



Christiane Coelho

**Padronização de métodos moleculares
para a detecção do vírus da hepatite A
em ostras *Crassostrea gigas*
experimentalmente inoculadas**

**Florianópolis
2001**

Christiane Coelho

**Padronização de métodos moleculares
para a detecção do vírus da hepatite A
em ostras *Crassostrea gigas*
experimentalmente inoculadas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa Catarina visando à obtenção do grau de Mestre
em Biotecnologia.

Orientação: Profa. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi
Co-orientação: Profa. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões

**Florianópolis
2001**

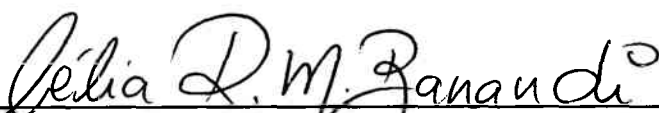
**"Padronização de métodos moleculares para a detecção
do vírus da hepatite A em ostras *Crassostrea gigas*
experimentalmente inoculadas"**

POR


CHRISTIANE COELHO

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pela Orientadora e membros
da Comissão Examinadora.**

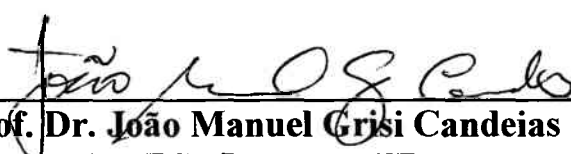
Comissão Examinadora:



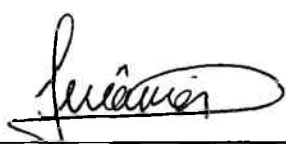
Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi
Orientadora - MIP/CCB/UFSC



Prof. Dr. Carlos Rogério Poli
AQ/CCA/UFSC



Prof. Dr. João Manuel Grisi Candeias
UNESP/Botucatu/SP



Prof. Dr. Arthur Smânia Júnior - MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, fevereiro de 2001

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada, 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.

Seu financiamento provém do BMLP (Programa Brasileiro de Apoio a Maricultura) através do programa CIDA (Canadian International Cooperation Agency).

Recebeu também apoio do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia através de concessão de Bolsa de Mestrado (CAPES).

Dedico este trabalho a Deus

"Tudo está ligado, como o sangue que une uma família. Tudo está ligado. Tudo que acontece a Terra acontecerá aos filhos da Terra. O homem não teceu a rede da vida, ele é só um dos seus fios. Aquilo que ele fixar a rede da vida ele fará a si próprio."

Chefe Seattle, em carta escrita ao "Grande Chefe Branco de Washington, considerada a declaração mais bela e mais profunda sobre o meio ambiente."

A coisa mais bonita que podemos experimentar é o mistério. Ele é a fonte de toda e verdadeira arte e da ciência.."

Albert Einstein

"Aprendi o silêncio com os faladores

A tolerância com os intolerantes

A bondade com os maldosos

E, por estranho que pareça, sou grato a esses professores."

Kahlil Gibran

AGRADECIMENTOS

- ❖ À Professora Célia Regina Monte Barardi, pela orientação neste trabalho, pela confiança e amizade em mim depositadas e por todo aprendizado que me foi concedido.
- ❖ À Professora Cláudia Maria Oliveira Simões, co-orientadora deste trabalho, pela confiança, amizade e pelas críticas e sugestões ao trabalho.
- ❖ Aos meus pais, pelos ensinamentos, carinho, apoio constante e incentivo para nunca desistir e sempre olhar para frente.
- ❖ Ao Kleber, pelo carinho, apoio constante, paciência e valiosa ajuda na montagem desta dissertação.
- ❖ À minha irmã, Ângela, pelo entusiasmo e por estar sempre presente.
- ❖ À minha grande amiga Mutsuko, um exemplo constante de sinceridade, amizade e integridade que muito influenciou meu crescimento pessoal e profissional.
- ❖ À Ana Paula e Cecília, pela amizade sincera, convívio e valiosa ajuda na realização deste trabalho.
- ❖ Às companheiras de mestrado Alessandra e Adriane, pela amizade.
- ❖ A todos no laboratório, Vanessa, Juliane, Thaís, Luciane, Carol, Daniele, Cibele e Alexandre, pelo convívio alegre.
- ❖ À Maria Cristina e ao Cleidson, pela amizade e maturidade.
- ❖ Aos amigos da dança, especialmente à Yara e Ana Maria, pela grande amizade, alegria e pelo apoio em muitas horas.
- ❖ Ao Professor Carlos Roberto Zanetti, pelos ensinamentos no estágio de docência e pela alegria e tranquilidade que nos transmite.
- ❖ Aos amigos do Hospital Universitário, pelos exemplos de vida.
- ❖ Ao Professor Luiz Alberto Peregrine Ferreira, pelo incentivo e ajuda.
- ❖ A todos; professores, servidores e estagiários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, pelo convívio e apoio.
- ❖ Aos produtores de ostras do Estado de Santa Catarina, pelas ostras doadas para realização deste trabalho.
- ❖ À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Em todo o mundo, freqüentemente tem sido relatados surtos de gastroenterites de etiologia viral entre consumidores de ostras cruas ou mal cozidas, provenientes de áreas poluídas. Apesar deste fato constituir um sério problema de saúde pública, o critério adotado universalmente para garantir a qualidade sanitária dos moluscos e de suas águas de cultivo baseia-se no monitoramento dos níveis de coliformes fecais, mesmo havendo um consenso científico de que estes indicadores não refletem a ocorrência de vírus entéricos no ambiente marinho. Os moluscos bivalves podem adsorver e bioacumular diversos patógenos humanos, tais como vírus, bactérias, helmintos, etc. Já que os vírus não se replicam nos tecidos dos moluscos, eles podem ser considerados vetores potenciais, devido à estabilidade dos vírus nos seus tecidos. A hepatite infecciosa causada pelo vírus da hepatite A (HAV) é, possivelmente, a doença mais séria causada pela ingestão de frutos do mar crus ou levemente cozidos. HAV é amplamente distribuído pelo mundo e é extremamente resistente à degradação. A técnica de transcrição reversa seguida de amplificação gênica (RT-PCR) oferece a melhor alternativa para o desenvolvimento de testes sensíveis e específicos para a detecção de vírus entéricos em moluscos, sendo imprescindível para vírus rotineiramente difíceis de identificar por cultura celular como HAV e rotavírus (RV). No presente trabalho, foi desenvolvido um método para detectar RNA de HAV em moluscos pelo uso de RT-PCR específico utilizado depois da extração do RNA total de extratos teciduais das ostras. Células fetais de rim de macaco rhesus, Frhk-4, foram utilizadas para a preparação dos estoques virais, que foram empregados para a inoculação dos extratos de ostras. A detecção de vírus em moluscos envolve a extração viral da carne dos moluscos e a extração do genoma viral. Ostras experimentalmente inoculadas por injeção direta do vírus foram processadas por um método de adsorção – eluição – precipitação utilizando polietilenoglicol PEG 6000. Os RNAs totais foram isolados dos extratos dos moluscos pelo uso de CTAB, proteinase K e extração fenol – clorofórmio. Os vírus recuperados foram examinados depois da preparação dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas por RT-PCR. A técnica de RT-PCR devidamente padronizada foi capaz de detectar um limite mínimo de 3,3pfu de HAV em ostras semeadas e 2,5pfu em extratos controles, o que significou uma recuperação viral dos extratos de ostras da ordem de 75,7% para as ostras inoculadas e o extrato preparado com PEG 6000. No presente trabalho, um método multiplex de RT-PCR foi aplicado para a detecção simultânea de HAV, rotavírus símio SA11 (RV) e poliovírus vacinal sorotipo 2 (PV) e comparado com RT-PCR específico para cada sequência genômica viral, separadamente. Quando uma mistura de RNAs de suspensões virais purificadas foi testada, três produtos distintos de amplificação gênica, representando HAV, RV e PV foram identificados por gel de poliacrilamida a 10%: sequências de 192 , 278 e 394 pb, respectivamente. Quando foi testado o RNA de extratos de ostras cruas experimentalmente inoculadas, o método combinado não foi eficiente para detectar os três vírus ao mesmo tempo. Os métodos moleculares devidamente padronizados para a detecção de HAV por RT-PCR em ostras *Crassostrea gigas* foram aplicados para acessar a contaminação viral em quatro locais de cultivo de ostras da grande Florianópolis, em Santa Catarina, durante o período de um ano. Em apenas um dos locais de cultivo foram detectadas 6 amostras positivas, representando 22% das amostras de campo analisadas para este mesmo local. Através dos controles positivos de ostras utilizados nos ensaios ficou comprovado que o método desenvolvido foi eficiente na detecção de HAV em extratos teciduais de ostras e pode ser aplicado com sucesso para análise das ostras produzidas em Santa Catarina.

ABSTRACT

The enteric virus transmission due the consumption of fecally contaminated shellfish or water is a significant public health concern. While the fecal coliform group of bacteria are universally accepted as the criterion for the sanitary quality of shellfish and their harvesting water, the scientific consensus is that these indicators do not reflect the occurrence of enteric viruses in the marine environment. Shellfish are readily contaminated with the viruses present in water containing sewage because of the concentration effect of filter feeding.

