelamento-descongelamento seguidos de centrifugação a baixa velocidade a fim de remover os debris celulares.

#### **4.4 Extração do RNA da amostra viral**

Foram adicionados 20 µl de tampão Tris-EDTA pH 8,0, 80 µl de Proteinase K e 100 µl da suspensão viral a um tubo de microcentrífuga de 1,7mL. Aqueceu-se a solução em banho-maria a 45°C por 1 hora, transferindo-se esta imediatamente para banho de gelo.

Em seguida foi adicionado igual volume (200µl) de 1:1 fenol-clorofórmio para a extração e os tubos submetidos a agitação em vórtex. A solução foi colocada em microcentrífuga a 14.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. Cuidadosamente, a fase superior aquosa foi transferida para tubo novo, e a fase orgânica e a interface foram descartadas. Este processo foi repetido 3 vezes.

À fase aquosa recuperada das extrações foi adicionada um décimo de volume (20 µL) de acetato de potássio 5M, pH 5. Após 10 minutos em banho de gelo, adicionou-se 1000 µL de etanol 100%, seguido por inversão dos tubos e congelamento a -20°C por 18 horas. Para obtenção dos RNAs, os tubos foram centrifugados em microcentrífuga a 14.000 rpm por 1 hora. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente por 30 segundos. O RNA foi

ressuspenso em 20 µL de água tamponada com dietilpirocarbonato (DEPC) e conservado a –20°C até o momento do uso.

#### **4.5 Análise da seqüência do gene VP1 do nucleocapsídeo do HAV**

A seqüência do gene da VP1 do HAV foi obtida no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), que é um centro de informação biotecnológica, criado pelo governo americano em 1988, que gera banco de dados de domínio público com acesso via internet por meio da página eletrônica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, desenvolve programas para análise de dados, como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e ORF *Finder*, e mantém intercâmbio de dados com outros centros de pesquisa internacionais através de atualizações diárias.

As opções de BLAST utilizadas foram, a BlasTN que confronta a seqüência de nucleotídeos a ser analisada contra as seqüências de nucleotídeos disponíveis na base de dados do NCBI, e a BlastX que confronta a seqüência de nucleotídeos a ser analisada contra as seqüências de proteínas disponíveis na base de dados do NCBI.

A similaridade entre diferentes seqüências de aminoácidos e entre suas respectivas seqüências de nucleotídeos, obtidas no NCBI foi examinada por meio do programa CLUSTAL W (Multiple Sequence Alignments – <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Este programa produz alinhamento biologicamente significativo de diversas seqüências de DNA ou de proteínas, calcula o melhor pareamento para as seqüências escolhidas e as alinha de forma que as similaridades e diferenças possam ser observadas.

Um par de oligonucleotídeos iniciadores foi desenhado levando-se em consideração regiões mais conservadas do gene VP1 do HAV. O cálculo da temperatura de anelamento/dissociação ( $T_m$ ) para cada oligonucleotídeo, nas condições dos tampões utilizados nas reações de PCR, foi feito utilizando-se a fórmula simplificada:  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$  (AUSUBEL et al., 1992).

#### 4.6 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA seguiu o protocolo do sistema SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Invitrogen). Após a reação de transcrição reversa, adicionou-se 1 µL (2 unidades) de RNase T, aquecendo-se a mistura a 37°C durante 20 minutos e resfriada em banho de gelo. O material foi extraído com fenol-clorofórmio (1:1v/v) em igual volume por uma vez, seguido da adição de um décimo de volume (20 µL) de acetato de potássio 5M, pH 5,0. Após 10 minutos em banho de gelo, adicionou-se 50 µL de etanol 97%, seguido por congelamento a -20°C por 18 horas. Para obtenção dos cDNAs, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 hora. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente por 30 segundos. O cDNA foi, então, ressuspensão em 20 µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e conservado a -20°C até o momento do uso.