Hepatitis A virus (HAV) is a member of Picornaviridae family and it is the main cause of acute hepatitis worldwide and may lead to severe illness or even death. It is transmitted by the fecal oral routes and causes widespread endemic and assymtomatic infection in young children. HAV historically has been the most common virus associated with food-borne and waterborne outbreaks, and there continue to be reports of HAV outbreaks associated with bivalve moluscs and other foods. The reverse transcription of viral RNA and amplification of cDNA by RT-PCR is the best alternative to develop tests to detect enteric RNA viruses in environmental samples.

In the present work we have improved a method to detect HAV RNA in shellfish by using RT-PCR after extraction of total RNA from oysters meat. Monkey Kidney cells Frhk-4 were used for stock virus preparation and infected oysters extracts seeding. Detection of enteric viruses in shellfish involves viral extraction from the shellfish tissues and viral concentration. Oysters were experimentally contaminated by direct injection of virus and were processed by an adsorption-elution-precipitation method using PEG. Total RNAs were isolated from oyster extracts by using CTAB, proteinase-K and phenol-cloroform extraction. The virus recovery was examined after preparation of oysters extracts artificially contaminated with HAV strain HM 175 by RT-PCR.

In the present work a multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied for the simultaneous detection of (HAV), poliovirus vaccine strain type 2 (PV) and simian rotavirus (RV) and compared with detection using specific primers for each virus genome sequence. When we tested a mixed of RNA of purified virus suspensions three distinct amplified DNA products representing HAV, RV and PV were identified by 10% polyacrilamida gel eletroforesis 192- , 278- , 394-pb sequences respectively. When we tested on artificially contaminated raw oysters, the combined method was not successfullly to detect the three virus at the same time.

The molecular detection methods by RT-PCR specific for HAV detection in oysters were used to assess the viral contamination of four shellfish beds in Florianópolis city in Santa Catarina, over one year period. Just one shellfish bed was positive for 6 samples, this represented 22% of total samples analised.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- MOLUSCOS BIVALVES	1
1.1.1- Classificação e Taxonomia da ostra <i>Crassostrea gigas</i>	1
1.1.2- Hábito alimentar e capacidade de bioacumulação	1
1.1.3- Cultivo de moluscos em Santa Catarina	2
1.1.4- Locais de cultivo e produção no Estado de Santa Catarina	5
1.1.5- Dificuldades enfrentadas pela maricultura em Santa Catarina	8
1.1.6- Algumas empresas de produção de moluscos : Fazendas Marinhas	10
1.1.7- Controle sanitário da produção de moluscos no Brasil e em Santa Catarina	11
1.1.8- Legislação mundial relativa ao controle da produção e do processamento dos moluscos bivalves	12
1.1.9- Contaminação do meio ambiente e qualidade sanitária dos moluscos bivalves e águas de cultivo	16
1.1.10- Transmissão de vírus entéricos associados ao consumo de moluscos	18
1.1.11- Métodos disponíveis para a detecção de contaminantes virais nas águas e moluscos	21
1.2- VÍRUS ENTÉRICOS	27
1.2.1- Generalidades	27
1.2.3- Sazonalidade dos vírus (MBITHI, 1991)	30
1.3- VÍRUS DA HEPATITE A (HAV)	30
1.3.1- Classificação do vírus	30
1.3.2- Características:	32
1.3.3- Patogênese	33
1.3.4- Epidemiologia	35
1.3.5- Epidemiologia da doença associada a moluscos	36
1.3.6- Prevenção da doença: imunização e vacina da hepatite A	38
1.3.7- Inativação do HAV em moluscos	39
1.4- ROTAVÍRUS	40
1.5- POLIOVÍRUS	42
2- OBJETIVOS	44
2.1- Objetivo Geral	44
2.2- Objetivos Específicos	44
3- MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1- Vírus e células:	45
3.1.1- Vírus da Hepatite A (HAV) cepa HM 175	45
3.1.2- Rotavírus Símio SA11	45
3.1.3- Poliovírus sorotipo 2	45
3.2- Cultivo de células FrhK-4 :	45
3.2.1- Preparação do Meio:	45
3.2.2- Manutenção das células FrhK-4	46
3.2.3- Propagação das células FrhK-4	46
3.3- Infecção de células FrhK-4 com o vírus HAV, cepa HM 175	47
3.4- Titulação do vírus HAV	48
3.4.1- Titulação do HAV por imunofluorescência (IFA) indireta	48

3.4.2-Titulação do fluido infeccioso pelo método de análise de formação de placas de lise (CROMEANS et al., 1987)	49
3.5- Extração do RNA viral a partir do fluido Infeccioso do vírus HAV	50
3.5.1-Extração com fenol	50
3.5.2-Extração com Trizol [®]	51
3.6- Ensaio de RT-PCR para o vírus HAV	52
3.6.1-Protocolos de amplificação para o vírus HAV	54
3.6.2-Curva de MgCl ₂	58
3.6.3-Curva de iniciadores HAV-R e HAV-L: Definição da concentração ideal de iniciadores do RT-PCR, utilizando PCR Super Mix [®] , para RNA de HAV extraído com Trizol [®] (Protocolo C, item 3.6.1.3)	58
3.6.4- Sensibilidade de detecção do RNA purificado	59
3.7- Protocolo de Amplificação para Poliovírus (PV): RT-PCR específico	60
3.8- Protocolo de Amplificação para Rotavírus (RV): RT-PCR específico	60
3.9- Protocolos Triplex para amplificação simultânea de HAV, RV e PV	61
3.9.1- Protocolo triplex número 1: cDNA Triplex ("pool" dos três RNAs virais): PCR Triplex ("pool" de iniciadores para HAV, RV, PV)	62
3.9.2- Protocolo triplex 2: cDNA Triplex ("pool" dos três RNAs virais): PCR específico para cada vírus	63
3.10- Visualização dos produtos de PCR	63
3.11- Coleta das ostras	65
3.12- Preparação dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com fluido viral	66
3.12.1- Inoculação artificial de ostras com fluido infeccioso de HAV, RV e PV	66
3.12.2- Preparação dos extratos de ostras	67
3.13- Extração do RNA viral de extratos de ostras	69
3.14- Ensaio de RT-PCR para detecção de RNA de HAV extraído dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas	69
3.14.1- Curva de MgCl ₂ : Definição da concentração ideal de MgCl ₂ do RT-PCR, para RNA de HAV extraído de extrato controle de ostras (E.C), utilizando Protocolo C, PCR Super Mix [®] , item 3.6.1.3	70
3.14.2- Curva de iniciadores HAV-R e HAV-L: Definição da concentração ideal de iniciadores do RT-PCR, para RNA de HAV extraído de extratos controles (E.C.) utilizando Protocolo C, PCR Super Mix [®] , item 3.6.1.3	70
3.14.3- Sensibilidade de detecção do RNA purificado	70
3.15- Ensaio de RT-PCR para detecção de RNA de Poliovírus (PV) extraído dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas	72
3.16- Ensaio de RT-PCR para detecção de RNA de Rotavírus (RV) extraído dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas	72
3.17- Ensaio de RT- PCR Triplex para amplificação simultânea de RNAs de HAV, RV e PV obtidos a partir extratos de ostras experimentalmente semeadas	72
3.18- Estudos de citotoxicidade e citopatogenicidade dos extratos de ostras em células Frhk-4	73
3.19- Análise de ostras coletadas como amostras de campo no período de outubro de 1998 a outubro de 1999 em Florianópolis	75

4- RESULTADOS	77
4.1- Cultivo e infecção de células Frhk-4	77
4.2- Título infeccioso do vírus da hepatite A	77
4.3- Ensaios de citotoxicidade e citopatogenicidade dos extratos de ostras em culturas celulares, realizados conforme item 3.18	77
4.4- Preparação dos extratos teciduais de ostras utilizando PEG 6000 e PEG 8000 Erro! Indicador não definido.	
4.5- Extração do RNA de fluido de células infectadas e ensaios de RT-PCR	82
4.5.1- Curva de MgCl ₂ para detecção de RNA obtido de fluido viral	82
4.5.2- Curva de MgCl ₂ para detecção de RNA de extratos teciduais de ostras	85
4.6- Padronização da concentração ideal de iniciadores do RT-PCR, utilizando Protocolo C, PCR Super Mix [®] (item 3.6.1.3)	85
4.6.1-Curva de iniciadores HAV-R e HAV-L para detecção de RNA de fluido	85
4.6.2-Curva de iniciadores HAV-R e HAV-L para detecção de HAV em RNA de extratos teciduais de ostras	88
4.7- Limites de sensibilidade da detecção de RNA de fluido viral	88
4.7.1-Limite de sensibilidade da reação de RT-PCR utilizando Protocolo A para detecção de RNA de HAV, extraído com fenol-clorofórmio	90
4.7.2- Limite de sensibilidade do RT-PCR utilizando Protocolo B, PCR Super Mix [®] para RNA de HAV extraído com Trizol [®]	90
4.7.3- Limites de sensibilidade dos ensaios de RT-PCR, protocolos C (PCR Super Mix [®]) e D (Platinum Super Mix [®]), utilizando iniciadores HAV-R e HAV-L	93
4.8- Limites de sensibilidade dos ensaios de RT-PCR para RNA obtido de extratos tissulares de ostras	93
4.8.1-Limite de sensibilidade para RNA obtido de extratos EC	96
4.8.2-Limite de sensibilidade para RNA obtido de Extratos OS	96
4.9- Reações de RT- PCR específico para detecção de Poliovírus (PV) e Rotavirus (RV) e Protocolo Triplex para amplificação simultânea de HAV, RV e PV	100
4.9.1-Detecção de RNAs extraídos de fluidos virais	100
4.9.2-Detecção de RNA HAV, RV e PV obtidos a partir de extratos controles (EC) e extratos de ostras semeadas (OS)	102
4.10- Amostras de campo	106
5- DISCUSSÃO	112
5.1-Crescimento e infecção de células Frhk-4 pelo HAV	112
5.2-Estudos de citotoxicidade e citopatogenicidade dos extratos teciduais de ostras	115
5.3-Extração do RNA de fluido de células infectadas e ensaios de RT-PCR	116
5.4-Ensaios de RT-PCR para detecção de RNA obtido dos extratos tissulares de ostras	123
5.5-Amostras de campo	129
6- CONCLUSÕES	131
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

1- INTRODUÇÃO

1.1- MOLUSCOS BIVALVES

1.1.1- Classificação e Taxonomia da ostra *Crassostrea gigas*

A espécie *Crassostrea gigas* (THUMBERG, 1795), conhecida popularmente como ostra do Pacífico ou ostra japonesa, pertence ao filo Mollusca, classe Bivalvia, ordem Ostreoida, família Ostreidae (RUPPERT & BARNES, 1996). É uma espécie nativa do sudeste asiático, incluindo o mar do Japão, China e Coréia (IMAI, 1982; AKABOSHI & SINQUE, 1983), e tem importância mundial visto ser adaptável ao cultivo planejado (AKABOSHI et al., 1982).

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. Estas são alargadas e pregueadas e funcionam como um filtro, concentrando partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos que servem como alimento para o animal. A capacidade filtrante da ostra pode chegar a 8 litros de água por hora e cerca de 100 litros/ dia (PEARSE et al, 1987; WARD, 1996).

Devido ao seu 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 (AHMED, 1992; NATIONAL ADVISORY COMMITTEE, 1992; JAYKUS et al., 1994; ROMALDE et al., 1994; CROMEANS et al., 1997) e também contaminantes químicos, tais como traços de metais (arsênio, zinco, cobre e mercúrio) e metais pesados (ferro, chumbo, cobre, cádmio, cromo e manganês), compostos organoclorados, hidrocarbonetos de petróleo e elementos radioativos, dependendo da qualidade da água onde os mesmos se encontram. Por esta razão, os moluscos bivalves têm sido utilizados principalmente no monitoramento de contaminantes químicos em águas naturais (GOLDBERG, et al., 1983; ANDERSEN et al., 1996; LEE, KRUSSER, WASSERMANN, 1996 ; SHIM et al., 1998; ST-JEAN et al., 1999).

Devido a esta característica de bioacumulação, os moluscos bivalves recebem o nome de “bioindicadores” ou “monitores” de contaminação ambiental, sendo atribuída a eles a capacidade de identificar diversos sintomas de um ambiente costeiro ou estuarino em estresse (WIDDOWS & DONKIN, 1992, SMAAL & WIDDOWS, 1994).

Um estudo sobre bioacumulação de partículas virais em bivalves demonstrou que, após 6 horas de imersão em água contendo 8×10^5 a $2,5 \times 10^7$ partículas de adenovírus entérico e rotavírus humano por litro respectivamente, entre 25 e 35% dos vírus eram adsorvidos pelos tecidos bivalves (BOSCH et al., 1994). 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 (JAYKUS et al., 1993). Em vista disto, o consumo de moluscos contaminados com patógenos provenientes de fezes humanas representa um risco à saúde pública (SHWAB et al., 1998).

1.1.3- Cultivo de moluscos em Santa Catarina

O crescente aumento da população mundial, com conseqüente aumento do consumo de alimentos, torna evidente a importância do mar como fonte potencial de alimentos. Sendo assim, a exploração dos recursos marinhos tem sido visada com o objetivo de viabilizar um cultivo racional de espécies marinhas (FERNANDES, 1993).

O desenvolvimento de sistemas de cultivo de espécies marinhas, tais como os moluscos bivalves, proporciona uma fonte alternativa de alimentos para a população e uma forma de subsistência para os pescadores artesanais (MEDEIROS et al, 1996). Pode-se ainda justificar o investimento na produção destes moluscos por proporcionarem uma dieta alimentar nutritiva, constituída por proteínas, sais minerais e vitaminas (MAGALHÃES, 1985; DORE, 1991).

A maricultura, como é chamado o cultivo de ostras e mexilhões, é uma atividade recente no Estado de Santa Catarina. Duas tentativas de implantação de cultivos foram realizadas sem sucesso em 1977 e em 1983, pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), utilizando recursos próprios. Somente em 1988, graças a um convênio entre a UFSC e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado (Epagri), a tecnologia de cultivo de mexilhões foi levada para as comunidades pesqueiras, com a introdução inicial de três cultivos experimentais. Os resultados destes experimentos foram altamente positivos levando muitas pessoas a adotarem a atividade como uma opção de renda. Hoje, boa parte dos produtores tem na maricultura a principal fonte de

família (Epagri, 2000). Atualmente, já são 102 áreas de cultivo e 1.000 maricultores filiados a 13 associações. A produção desde 1991 cresceu mais do que 10 vezes: Somente em 1999 foram cerca de 9.400 toneladas de mexilhões e 605.000 dúzias de ostras (EPAGRI, 2000).

Atualmente, a espécie de ostra *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1795) ou ostra do Pacífico é cultivada no Estado de Santa Catarina, onde desenvolve-se perfeitamente devido às características climáticas da região (águas mais frias), que vão de acordo com as exigências da espécie, além de facilidades geológicas caracterizadas pela vasta quantidade de baías que facilitam a diminuição nos custos com as estruturas de cultivo e propiciam condições ideais de disponibilidade de alimentos devido à grande quantidade de nutrientes locais (NASCIMENTO, 1983). Os cuidados requeridos pela espécie referem-se, principalmente, à temperatura da água; o ideal é que ela esteja entre 15° e 22°C, o que torna os meses de outono e inverno os ideais para o crescimento, e os meses de verão, com o aumento do afluxo de turistas os ideais para a comercialização das mesmas.

A criação de ostras da espécie *Crassostrea gigas* possui três ciclos, que duram ao todo de nove a doze meses (ARAÚJO & PEREIRA, 1996):

- 1- Primeiro, as sementes são colocadas nas lanternas berçário (um tipo de cesto com cinco andares); o ideal é que o total não exceda 10 mil sementes;
- 2- depois de 20 ou 30 dias é feita a seleção das mais desenvolvidas, que são colocadas em lanternas separadas;
- 3- em torno do quarto mês, uma pequena percentagem já pode ser comercializada, considerando que os cultivos iniciaram no inverno. Em seis meses, metade do lote já estará com tamanho comercial de oito centímetros; o restante atingirá este tamanho em nove até doze meses. Nesta fase a densidade deve ser de 25 dúzias por lanterna.

As sementes de ostras são fornecidas pelo Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM), Departamento de Aquicultura/ CCA/ UFSC, e o pólo de maricultura é sustentado tecnicamente por professores deste Departamento. A época de maturação da *C. gigas* se dá de setembro a fins de novembro, momento em que se provoca desovas em laboratório e se produz as sementes (SILVA, 1996).

Vários trabalhos foram ou são desenvolvidos no Estado visando a organização da atividade e da produção atuando em toda a cadeia produtiva, tais como pesquisas sobre a biologia e cultivo da espécie; implantação de unidades de observação e demonstração;

constituição de parques aquícolas compreendendo o mapeamento de áreas para cultivos marinhos e a legalização dos mesmos; monitoramento da qualidade da água de cultivo e da carne dos moluscos cultivados; métodos para obtenção de sementes e estudo de estoques naturais; organização dos produtores em associações/ cooperativas; construção de unidades comunitárias de beneficiamento dos moluscos permitindo a comercialização interestadual através da instalação do SIF (Serviço de Inspeção Federal); estudos de mercado e marketing do produto; capacitação periódica de técnicos e produtores e assistência técnica junto aos maricultores desde a instalação dos cultivos até a comercialização (EPAGRI, 2000).

A expansão da maricultura no Brasil foi impulsionada pelo governo canadense através da CIDA (Canadian International Cooperation Agency), que criou o Programa Brasileiro Ligado à Maricultura (em inglês, Brazilian Mariculture Linkage Program – BMLP). Neste programa, além da Universidade Federal de Santa Catarina, participam quatro outras universidades brasileiras (Universidades Federais da Bahia, do Maranhão, do Rio Grande do Norte e do Espírito Santo), que também pretendem expandir o cultivo de ostras e mexilhões nos respectivos Estados. Também fazem parte do BMLP três Universidades canadenses (University of Victoria, University of Malaspina e Memorial University). De forma geral, o BMLP objetiva apoiar a maricultura tropical visando respeitar o meio ambiente e preservando a saúde pública com a produção de alimentos de boa qualidade que possam ser absorvidos tanto pelos mercados locais quanto internacionais. Ainda como objetivos do BMLP, constam o desenvolvimento de facilidades e transferência de tecnologias em maricultura, bem como aplicações de metodologias desenvolvidas nos laboratórios de pesquisa diretamente nas comunidades de maricultores.