#### 4.7 PCR da amostra

O PCR teve como finalidade amplificar uma região específica do gene da VP1 do HAV. Para tanto, foram desenvolvidos os seguintes *primers*: LVCHAV01-F 5'atggatgtttcaggagtacaag3', LVCHAV02-R 5'aaccatgaggaggattagagg3',

LVCHAV03-F 5'gttgagatgattctggagg3', LVCHAV04-R 5'ctcaaacttttatcttctctg3',  
LVCHAV05-F 5'ccaagttggtataacaacatg3', LVCHAV06-R 5'aatagacatatgatctgatgatg3',  
LVCHAV07-F 5'gctatcacaacaattgaggatc3' e LVCHAV08-R 5'gtctccagctgcaattctgc3'.

O ciclo térmico foi constituído de 3 estágios: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de decréscimo da temperatura para 80° por 30 segundos “Hot Start” (ERLICH; GELFAND; SNINSKY, 1991); um segundo estágio composto de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 53 °C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e meio; e um estágio de extensão final a 72°C por 5 minutos. O material amplificado foi mantido a 4°C até o momento da corrida eletroforética. Esta foi realizada em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato EDTA 1X por cerca de 2 horas e meia a 110 V. O produto amplificado foi visualizado em transluminador UV (VILBER LOURMAT) após a coloração do gel por brometo de etídio (10 µL da solução de 10mg/ml) e comparado com fragmentos de 100 bp DNA Ladder.

#### 4.8 Restrição enzimática

Para a confirmação da especificidade do produto amplificado, o *amplicon* foi purificado pelo sistema CONCERT™ Rapid Gel Extraction System (Life Technologies). Para a realização da digestão enzimática por *Bam* H I e *Hae* III, foram adicionados, à 10 µL da suspensão de DNA, 10 µL de água ultrapura, 2 µL do tampão de reação (REACT 3® para *Bam* H I e REACT 2® para *Hae* III) e 50 unidades (1 µL) da enzima, totalizando um volume final de 20 µL. As reações foram incubadas por 2 horas a 37° C, sendo a restrição interrompida a 75° C por 10 minutos.



Os produtos da digestão foram visualizados após corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 5% em tampão Tris-Borato EDTA 1X por cerca de 1 hora e meia a 108 V, corado pela prata segundo o sistema da Amersham Biosciences modificado.

#### **4.9 Análise de Sensibilidade da Reação de RT-PCR**

Foram coletados dois gramas de quatro amostras de file de peixe comercializado em supermercados de Aracaju-SE, duas amostras de linguado (*Paralichthys brasiliensis*) e duas amostras de badejo (*Mycteroperca bonaci*) devidamente inspecionadas pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (MARA). Em cada amostra coletada e mantida congelada a  $-20\text{ C}^0$ , foram adicionados a cada amostra 20  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA pH 8,0, 80  $\mu\text{L}$  de Proteinase K e 100  $\mu\text{L}$  da suspensão viral a um tubo de microcentrifuga de 1,7mL. Aqueceu-se a solução em banho-maria a  $45^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, transferindo-se esta imediatamente para banho de gelo. Foram realizadas diluições sucessivas em escala decimal até  $1 \times 10^{14}$  em cada amostra. Em seguida foram realizados os mesmos procedimentos anteriormente descritos para obtenção do cDNA e da PCR. Os produtos amplificados foram visualizados em transluminador UV (VILBER LOURMAT) após a coloração do gel por brometo de etídio (10  $\mu\text{L}$  da solução de 10mg/mL) e comparado com fragmentos de 100 bp DNA Ladder.

## **5 RESULTADOS**

Foram utilizados com sucesso o cultivo dos clones da linhagem de células renais do feto de Rhesus, FRhK - 4 (CDC, Atlanta USA), bem como da amostra viral, gentilmente cedida pelo Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz – RJ, nas pessoas de Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr e Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar.

Foram obtidas amostras de RNA total e mensageiro em quantidade e qualidade satisfatórias aos ensaios moleculares tendo em vista que os *amplicons* foram obtidos com sucesso.

A análise do genoma do vírus demonstrou que a seqüência nucleotídica do gene VP1 é a mais adequada para servir como alvo da amplificação.

Baseando-se na seqüência nucleotídica do gene VP1 descrita por Cohen et al. em 1987 (número de acesso no GenBank NCBI NC\_001489), foram desenvolvidos 8 *primers* (Tabela 1), com mínimas possibilidades de amplificação de contaminantes e alta sensibilidade em ensaios de homologia em bancos de dados.