1.1.4- Locais de cultivo e produção no Estado de Santa Catarina

Entre os anos de 1989 e 1992, houve um crescimento sem controle da atividade e, por isso, em 1992, com base nas exigências legais dos órgãos que exercem o controle e a fiscalização da atividade de maricultura, a EPAGRI em convênio com o IBAMA e participação da FATMA e da 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 (EPAGRI, 1994). Hoje, 102 áreas em doze municípios estão legalizadas, tendo capacidade para produzir cerca de 20 mil toneladas anuais de mariscos (mexilhões) e ostras, e esse potencial poderia ser ainda maior já que existem mais 100 áreas ainda não exploradas (EPAGRI). A maricultura conta hoje com 1.000 produtores (mais de 150 produtores de ostras) e 5.000 trabalhadores (LCMM e LAMEX, Informativo 2000).

O pólo de maricultura ocupa dois terços da costa catarinense, de 561 quilômetros, abrangendo 28 municípios entre Garopaba e Itapoá. Este trecho da costa é denominada de região Centro-Norte e é mais adequado à maricultura por ser entrecortado, com presença de costões. As inúmeras baías dessa região são lugares ideais para a criação de espécies marinhas, principalmente moluscos: ostras (das espécies *Crassostrea gigas* e *Crassostrea rhizophorae*) e mexilhões (*Perna perna*).

Os principais municípios produtores de ostras em Santa Catarina são: Florianópolis, Penha, Governador Celso Ramos, Bombinhas, Palhoça e Porto Belo, sendo que a maioria dos produtores localiza-se em Florianópolis (LCMM, 2000) (Figura 1).

Num período de sete anos (1991-1998), a produção de ostras e mexilhões no Estado aumentou gradativamente (figuras 2A e 2B). De 1998 para 1999, a produção pulou de 219 mil dúzias para 605.000, evidenciando um crescimento de 200%. O crescimento mais representativo da produção de ostras ocorreu no período de 1999-2000 e concentrou-se principalmente em Florianópolis, que na última safra teve uma participação de 83,3% do total de ostras produzidas no Estado (ROCZANSKI et al., 2000).

Em 1999, a atividade movimentou R\$ 40 milhões só na produção e estima-se que em 2000, chegou a R\$ 48 milhões, o que significa um aumento de 20% na produção. Este aumento, no entanto não significa geração de muitos empregos, pois a mão-de-obra geralmente é de caráter familiar (Diário Catarinense, 12/11/2000).

A temporada de verão proporciona um impulso à maricultura do Estado pois Florianópolis torna-se um bom mercado para os produtores, devido ao aumento do

consumo com a chegada dos turistas ao litoral catarinense. Outro evento que tem crescido e ganhado importância econômica é a Festa Nacional da Ostra (Fenaostra), na cidade de Florianópolis, no mês de dezembro. Nesta época, a demanda de produção tem um incremento de 100%. Os produtores, no entanto procuram manter e ampliar o mercado em outros Estados, onde os negócios são permanentes o ano todo.

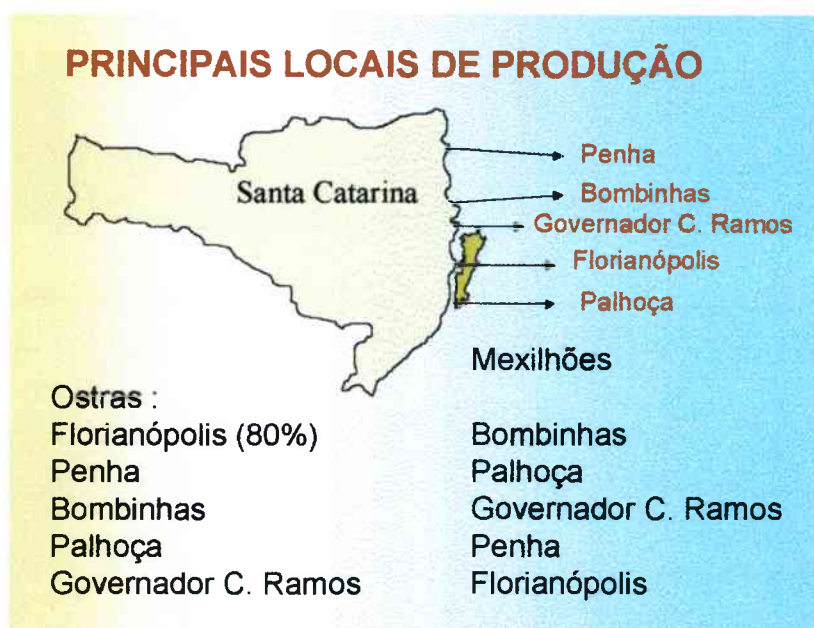


Figura 1: Principais locais de cultivo de moluscos bivalves em Santa Catarina

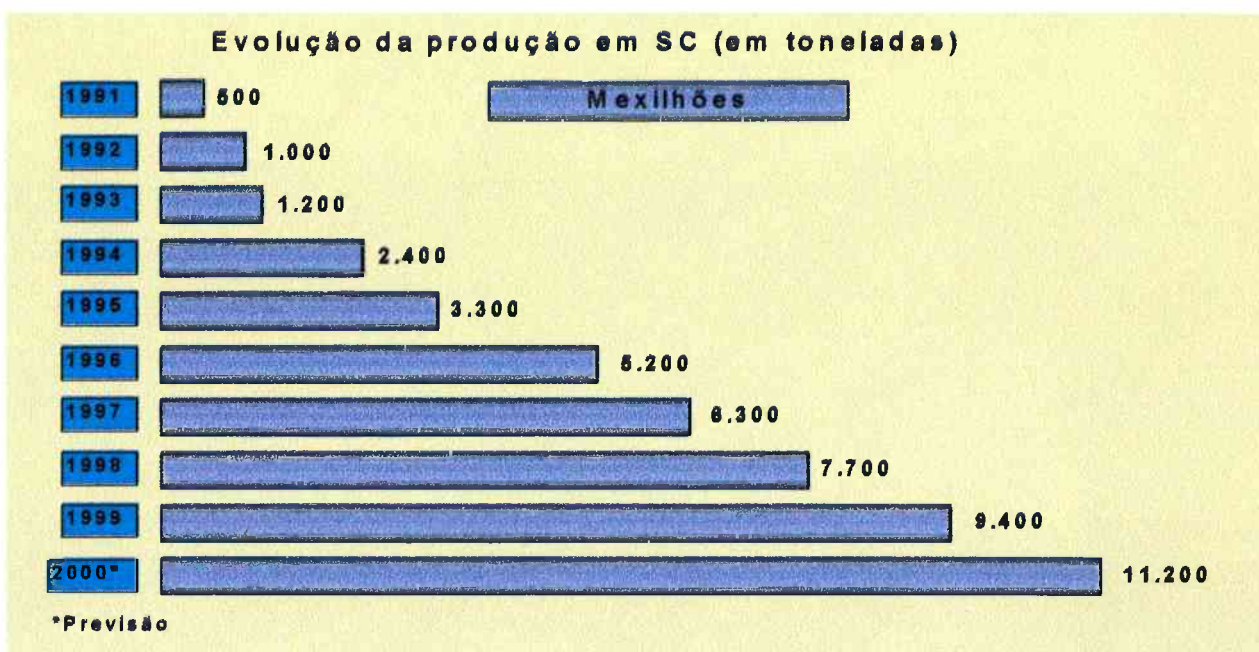


Figura 2A

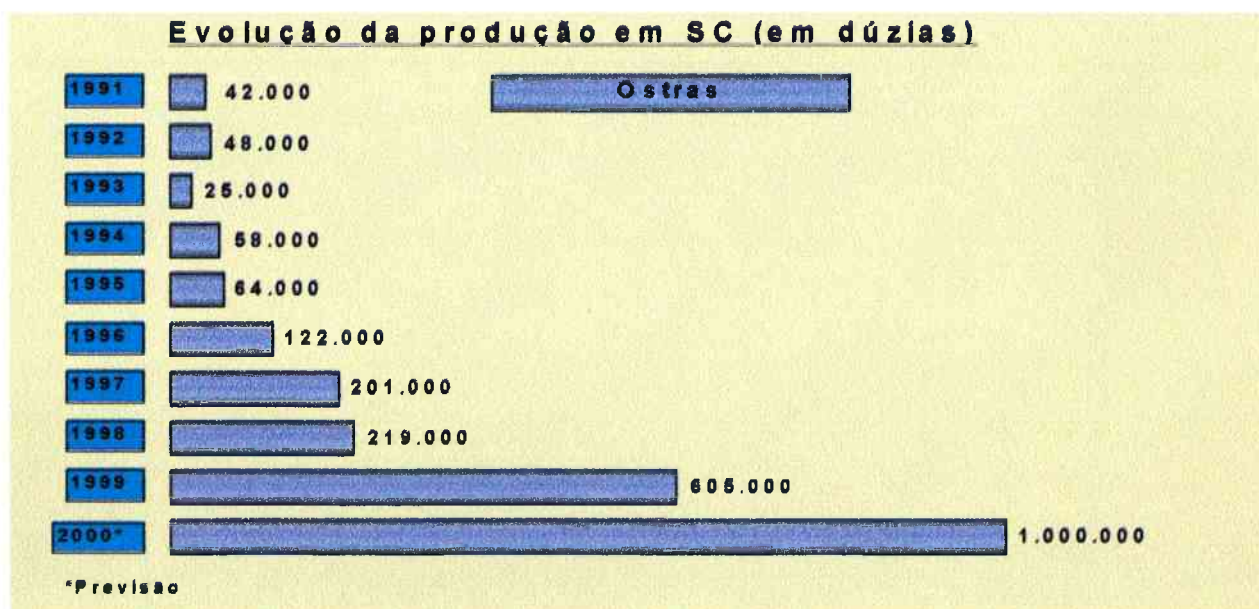


Figura 2B

Figura 2A: Evolução da produção de mexilhões, em toneladas, em SC de 1991 a 2000.

Figura 2B: Evolução da produção de ostras, em dúzias, em SC de 1991 a 2000.

1.1.5- Dificuldades enfrentadas pela maricultura em Santa Catarina

Devido a demora do governo para realizar inspeções e emitir as certificações muitas vezes, os produtores encaram as exigências legais, que visam fornecer um produto de qualidade para o consumidor, como uma barreira, principalmente devido aos trâmites burocráticos que mais freiam o desenvolvimento da maricultura do que ajudam em seu crescimento.

Exigências legais: Para serem comercializadas para outros Estados, as ostras produzidas devem 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 a 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 a construção das instalações até o tipo de roupa utilizada. O SIF é uma garantia para o consumidor e sem ele é impossível comercializar ostras e mexilhões para outras regiões. Sem um local para beneficiamento dos moluscos não é possível obter o carimbo do SIF (SUPLICY, 1998; JOSÉ, 1996).

Falta de legalização da atividade: Depois de demarcada a área de cultivo, o produtor precisa obter uma certidão ambiental na Fundação do Meio Ambiente (FATMA) e depois conseguir o registro de aquicultor do IBAMA. Sem o registro, a atividade é considerada clandestina e o produtor não pode, por exemplo, conseguir financiamento nos bancos.

Os produtores procuram formar associações/cooperativas para fortalecer o setor e facilitar o processo de produção e comercialização. Apesar do setor de maricultura estar incluído no Programa Nacional de Agricultura Familiar (Pronaf), desde a sua criação em 1996, os produtores muitas vezes esbarram na falta de apoio financeiro e nas exigências requeridas pelos bancos para financiar o setor, que não possui linhas de crédito (Diário Catarinense, 12/11/2000).

Temperatura da água: A temperatura da água é um fator que influencia no metabolismo das ostras. Tratando-se de uma espécie de clima temperado é de se esperar

que a ostra encontre seu melhor desenvolvimento em ambientes semelhantes aos de origem. Em nossas águas, esta temperatura é encontrada durante o inverno, quando pode alcançar valores de até 14,5°C. Durante o verão, quando a temperatura está em torno de 28°C, a *C. gigas* parece interromper seu crescimento (SILVA, 1996).

Obtenção de sementes: O Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) da Universidade Federal de Santa Catarina trabalha com ostras japonesas oriundas de Cabo Frio (RJ) e Cananéia (SP) (SILVEIRA Jr., 1996) e fornece cerca de 12 milhões de sementes por ano (informativo LCMM, BMLP, 2000). Outra opção é a importação de sementes do Chile ou dos Estados Unidos; no entanto as sementes estrangeiras não estão adaptadas às necessidades climáticas da região e o risco de mortalidade é mais alto. Até mesmo a “mortalidade em massa de verão” torna-se um risco, assim como a introdução de doenças e parasitas de outras partes do mundo. As sementes da ostra do Pacífico, aqui cultivadas, não resistem a temperaturas elevadas, principalmente aquelas registradas de dezembro a março nas águas de Santa Catarina. Nos primeiros anos de produção, em que eram utilizadas sementes importadas, os maricultores chegaram a perder 89,5% da produção nessa época do ano em 1989/1990 (LCMM, 1996). Já com as sementes locais, adaptadas, a mortalidade caiu hoje para cerca de 30%.

Mortalidade em massa de verão: este fenômeno é verificada nas ostras cultivadas em Santa Catarina, o que impossibilita o cultivo normal durante o verão. Em torno de 40 a 70% dos indivíduos podem morrer. Foi verificada pela primeira vez em 1987 e causou mortalidade muito alta nos primeiros anos de produção: nos verões de 1989/1990, 1990/1991, 1991/1992 a mortalidade na baía Norte foi de 89,5%, 33,3% e 52,9%, respectivamente (SILVEIRA Jr., N., 1996).

No Japão e Estados Unidos, esta mortalidade está sempre associada a áreas com alta produtividade, altos níveis de nutrientes, fundo lodoso e com temperaturas excedentes a 20°C e coincidentes com a máxima maturação gonadal (SILVEIRA Jr., 1996).

Poluição dos locais de cultivo por esgotos clandestinos: Segundo nota publicada no jornal O Estado, de 29 de junho de 1999, é possível detectar saídas de esgoto clandestino nas praias de Cacupé, Santo Antônio de Lisboa, Sambaqui e Barra do Sambaqui. A Vigilância Sanitária detectou em 1998 diversas saídas de esgotos

clandestinos que desaguavam nas saídas pluviais e de lá para o mar. Estas saídas foram lacradas; no entanto, os lacres foram retirados por moradores que continuam poluindo o mar.

Roubos: A falta de segurança pode tornar-se um problema para uma fazenda de cultivo de ostras. O generalizado desrespeito à concessão marinha no Brasil faz da invasão à propriedade alheia, seguida de roubo, um dos maiores riscos que os produtores devem assumir (SILVEIRA Jr., 1996).

1.1.6- Algumas empresas de produção de moluscos : Fazendas Marinhas

1.1.6.1- Ribeirão da Ilha: Fazenda Marinha do Atlântico Sul: Os produtores de moluscos da praia do Ribeirão da Ilha se uniram para a formação desta empresa, o que fortaleceu o setor e facilitou o processo de produção e comercialização. A produção da Fazenda Marinha Atlântico Sul é de 5 mil dúzias de ostras e 500 quilos de mariscos por mês. Deste total, 80% tem como destino outros Estados, principalmente Rio de Janeiro e São Paulo, mas também há negócios com a Bahia, Brasília, Belo Horizonte, Rio Grande do Sul e Maranhão. Apenas 20% da produção fica em Santa Catarina. A empresa iniciou tentativas de exportar ostras e mariscos para a Argentina; no entanto o produto só pode entrar no país vizinho se for analisado por um laboratório credenciado na Argentina. A empresa considera que as “inúmeras exigências e barreiras sanitárias” impediu o andamento dos negócios (BROGNOLI, in DC 12/11/2000).

1.1.6.2- São Francisco do Sul: Neste local, a maricultura está abaixo do seu potencial. Apenas um terço da área disponível para produção está ocupada. Os maricultores reclamam da falta de financiamento para montar estruturas que resultem em produção de grande volume. A comercialização é feita somente para o mercado interno em peixarias da cidade ou diretamente ao consumidor.

1.1.6.3- Porto Belo: A maricultura começou a se desenvolver há três anos. No entanto os produtores, devido à falta de recursos, não possuem uma área para beneficiamento dos moluscos, sem a qual não é possível obter a marca do Serviço de Inspeção Federal (SIF), o que permite a venda para outros Estados. Atualmente, os produtores do município fazem a venda direta ao consumidor ou repassam o produto para empresas de beneficiamento de outras cidades.

1.1.6.4- Palhoça: Fazenda Marinha Moluskus: é o maior produtor do Estado, localizada na Praia do Sonho, no continente, a 50km ao sul de Florianópolis, coordenada por um oceanógrafo, que é o único produtor individual de Santa Catarina a ter inscrição no Serviço de Inspeção Federal (SIF).

1.1.6.5- Associação dos maricultores do Norte da Ilha: 46 famílias sobrevivem da atividade, espalhadas na faixa litorânea que vai do Saco Grande ao Forte de São José da Ponta Grossa.

1.1.7- Controle sanitário da produção de moluscos no Brasil e em Santa Catarina

A legislação relativa aos níveis 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 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA) delegou aos aquicultores 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 (JOSÉ, 1996; SUPPLY, 1998).

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 de 1976 (JOSÉ, 1996). Contudo estas normas não têm força de lei. O critério para a classificação das áreas é o da presença de coliformes totais, cuja análise é realizada pelo método do "número mais provável" (NMP) de acordo com a legislação americana (APHA, 1995), como segue:

Área proibida: Num ambiente aquático, onde o NMP de coliformes encontra-se acima de 700/ 100 ml de água, fica proibida a criação, extração ou estocagem dos bivalves;

Área limitada: Num ambiente aquático onde o NMP de coliformes varia entre 70 e 700/100ml de água, é permitida a criação, extração ou estocagem dos bivalves, sendo indispensável o tratamento posterior destes através de depuração;

Área livre: Num ambiente aquático, onde o NMP de coliformes for inferior a 70/ 100ml de água, é permitida a criação, extração ou estocagem de bivalves.