A temperatura de anelamento ( $T_m$ ) para os iniciadores sintéticos desenvolvidos esteve no intervalo teórico ótimo para PCR (ABD-ELSALAM, 2003), como consta na Tabela 1. O fato destes possuírem a mesma  $T_m$  teórica também é importante para favorecer um anelamento simétrico.

**Tabela 1** – Características dos primers utilizados na amplificação de um fragmento da amostra HAF-203 do HAV

<b>Primer</b>	<b>Seqüência (5' – 3')</b>	<b>Gene</b>	<b>Localização</b>	<b>Tm</b>
<b>LVCHAV01-F</b>	<b>ATGGATGTTTCAGGAGTACAAG</b>	<b>VP1</b>	<b>118-139</b>	<b>57° C</b>
<b>LVCHAV02-R</b>	<b>AACCATGAGGAGGATTAGAGG</b>	<b>VP1</b>	<b>367-347</b>	<b>57° C</b>
<b>LVCHAV03-F</b>	<b>GTTGGAGATGATTCTGGAGG</b>	<b>VP1</b>	<b>1-20</b>	<b>55° C</b>
<b>LVCHAV04-R</b>	<b>CTCAAATCTTTTATCTTCCTCTG</b>	<b>VP1</b>	<b>900-878</b>	<b>57° C</b>
<b>LVCHAV05-F</b>	<b>CCAAGTTGGTATAACAACCATG</b>	<b>VP1</b>	<b>63-84</b>	<b>57° C</b>
<b>LVCHAV06-R</b>	<b>AATAGACATATGATCTGATGTATG</b>	<b>VP1</b>	<b>255-232</b>	<b>57° C</b>
<b>LVCHAV07-F</b>	<b>GCTATCACAACAATTGAGGATC</b>	<b>VP1</b>	<b>151-172</b>	<b>57° C</b>
<b>LVCHAV08-R</b>	<b>GTCTCCAGCTGCAATTCTGC</b>	<b>VP1</b>	<b>849-830</b>	<b>57° C</b>

Apesar de os *primers* LVCHAV05-F, LVCHAV06-R, LVCHAV07-F e LVCHAV08-R possuírem alta sensibilidade e especificidade e ótimo valor de Tm, sua utilização foi preterida devido a alta probabilidade de auto-hibridização.

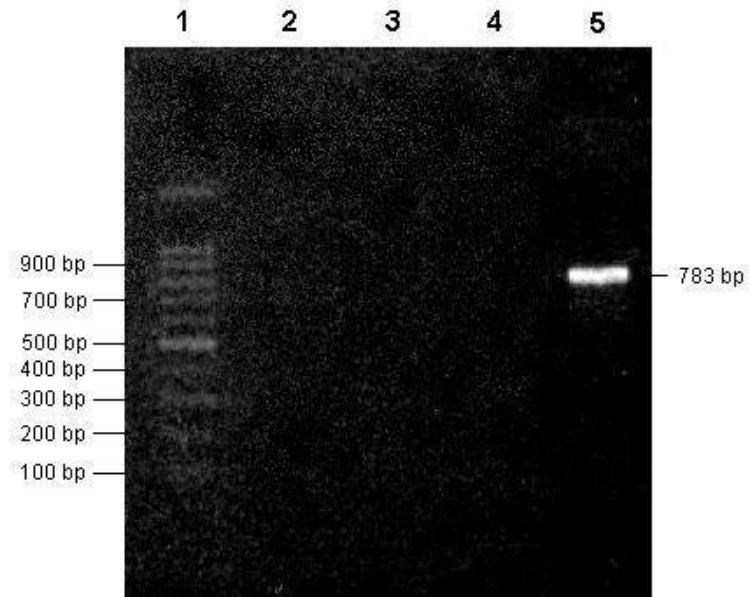
O par de *primers* LVCHAV03-F e LVCHAV04-R, que amplifica o gene completo da VP1, não é 100% específico para o vírus da hepatite A: o LVCHAV03-F também apresenta homologias com *Caenorhabditis elegans*, *Haemophilus ducreyi*, *Arabidopsis thaliana*, vírus Influenza A, DNA de *Zebrafish*, *Phaseolus vulgaris*, *Gallus gallus*, *Lotus corniculatus*, *Homo sapiens*, DNA humano e *Mus musculus*; enquanto o LVCHAV04-R apresenta homologia com *Medicago trunculata*.

No ciclo térmico, aplicando-se a estratégia de “Hot Start” obtiveram-se fragmentos de produto amplificado próximo do tamanho teórico esperado.

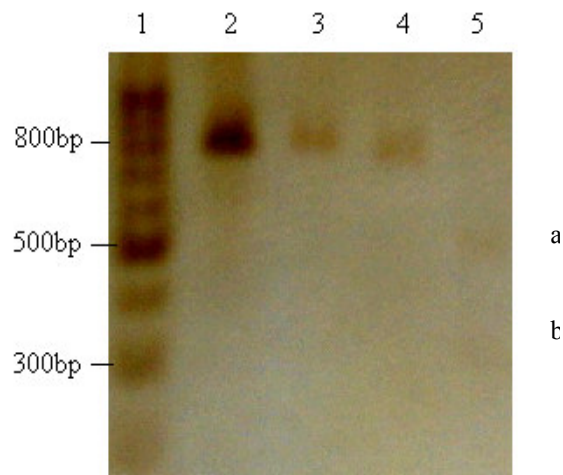
Após a realização do RT-PCR, foi visualizada uma banda intensa e bem delineada na quinta canaleta (Figura 2), onde foi depositado o produto da reação utilizando os *primers* LVCHAV01-F e LVCHAV04-R. Pela análise do gel, o produto amplificado obtido tem tamanho da ordem de 783 pb, o que satisfaz a expectativa da análise computacional para este par de *primers* e confirma que este produto obtido foi gerado a partir de cDNA viral. Apesar de a estratégia adotada não ter priorizado a amplificação de produtos grandes, este resultado aponta para uma grande sensibilidade do par de *primers* supracitados.

A confirmação da especificidade do produto foi obtida a partir da digestão do produto purificado no gel de agarose pelas enzimas *Bam* H I e *Hae* III, gerando o perfil de restrição esperado, visualizado em gel de poliacrilamida (FIGURAS 2 E 3).

As análises de sensibilidade constataram uma possibilidade de detecção de até 1 PFU/g nas amostras artificialmente contaminadas.



**FIGURA 2.** Gel de agarose 2%, TBE 1 X, 110V 2 horas. Canaleta 1: marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder. Canaletas 2, 3 e 4 controles negativos (produtos amplificados das reações de RT-PCR utilizando DNA de HSV-1, BHV-1 e BHV-5 respectivamente). Canaleta 5: produto amplificado da reação de RT-PCR com 783bp.



**FIGURA 3.** Gel de poliacrilamida 5%, TBE 1 X, 108V 1 hora e 30 minutos. Canaleta 1: marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder. Canaleta 2: amplicon da reação de 783bp. Canaleta 3: Amplicon purificado. Canaleta 4: produto da digestão com *Bam* H I (732bp). Canaleta 5: produto da digestão com *Hae* III (a300bp e b431pb)

## 6 DISCUSSÃO

Uma variedade de métodos tem sido descrita com relação ao processamento e isolamento de RNA viral obtido de tecidos de pescados que promovem uma adequada amplificação (MARGOLIS, 1997; COELHO et al., 2003; CROMEANS; NAINAN; DE PAULA et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2004).

A maioria dos métodos de detecção virológica apresenta fatores limitantes para a análise de amostras, sendo complexos e geralmente incluindo numerosas etapas, demandando tempo e custos para o isolamento do vírus em pescados (DE MEDICI et al., 2001; DE PAULA et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2004;).

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada na biologia molecular para detecção e diferenciação de microrganismos. No entanto, cada amplificação de DNA *in vitro* precisa ser otimizada através da seleção de *primers* adequados e da confecção de protocolos que possibilitem a execução de uma reação com alta eficiência, ou seja, com altas especificidade e sensibilidade.