Os critérios microbiológicos estabelecidos para carnes de moluscos submetidos à depuração determinam que essas devem apresentar contagem bacteriana total inferior a 5×10^5 /g de carne e o NMP de coliformes fecais inferior a 230/ 100g de carne (JOSÉ, 1996)

Além disso existem duas legislações que os produtores devem conhecer (ARAÚJO, 1996):

Resolução N°20 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 18/06/86, que regulamenta a concessão das áreas de cultivo. Os aspectos microbiológicos e químicos estão descritos, e estabelece que os limites para as águas de cultivo não deverão exceder uma concentração média de NMP 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.

Portaria N°001 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL), do Ministério da Saúde, de 28/06/1987, que determina que na classe de pescados consumidos *in natura* crus, entre eles os moluscos como ostras e mexilhões, as amostras não deverão apresentar NMP de coliformes fecais superiores a 102/ grama de carne.

1.1.8- Legislação mundial relativa ao controle da produção e do processamento dos moluscos bivalves

O risco de doenças infecciosas associadas ao consumo de moluscos bivalves é reconhecido há muitos anos. Conseqüentemente, muitos países decretaram medidas de controle sanitário para a produção de moluscos bivalves. Na União Européia, essas foram descritas na Diretriz Européia 91/492/EEC (ANON, 1991a) para capacitar a operação do mercado comum europeu em 1993. Nos Estados Unidos, estas medidas foram regulamentadas por acordos comerciais interestaduais definidos no FDA - Manual de Operações do Programa Nacional Sanitário de Moluscos (ANON, 1993b). Estas regulamentações são similares no que diz respeito aos requerimentos para limpeza das áreas de crescimento, aos controles e processamentos requeridos para áreas mais contaminadas, às condições de higiene para estabelecimentos de processamento e

despacho, aos requerimentos e documentações comerciais, etc. Qualquer outro país que queira exportar para Europa ou Estados Unidos deve produzir nestes mesmos padrões. A maioria das nações que exportam tem desenvolvido seus programas, de acordo com as regulamentações dos mercados modelos. O principal item deste controle é o uso tradicional de indicadores bacterianos de contaminação fecal tais como coliformes fecais ou *Escherichia coli*, para acessar a contaminação, e portanto, implementar as medidas apropriadas de controle. Historicamente, é aceito internacionalmente que moluscos coletados com um padrão microbiológico de menos de 230 *E.coli*, ou 300 coliformes fecais/ 100g de carne de molusco podem ser disponibilizados no mercado para consumo humano. Esse padrão, juntamente com padrões para patógenos específicos (tais como *Salmonella*), produtos químicos e biotoxinas de algas, foi adotado como um padrão de "produto-final" na Diretriz Européia 91/492/EEC..

A maioria das medidas efetivas para o controle da contaminação de moluscos aborda a boa qualidade das águas das áreas de cultivo. O controle da contaminação microbiológica através de procedimentos para o processamento dos moluscos tende a ser menos efetivo, mas fornece uma opção prática para muitos países onde as águas podem estar sujeitas à contaminação por esgotos. Há, convencionalmente, duas formas diferentes de processamentos comerciais disponíveis para a redução da contaminação microbiológica de moluscos (LEES, 2000):

A) Tratamento por aquecimento: Para moluscos vendidos como produto comercial, já processados pelo tratamento por aquecimento As condições de aquecimento precisam ser muito bem controladas. Nos Estados Unidos e no Reino Unido é adotado como parâmetro para cozimento o fato de que a temperatura interna da carne do molusco deve atingir a 90°C por 1,5 min. Apesar deste cuidadoso e regulado processo comercial ter demonstrado ser eficiente no controle de vírus entéricos em moluscos vendidos processados, o mesmo não pode ser garantido se esses forem vendidos vivos ou forem cozidos em casa ou no restaurante. O principal fator limitante na efetividade do cozimento em casa ou no restaurante é a natureza limitada do processo aplicado. Cozinhar demais resulta em um produto de paladar diminuído, com baixa aceitação pelo consumidor.

B) Depuração: Entende-se como a filtração natural do molusco em água limpa para reduzir contaminantes microbiológicos. Isto pode ser realizado em tanques (depuração) ou no ambiente natural. Nos Estados Unidos e Europa, a depuração comercial, quando usada como um processo de tratamento para reduzir a contaminação microbiana, é sujeita ao controle legal. Os períodos de depuração podem variar de 1 a 7 dias, mas o

mais usado é o período de 2 dias. O produto final padrão para molusco vendido vivo deve conter menos que 230 *E. coli* ou menos que 300 coliformes fecais/ 100g de carne. No entanto, estudos epidemiológicos demonstraram que os níveis aceitáveis de coliformes fecais após a depuração não é garantia de eliminação dos vírus entéricos e já foram documentados surtos na Inglaterra causados por moluscos depurados (PERRET & KUDESIA, 1995; ANG, 1998) e nos EUA (RICHARDS, 1985). Um estudo realizado por Schwab et al., 2000 mostrou que os níveis de vírus do tipo Norwalk, bioacumulado em moluscos, foram muito pouco removidos por depuração comparando-se com *E. coli*. Além disso, os moluscos quando colocados em tanques de depuração, entram em estado de estresse, ovulam e, com isso, perdem peso e sabor, sendo menos aceitos comercialmente.

1.1.8.1- Classificação das áreas de cultivo nos Estados Unidos e Europa

As legislações dos EUA e Europa empregam uma classificação para as áreas de cultivo, de acordo com os padrões sanitários. As categorias variam de águas com níveis muito baixos de contaminação àquelas onde o cultivo é proibido, que são áreas com níveis inaceitáveis de poluição. Este controle é realizado através do uso dos indicadores bacterianos no monitoramento, que determina o tratamento apropriado de acordo com o nível de contaminação. Na Europa, os indicadores fecais são medidos na carne do molusco, enquanto que nos EUA os indicadores são medidos nas águas de crescimento dos moluscos. Tanto na Europa quanto nos EUA os padrões baseiam-se na análise bacteriológica do número mais provável (NMP). O resultado pode ser expresso pela Média Geométrica (MG) para contagem dos resultados em que não mais do que 10% das amostras pode exceder o valor (Tabela 1).

Categorias aprovadas pelo FDA (EUA) e pela União Européia (EU):

Categoria A: Todos os moluscos devem conter menos que 230 *E.coli* ou 300 coliformes fecais/ 100g carne de molusco; com MG de coliformes fecais (FCs) na água de 14 por 100ml, sendo que não mais do que 10% das amostras pode exceder 43 FCs por 100ml. É a área mais limpa, onde os moluscos são aprovados diretamente para consumo humano sem necessidade de nenhum procedimento adicional.

Nos EUA e Europa, os moluscos coletados em áreas de crescimento excedendo os níveis de contaminação acima citados, não podem ser utilizados para o consumo humano direto (LEES, 2000).

Categoria B: Os moluscos devem conter menos que 4.600 E. coli ou 6.000 coliformes fecais por 100g de carne em 90% das amostras; MG de coliformes fecais de 88 por 100ml com não mais do que 10% das amostras excedendo 260 FCs por 100ml . Podem ser colocados no mercado se for seguido o procedimento comercial de depuração ou cozimento.

Os moluscos coletados em áreas excedendo os limites da categoria B somente podem ser colocados no mercado se forem depurados, o que consiste na transferência dos animais coletados para estuários mais limpos para sua própria purificação no ambiente natural. Esta "transferência" é recomendada para tratamento de moluscos muito contaminados (LEES, 2000).

Categoria C: Os moluscos devem conter menos que 60.000 coliformes fecais por 100g de carne, e devem ser "transferidos", sendo que a legislação europeia especifica um mínimo de dois meses de depuração natural; e podem ainda, se necessário, ser depurados antes de serem colocados no mercado ou submetidos a um tratamento comercial de aquecimento por um método aprovado.

Tabela 1: Padrões legais para moluscos vivos vigentes nos Estados Unidos e na Europa

Classificação Européia	Padrão Microbiológico por 100g de carne	Classificação do FDA – Estados Unidos	Padrão Microbiológico por 100ml de água	Tratamento requerido para o molusco
Categoria A	Todas as amostras: < 230 E. coli ou < 300 FCs	Aprovado	MG < 14 FCs e 90% < 43 FCs	Não exigido
Categoria B	90% < 4.600 E.coli ou 90% < 6.000 FCs	Restrito	MG < 88FCs e 90% < 260FCs	Depuração ou transferência ("relaying")
Categoria C	Todas as amostras < 60.000 FCs			Transferência por >2 meses
-	Excede os níveis acima	-	Excede os limites acima	Coleta proibida

(Adaptado de LEES, 2000)

Algumas áreas podem ser classificadas nestas categorias por certos períodos, se houver eventos previsíveis de poluição. Assim, a classificação pode ser alterada. Nos EUA tais áreas são definidas como “condicionalmente aprovadas” ou “condicionalmente restritas”. Na Europa é definido como “classificação sazonal” (LEES, 2000).

Além dos critérios para a classificação das áreas de cultivo, as legislações dos EUA e Europa, definem requerimentos para outros aspectos, tais como transporte dos moluscos, estocagem úmida, depuração, métodos analíticos, documentação e providências para suspensão da coleta de áreas classificadas de acordo com poluição ou saúde pública emergencial.

1.1.9- Contaminação do meio ambiente e qualidade sanitária dos moluscos bivalves e águas de cultivo

A água é reconhecida como um veículo potencial para a transmissão de inúmeras doenças e, ainda hoje, a etiologia de muitas epidemias provocadas por patógenos transmitidos pela água permanece desconhecida (CRAUN et al., 1986, 1988, KOPECKA et al., 1993). Atualmente, a detecção de microorganismos na água depende principalmente, da utilização de meios de cultivo seletivos e diferenciais, que permitam o isolamento e a identificação de diferentes microorganismos (VESEY et al., 1994). 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 (VESEY et al., 1994). 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 (KOPECKA et al., 1993).

Os vírus humanos capazes de persistir no meio ambiente são essencialmente vírus entéricos que são extremamente resistentes a condições desfavoráveis e incluem adenovírus, calicivírus, 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 dispersados para o meio ambiente se as fezes não forem adequadamente tratadas (GRAAF et al., 1993; KOPECKA et al., 1993; LE GUYADER et

al., 1994). A quantidade de enterovírus presentes na água é altamente variável dependendo de fatores, tais como níveis de higiene, densidade populacional, prevalência de infecções na comunidade local e estação do ano (KOPECKA et al., 1993).

Os vírus entéricos são parasitas de homens e animais e são transmitidos primariamente pela rota fecal-oral. São excretados em grande número (10^6 a 10^{10} partículas virais por grama) nas fezes de indivíduos infectados e podem quase sempre ser detectados em efluentes de esgotos domésticos. Tendo em vista que os vírus de mamíferos são extremamente específicos para espécie e tecidos, as fontes de contaminação entérica humana de estuários de cultivo de moluscos é sempre de poluição fecal humana. Os vírus entéricos podem entrar no oceano ou estuários diretamente através do descarte de esgotos domésticos, esgotos contaminando rios e riachos, esgotos de fazendas, fábricas ou outras atividades humanas, desembocando no oceano e, também, esgotos de navios. Podem ocorrer ainda fontes indiretas de contaminação através da aplicação da terra com estrume como adubo e subsequente contaminação via rios e lençóis subterrâneos de água para estuários e águas costeiras (GOYAL, 1984).

Os vírus entéricos são muito mais resistentes do que as bactérias ao processo comum de tratamento de esgotos, incluindo a cloração (BITTON, 1980). Alguns estudos tem demonstrado que os vírus entéricos 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. A temperatura é o principal fator que influencia na sobrevivência viral no mar, sendo que os poliovírus e o HAV podem resistir por 671 dias a 4°C, mas somente 25 dias a 25°C (MELNICK & GERBA, 1980). A salinidade não tem efeito sobre a sobrevivência viral, mas a luz ultravioleta inativa rapidamente os vírus. HAV é mais resistente e sobrevive por 2,6 min, enquanto que os poliovírus sobrevivem por 1,3 min (GANTZER, DUBOIS, LE GUYADER et al., 1998).

Já que os vírus não se replicam nos tecidos dos moluscos, os mesmos podem ser considerados vetores potenciais, devido à estabilidade dos vírus nos seus tecidos. Quando ingeridos pela população, os moluscos bivalves contaminados com vírus podem tornar-se agentes da transmissão de patógenos virais, causadores de doenças infecciosas em humanos (NATIONAL ADVISORY COMMITTEE, 1992; GOUVEA et al, 1994; CHALMER E MCMILLAN, 1995; WITTMAN E FLICK, 1995).

1.1.10- Transmissão de vírus entéricos associados ao consumo de moluscos

Em todo o mundo, freqüentemente, tem sido relatados surtos de gastroenterites de etiologia viral entre consumidores de ostras cruas ou mal cozidas, provenientes de áreas poluídas. Apesar deste fato constituir um sério problema de saúde pública, o critério adotado universalmente para garantir a qualidade sanitária dos moluscos e de suas águas de cultivo baseia-se no monitoramento dos níveis de coliformes fecais, mesmo havendo um consenso científico de que estes indicadores não refletem a ocorrência de vírus entéricos no ambiente marinho (CROMEANS et al., 1997; SOBSEY, DE LEON & JAYKUS, 1996; GRIFFIN et al., 1999; LE GUYADER et al., 2000; LEES, 2000; LEGEAY et al., 2000).

Amostras de água e de frutos do mar contendo níveis aceitáveis de coliformes fecais, podem estar contaminadas por vírus e parasitas, já que a remoção de bactérias por depuração nem sempre removem os demais patógenos contaminantes (REYNOLDS et al., 1997). Devido à capacidade bioacumuladora dos bivalves, o exame da água de cultivo não prediz exatamente o nível de contaminação viral nos organismos. Desta forma, torna-se necessário o exame dos próprios bivalves para determinar de maneira confiável a real probabilidade de contaminação dos mesmos.

Estudos já comprovaram que locais contaminados com coliformes fecais apresentavam alta percentagem de contaminação viral, inclusive do vírus HAV (LE GUYADER et al, 1998, 2000). Entretanto, o HAV e outros vírus entéricos em geral têm sido encontrados em moluscos liberados para comercialização, segundo os critérios de sanidade bacteriológica (ROSE & SOBSEY, 1993; SUÑÉN & SOBSEY, 1999, LE GUYADER, 2000). Apesar de haver uma grande variedade de vírus transmitidos pela rota fecal-oral, que podem contaminar moluscos ou suas áreas de cultivo, somente poucos são associados a doenças transmitidas pelo consumo. As doenças descritas são relacionadas aos vírus que causam gastroenterites e hepatite (LEES, 2000). Mesmo casos esporádicos de doenças que não são detectados como surtos podem potencialmente estar associados ao consumo de moluscos (GERBA, 1978).

Surtos de doenças virais associadas com a ingestão 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, aos processos de tratamento e aos produtos vendidos para o consumidor. Recentemente, ocorreu um surto na Escandinávia (ANON, 1999a), em que ostras comercializadas de acordo com os

padrões europeus de níveis de coliformes fecais foram responsáveis por, no mínimo, 356 casos de gastroenterites causadas por "vírus tipo Norwalk" (NLVs) (CHRISTENSEN et al., 1998). Devido a isto tem-se reconhecido que as regras em uso são aparentemente incapazes de garantir proteção à saúde do consumidor de moluscos ou de prevenir surtos. Assim sendo estes fatos têm levado também à reavaliação dos métodos para controle sanitário dos moluscos.

Existem cerca de 110 vírus entéricos conhecidos, que são excretados nas fezes humanas e que podem ser encontrados nos esgotos domésticos (SOBSEY et al., 1978; MELNICK et al., 1980; HURST et al., 1997; LI et al., 1998). Estes vírus podem causar uma grande variedade de doenças, tais como hepatites, febres, diarreia, gastroenterites, paralisia, meningites e miocardites (HURST et al., 1997; STOLLE E SPERNER, 1997).

Os vírus transmitidos para o homem pela alimentação são principalmente os vírus responsáveis pela hepatite A e hepatite E (hepatite não-A, não-B), os Calicivírus do tipo Norwalk (Small Round Structure Viruses) e vírus Snow Mountain; os Calicivírus típicos (Non-Small Round Structure Viruses), enterovírus (EV), poliovírus, os rotavírus e os Astrovírus (HURST et al., 1997; LE GUYADER et al., 2000; SCIPIONI et al., 2000). Estes vírus, não-envelopados, possuem uma grande estabilidade no meio externo e uma certa resistência a agentes físico-químicos de desnaturação (NICAND et al., 1998).

Tais vírus têm sido epidemiologicamente relacionados, em vários graus, a doenças associadas ao consumo de moluscos. Os que estão implicados em surtos de gastroenterites virais são principalmente os vírus da hepatite A (HAV) e vírus do tipo Norwalk (NLV); no entanto, também tem sido detectados no meio ambiente enterovírus (EV), rotavírus (RV) e astrovírus (AV) (LE GUYADER et al., 2000). Casos esporádicos de doenças que não são detectados como surtos podem também ser potencialmente atribuídos ao consumo de moluscos (GERBA, 1988).

O trato alimentar é uma via comum de dispersão e infecção de uma variedade de vírus. Uma vez que no sistema digestivo os alimentos são misturados, digeridos e absorvidos, estando o trato alimentar sempre em constante movimento, os vírus encontram neste ambiente um excelente local para atacarem células susceptíveis e subsequentemente, interagirem com os sistemas sanguíneo e linfático. À primeira vista, o trato alimentar parece um ambiente hostil: o estômago é ácido, o intestino é alcalino, possui enzimas e detergentes biliares, o muco recobre o epitélio e a superfície do intestino contém anticorpos e células fagocitárias (FLINT et al, 2000). Por isso os vírus cuja rota de infecção envolve o trato gastrointestinal, devem ser, no mínimo, resistentes a

valores extremos de pH, proteases e detergentes biliares. Os vírus que carecem destes fatores são destruídos quando expostos ao trato alimentar e devem utilizar outros sítios para estabelecer infecção. A maioria dos vírus envelopados não inicia infecção no trato intestinal porque os envelopes virais são susceptíveis à dissociação por detergentes tais como bile (FLINT et al, 2000).

A família Picornaviridae compreende tanto vírus ácido-lábeis (ex: rinovirus), quanto vírus ácido-resistentes (ex: poliovírus).