Hábitos alimentares anteriormente atribuídos somente a culturas orientais, como o consumo de filé de peixe cru ou semi-cozido têm difundido-se a outras culturas. Da mesma forma houve um crescimento na piscicultura e uma elevação na manipulação dos peixes no seu beneficiamento, favorecendo a contaminação dos mesmos, o que leva o peixe ao mesmo status dos moluscos bivalves como veículo potencial do HAV.

Quase a totalidade dos trabalhos publicados em relação à transmissão do HAV pelo pescado é associado ao consumo de moluscos bivalves consumidos crus

ou semicozidos (TICEHURST; FLEHMING, 1993; LEGEAY et al., 2000; LUCENA, 2000; DE MEDICI et al., 2001; SCHWAB et al., 2001; COELHO et al., 2003; DE PAULA et al., 2003; DI PINTO et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2004). Isto implicou em diversos procedimentos de detecção do HAV por RT-PCR nestas espécies. Este trabalho demonstrou com eficiência o desenvolvimento de uma técnica molecular de detecção do HAV anteriormente descrita somente em moluscos, realizada com filé de peixe.

A concentração de RNA total e mensageiro obtida neste estudo foi satisfatória. Tal fato pode ter ocorrido devido a eficiente remoção dos inibidores promovida pela série de centrifugações e utilização dos tampões e inibidores de RNAses. O método de extração com fenol-clorofórmio utilizado em nossos experimentos, já havia sido descrito com sucesso por Shieh, Calci e Baric (1999). A utilização da Proteinase K para extração do RNA mostrou-se eficiente, confirmando o trabalho realizado por De Paula et al. (2003) que analisou quatro métodos de extração de RNA, utilizando Proteinase K, Silica, TRIzol e Isotiocianato de guanidina, dos quais o primeiro foi o melhor método para amostras de soro sanguíneo.

A escolha do gene VP1 se justifica pelo fato de VP1 ser a proteína de superfície mais acessível nas partículas maduras dos Picornaviridae, o que a torna a principal proteína responsável pela imunogenicidade do vírus. Além disso, estudos de evolução molecular mostraram recentemente que a seqüência completa da VP1, com 900 bp (COHEN et al., 1987), é necessária para uma adequada caracterização dos Picornavírus humanos e símios. Estando a seqüência de VP1 dos enterovírus de alguma forma relacionada com sorotipagem, a seqüência de VP1 pode ser utilizada como base molecular para genotipagem (COSTA-MATTIOLI et al., 2003).

Como os *primers* serão utilizados para fins diagnósticos, faz-se imprescindível que sejam mínimas as possibilidades de amplificação de qualquer organismo que possa atuar como contaminante, entre os quais se destacam outros microrganismos que apresentem fisiopatologia semelhante, organismos aquáticos, *Drosophila melanogaster* e ainda o DNA humano. Tal característica, entretanto, não foi priorizada nos iniciadores sintéticos já existentes na literatura consultada, os quais apresentam grande homologia com esses organismos citados, tendendo a restringir seu espectro de ação diagnóstica. Todos os *primers* confeccionados, exceto o LVCHAV03-F e LVCHAV04-R, são 100% específicos para o vírus da hepatite A, ou seja, a análise computacional demonstrou que nenhuma seqüência de outro organismo seria amplificada pela PCR. Para tanto, um fragmento significativo na porção intermediária do código não pôde ser utilizada pela alta homologia com DNA humano e organismos aquáticos. Além de apresentar 100% de especificidade, estes *primers* são altamente sensíveis, visto que são capazes de amplificar praticamente todas as amostras já depositadas no GenBank NCBI até o presente momento (último acesso ao GenBank NCBI 14/10/2004).

Outro fator importante que deve ser levado em consideração é a probabilidade de auto-hibridização, que foi minimizada visto que sua ocorrência implicaria na redução do número de cópias de primers disponíveis para hibridizar com o DNA molde, além de favorecer o surgimento de bandas inesperadas.

O ciclo térmico utilizando-se da estratégia de “Hot Start”, inicialmente descrito por Erlich, Gelfand e Sninsky (1991), que visa a preservação da enzima Taq DNA Polimerase, também foi aplicado com sucesso no trabalho de Coelho et al., em 2003.



A temperatura teórica de anelamento ( $T_m$ ) é uma estimativa da temperatura real em que um determinado *primer* irá hibridizar com o DNA molde. Para se obter uma boa estimativa, utiliza-se uma temperatura de anelamento de 5°C inferior à temperatura de melting (INNIS e GELFAND, 1990), que é dada pela equação  $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$ , onde A+T é a quantidade de bases A ou T da seqüência iniciadora e C+G é a quantidade de C ou G.

A  $T_m$  para todos os iniciadores sintéticos desenvolvidos está dentro do intervalo teórico ótimo para PCR, que é entre 52°C e 58°C (ABD-ELSALAM, 2003), como consta na Tabela 1. O fato de todos os iniciadores possuírem aproximadamente a mesma  $T_m$  também é importante para favorecer um anelamento simétrico e permitir a utilização de uma mistura com vários pares de iniciadores em uma mesma reação de PCR. A  $T_m$  deste trabalho foi escolhida diferentemente do que normalmente é preconizado para reações de padronização (não houve um aumento gradual da  $T_m$ ), de modo que pudesse ser um fator a mais para testar a sensibilidade dos *primers*.

A análise computacional nos permite afirmar que todos os outros *primers* apresentam também chances teóricas ótimas de amplificação. A não visualização das bandas amplificadas no gel de agarose torna imprescindível a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida para a explicação exata deste acontecimento, uma vez que este sistema permite a visualização de fragmentos em menor número de cópias, de forma mais sensível possibilitando, dessa forma, a seleção de estratégias a serem utilizadas, como a diminuição da  $T_m$  ou a adição de co-solventes como Dimetil sulfoxido (DMSO) ou glicerol (CÂNDIDO et al, 2000).

O método de RT-PCR mostrou-se sensível e facilmente executável comparado com outros métodos descritos previamente. Uma sensibilidade de 1 PFU foi descrita também por Shieh et al., 1999, estudando moluscos. Outros autores detectaram 8 PFU/g em homogeneizado de ostras, quando utilizaram a RT-PCR tradicional (CROMEANS; NAINAN; MARGOLIS, 1997).

## **7 CONCLUSÕES**

Por décadas, a etiologia da maioria das doenças associadas ao consumo de pescado foi desconhecida. A habilidade de encontrar baixos níveis de vírus entéricos em pescados permite reconhecimento mais acurado do pescado como veículo de transmissão de doenças. Este estudo confirma o sucesso da utilização de técnicas moleculares na detecção do HAV, permitindo o isolamento do RNA viral de forma rápida e sensível em pescados contaminados.

Pode-se então concluir que foi possível a síntese de cDNA *in vitro* a partir de RNA viral, uma vez que a reação padronizada utilizando os iniciadores LVCHAV01-F e LVCHAV04-R amplificou com sucesso um fragmento de 783 bp do gene para a proteína VP1 do HAV, como esperado pela análise computacional. Um diagnóstico molecular para o vírus da Hepatite A foi, portanto, indubitavelmente desenvolvido após a confirmação pela digestão enzimática com as enzimas *Bam* H I e *Hae* III.

Dada à qualidade do produto obtido, ele é passível de clonagem e sequenciamento, para a realização inédita da análise filogenética de amostras brasileiras de HAV, inserindo o Brasil no contexto do estudo da caracterização do vírus em nível mundial. Além disso, o produto amplificado pode ser utilizado como DNA molde na estratégia de Nested-PCR, fazendo uso dos *primers* LVCHAV01-F e LVCHAV02-R.

Estes resultados contribuem para a solução do difícil controle de qualidade sanitária de produtos derivados da indústria pesqueira pela contaminação por HAV através de via hídrica, manipulação, armazenamento e transporte

inadequados, agregando valor sanitário ao pescado nacional. Tal nova biotecnologia já pode ser utilizada em rotina laboratorial de diagnóstico a serviço da comunidade.

## REFERÊNCIAS

- ABD-ELSALAM, K. A. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n.5, p. 91-95, May 2003.
- ANON. **Report on Foodborne Viral Infection Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food The Stationary Office** - London (UK), 1998.
- ARNAL, C. et al. Quantification of hepatitis A virus in shellfish by competitive reverse transcription-PCR with coextraction of standard RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.322-326, 1999.
- AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**, 2.ed. New York: Harvard Medical School, 1992. p.4.2-4.3.
- BARROS, G. C.; MENDES, E. S.; SANTOS, F. L. **Patologia dos Peixes**. Revista CFMV. Ano 8, n. 26, p 44-56, 2002.
- BEIRÃO, H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M. Processamento e industrialização de moluscos. In: SEMINÁRIO E WORKSHOP TECNOLOGIA PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO. 2000, Campinas. **Palestras**. Campinas: ITAL, Centro de Tecnologia de Carnes, 2000. p. 38-84.
- BHATTACHARYA, S. S. et al. Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. **Journal of Virological Methods**, v.116, p.181-187, 2004.
- BOFFI, A. V. **Moluscos brasileiros de interesse médico e econômico**. São Paulo: ed. Hucitec, 1979. 182p.
- CÂNDIDO, A. L. Contribuição para a caracterização e o diagnóstico diferencial das amostras brasileiras do Herpesvirus bovino do tipo 1 e 5, BH 83 e EVI-190. Belo Horizonte. **Tese de doutorado**, 2000.
- CARDONHA, A.M. S.; CASEMIRO, A.R.S.; VIEIRA, R.H.S.F. Identificação de bactérias psicotróficas em calda de lagostas, durante processo industrial com tripolifosfato de sódio. **Higiene Alimentar**, v. 8, n. 31, p. 29-34, 1994.
- CASAS, N.; SUÑÉN, E. Detection of enterovirus and hepatitis A virus RNA in mussels (*Mytilus* spp.) by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.89-95, 2001.
- CHIRONNA, M; et al. Detection of hepatitis A virus in mussels from different sources marketed in Puglia region (South Italy). **International Journal of Food Microbiology**, v.75, n.1-2, p. 11-18, 2002.

CLEMENS, S.A.C. et al. Soroprevalência para hepatite A e hepatite B em quatro centros no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n.1, p. 1-10, jan.-fev., 2000.

COELHO, C. et al. Hepatitis A Virus Detection in Oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by Reverse Transcription– Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 507–511, 2003.

COHEN, J. I. et al. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picornaviruses. **Journal of Virology**, v. 61, n. 1, p. 50-59, 1987.

CONSTANTINIDO, G. A saúde do pescado depende diretamente da saúde do ambiente. **Higiene Alimentar**, v.8, n.32, p.5-6, 1994.

COSTA-MATTIOLI, M. et al. Genetic variability of hepatitis A virus. **Journal General Virology**, Dec. 1, v. 84, n. 12, p. 3191-3201, 2003.

CROMEANS, T. L., NAINAN, O. V., MARGOLIS, H. S. Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. **Applied and Environmental Microbiology**. 63, p. 2460-2463, 1997.

CUTHBERT, J.A. Hepatitis A: old and news. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p. 38-58, 2001.

CUYCK, G. H. VAN et al. Detection of hepatitis A virus in oysters. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 185-193, 1994.

DE MEDICI, D. et al. Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p.362-366, 2001.

DE PAULA, V.S; VILLAR, L.M ; GASPAR, A.M.C. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, Apr., v.7, n.2, p.135-141, 2003.

DI PINTO, A. et al. Detection of hepatitis A virus in shellfish (*Mytilus galloprovincialis*) with RT PCR. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 9, p. 1681-1685, 2003.

ERLICH, H.A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v.252, p.1643-1651, 1991.

FERREIRA, C. T. et al. Prevalência do anticorpo da hepatite A em crianças e adolescentes com hepatopatia crônica. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.6, p.503-508, nov/dez. 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Ed. Artmed, 2002.

GASPAR JR, J.C.; VIEIRA, R.H.S.F. Aspectos sanitários do pescado de origem de água doce e marinha, comercializado na feira da Gentilândia, Fortaleza-Ceará. **Higiene Alimentar**, v.11, n.51, p.20-23, 1997.

GAZE, R.; CARVALHO, D.M.; WERNECK, G.L. Soroprevalência das infecções pelos vírus das hepatites A e B em Macaé, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.5, p.1251-1259, 2002.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.; OLIVEIRA, C.A.F. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 53, jan., 1998.

GRAFF, J.; TICEHURST, J.; FLEHMING, B. Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3165-3170, 1993.

HEWITT, J.; GREENING, G. E. Survival and persistence of norovirus, hepatitis A virus and feline calicivirus in marinated mussels. **Journal of Food Protection**. v. 67, n. 8, p. 1743-1750, 2004.

HOLLINGER, F.B.; TICEHURST, J.R. **Hepatitis A**. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M., Philadelphia : ed. Virology., Raven Press, 1996. p. 735-781.

KINGSLEY, D. H.; RICHARDS, G. P. A rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p.4152-4157, 2001.

KOFF, R.S. Hepatitis A. **Lancet**, v. 351, p. 1643-1649, 1998.

LEGEAY, O. et al. Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.90, p.1-14, 2000.

LEDERLE, J. **Enciclopédia moderna de higiene alimentar**. São Paulo: Manole Dois, 1991.

LEMON, S.M. Inactivated hepatitis A virus vaccines. **Hepatology**, v. 15, p. 1194-1197, 1992.

LIMA, F.C. Víbrios marinhos: 1. *Vibrio parahaemolyticus*. **Higiene Alimentar**, v.11, n.47, p.14-22, 1997

MELNICK, J. L. History and Epidemiology of hepatitis A virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. S2-S8, 1995.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. D.I.P.O.A. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Decreto-Lei nº 30691, de 29 mar 52, alterado pelo Decreto Lei nº21255, de 25 jun 62. Imprensa Oficial, Curitiba, 1981. 159p.

MUNIAIN-MUJIKA, I.; GIRONES, R.; LUCENA, F. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. **Journal of Virological Methods**, v.89, p.109–118, 2000.

PEREIRA, F. E. L.; GONÇALVES, C. S. Hepatite A. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 387-400, maio-jun., 2003.

PINHO, J. R. R. et al. Duality of Patterns in Hepatitis a Epidemiology: A Study Involving two Socioeconomically Distinct Populations in Campinas, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.40, n.2, Mar., 1998.

ROMALDE, J. L. et al. Global market: shellfish imports as a source of reemerging food-borne hepatitis A virus infections in Spain. **International Microbiology**, v. 4, p. 223-226, 2001.

ROMALDE, J.L. et al. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve mollusks from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 119–130, 2002.

SEYMOUR, I. J.; APPLETON, H. Foodborne viruses and fresh produce, **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 759-773, 2001.

SHIEH, C.; CALCI, K. R.; BARIC, R. S. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4709-4714, 1999.

SILVA, L.C.A. **Hepatites Agudas e Crônicas**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 137-142.

SOARES, C. M.; GERMANO, P. M. L. Análise da qualidade microbiológica de *sashimis*, comercializados em *shopping centers* da cidade de São Paulo, Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116-117, p. 88-92, 2004.

SCHWAB, K. J. et al. Development of a reverse transcription-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "Norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.742-749. 2001.

VITRAL, C. L. et al. Age-specific Prevalence of Antibodies to Hepatitis A in Children and Adolescents from Rio de Janeiro, Brazil, 1978 and 1995. Relationship of Prevalence to Environmental Factors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 1-5, Jan.-Feb., 1998.

WAKIMOTO, M.D.; MARZOCHI, K.B. F.; HARTZ, Z.M.A. **Avaliação do Sistema de Vigilância Epidemiológica no Município do Rio de Janeiro**. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE EPIDEMIOLOGIA, **Livro de Resumos**, p.257. 1998.

WHO (World Health Organization). **Expanded Programme on Immunization: Hepatitis B Vaccine – Making Global Progress**. Geneva: WHO, 1996.



YOKOSUKA O. Molecular biology of hepatitis A virus: significance of various substitutions in the hepatitis A virus genome. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 15 (supl II), p. 91-97 2000.

# 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](#)