Há muitos anos, as gastroenterites são reconhecidas como uma consequência clínica do consumo de moluscos bivalves contaminados (RICHARDS, 1985; RIPPEY, 1994). Vários estudos foram realizados no mundo para determinar o agente causador e hoje se reconhece que os "vírus tipo Norwalk" (NLVs) são os principais agentes.

Os NLV pertencem ao grupo dos calicivirus humanos e constituem um gênero da família Caliciviridae, que apresentam grande diversidade genética (LE GUYADER et al., 2000; SCHWAB et al., 2000). Os NLVs são os principais agentes causadores reconhecidos de gastroenterites associadas a alimentos e água. Recentemente, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) determinou que 96% de todos os surtos relatados de gastroenterites não bacterianas nos Estados Unidos foram causados por NLVs (FANKHAUSER et al, 1998). Os sintomas que caracterizam estes surtos são náuseas, vômitos, diarreia, que duram de 1 a 3 dias. O consumo de alimentos contaminados é o modo de transmissão mais comumente identificado e os surtos foram associados com o consumo de moluscos bivalves crus ou mal-cozidos, mas também com sorvetes, água, vários tipos de saladas, e comidas frias como sanduíches, presunto, aipo, melão, saladas de frutas, etc. O consumo de moluscos crus ou mal-cozidos tem resultado em numerosos surtos documentados de doença associada aos calicivírus humano (CHALMERS et al., 1995; DOWELL et al, 1995; LE GUYADER et al., 1996; MCDONNELL et al., 1997).

O rápido desenvolvimento de técnicas biotecnológicas tem tomado possível a detecção de patógenos no meio ambiente de uma forma rápida, sensível e específica. A aplicação de técnicas de biologia molecular, tais como hibridização molecular direta, utilizando sondas genéticas específicas virais e amplificação gênica (RT-PCR) de vírus e também de bactérias e protozoários, tomou esta detecção muito mais fácil e sensível (CHAPMAN et al., 1990; METCALF et al, 1988). A amplificação gênica, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), tem sido amplamente utilizada para a detecção de vírus de

genoma RNA nos mais diversos ambientes aquáticos (KOPECKA et al., 1993, TSAI et al., 1993 e 1995).

Cientistas na Inglaterra (HENSHILWOOD et al., 1998; LEES, 2000) demonstraram que o monitoramento de NLV por RT-PCR em áreas poluídas é possível e que a contaminação viral pode ser rapidamente detectada em produtos coletados destas áreas. Na França, os cientistas aplicaram RT-PCR para detecção de vírus entéricos (NLV, HAV, RV e EV) em moluscos, confirmando sua eficiência (LE GUYADER et al., 1998, 2000).

1.1.11- Métodos disponíveis para a detecção de contaminantes virais nas águas e moluscos

Por muitos anos, a microscopia eletrônica foi a única técnica disponível para o estudo dos vírus gastroentéricos não-cultiváveis e hoje permanece como opção técnica para exame de amostras clínicas. Contudo, a microscopia eletrônica é praticamente muito pouco sensível, requerendo na ordem de um milhão de partículas para visualização dos vírus (HELDBERG E OSTERHOLM, 1993). Esse número pode ser obtido em amostras clínicas tais como fezes, mas raramente estará presente em alimentos contaminados. Além disso, este método não é prático para ser aplicado em análises de rotina (LEES, 2000).

As metodologias desenvolvidas para a detecção viral refletem a evolução do conhecimento nesta área, que começou com o isolamento de vírus por indução da doença em animais de laboratório, detecção do efeito citopático viral *in vitro* nas culturas celulares, passando por metodologias imunológicas e moleculares para a detecção de material genético viral (METCALF et al., 1995).

Pelo fato dos vírus entéricos sobreviverem nos tecidos dos moluscos bivalves, fica evidente a necessidade de um monitoramento microbiológico constante dos mesmos (NATIONAL ADVISORY COMMITTEE, 1992, CHALMER & MCMILLAN, 1995, COOPER, 1995, WITTMAN & FLICK, 1995, LE GUYADER et al, 1996). Moluscos contaminados com vírus entéricos podem conter de 0,2 a 224 partículas infecciosas em cada 100 gramas de carne, sendo que o peso líquido da carne de uma ostra fica em torno de 12 a 20 gramas (WILLIAMS e FOUT, 1992). Durante os últimos 20 anos, vêm sendo desenvolvidos vários métodos de concentração e de extração viral a partir de águas e de tecidos de moluscos,

muitos deles sujeitos a modificações, com o objetivo de aumentar a eficácia da recuperação viral e da detecção de quantidades mínimas virais, além de minimizar o efeito citotóxico e eliminar os inibidores das reações de amplificação gênica (LEWIS & METCALF, 1988; SOBSEY et al., 1989; BOUCHRITI & GOYAL, 1993; SCHWAB, DE LEON, SOBSEY, 1994; HURST et al., 1997, TRAORE et al., 1998; ARNAL et al., 1999; SHIEH, KEVIN, BARIC, 1999).

A detecção de vírus entéricos em ostras envolve a extração viral dos tecidos dos moluscos e a concentração viral (TRAORE et al, 1998). A tabela 2 apresenta as etapas gerais no isolamento de patógenos virais de moluscos. Métodos convencionais para isolamento e identificação de vírus entéricos em moluscos por ensaios de cultura celular são bastante limitados, principalmente devido à falta de sensibilidade na detecção de baixas quantidades de vírus normalmente encontradas em amostras ambientais. Além disso, estes exigem um tempo prolongado de análise, alto custo, ocorrendo ainda a falta de linhagens de células permissivas ao cultivo *in vitro* de vários vírus de interesse (exemplos: calicivírus humano, vírus Norwalk, vírus da hepatite E) (SUNEN & SOBSEY, 1999). A maioria dos vírus entéricos epidemiologicamente importantes são difíceis de cultivar ou não são cultiváveis, visto que os vírus selvagens presentes no ambiente não estão adaptados ao cultivo *in vitro*, necessitando de longo período de adaptação (TRAORE et al, 1998).

Tabela 2: Etapas gerais no isolamento de patógenos virais de moluscos

-
- 1- Coleta da amostra e estocagem
 - 2- Trituração e homogeneização da carne
 - 3- Concentração viral e/ou extração do vírus ou extração do ácido nucléico
 - 4- Remoção dos inibidores da análise
 - 5- Análise por um método convencional (cultura) ou métodos moleculares
-

A técnica de quantificação de partículas virais por formação de placas de lise, ainda é um método extremamente utilizado na quantificação de vírus que podem ser replicados *in vitro* (SMITH et al., 1979). Experimentos que utilizam a semeadura experimental de amostras de água ou frutos do mar para posterior detecção por métodos moleculares utilizam esta técnica para determinar a porcentagem de recuperação das

partículas virais ao longo do processo de concentração (GAJARDO et al., 1995; GRINDE et al., 1995). Este método, apesar de ser sensível e detectar partículas virais viáveis, requer de 3 dias a mais de 6 semanas, dependendo da linhagem viral e da célula hospedeira utilizada (SOBSEY, 1982 e 1989) e necessitando que os vírus já estejam adaptados ao cultivo *in vitro* para dar bons resultados (IJZERMAN et al., 1997).

Os NLV e HAV são os mais importantes patógenos virais associados à doenças causadas pelo consumo de moluscos. A detecção de cepas selvagens de HAV por cultura celular é muito difícil, e os experimentos são realizados com cepas adaptadas (BINN et al., 1984; CROMEANS et al., 1987). Os NLV são ainda mais problemáticos: os métodos de cultura para este vírus ainda não foram descritos e geralmente eles são considerados como não cultiváveis.

Com relação à infecção pelo vírus da hepatite A, o monitoramento de frutos do mar pode ser feito por métodos envolvendo cultura celular *in vitro*. Entretanto, o tipo selvagem de HAV não cresce prontamente *in vitro* exigindo longos períodos de adaptação para a produção de um efeito citopático detectável (DE CHASTONAY & SIEGL, 1987).

A técnica de PCR oferece a melhor alternativa para o desenvolvimento de testes sensíveis e específicos para a detecção de vírus entéricos em moluscos, sendo imprescindível para vírus rotineiramente difíceis de identificar como HAV, NLV e RV (GREEN & LEWIS, 1999).

A transcrição reversa do RNA viral e a amplificação do DNA por PCR (RT-PCR) tem-se mostrado extremamente sensível na detecção do vírus do HAV (CROMEANS et al., 1997; JOTHIKUMAR et al., 1998), fornecendo uma amplificação de 10^5 – 10^6 cópias de uma seqüência específica, detectando um genoma cópia única (JANSEN et al., 1990).

O isolamento e a identificação etiológica do agente viral em surtos envolvendo moluscos têm sido dificultados devido à recuperação ineficiente durante o processamento, baixos níveis de contaminação e alta concentração de inibidores da reação de PCR em tecidos de ostras (IJZERMAN et al., 1996; SHIEH et al., 1999). A tabela 3 lista as vantagens e desvantagens das técnicas moleculares.

A carne do molusco representa uma matriz muito complexa do ponto de vista químico, contendo muitos compostos que podem interferir na eficiência do PCR, como carboidratos complexos (particularmente glicogênio) (HURST et al., 1997). Solutos orgânicos e inorgânicos podem inibir as enzimas polimerases (transcriptase reversa e Taq polimerase). Nucleases e proteases podem também degradar o genoma do vírus antes que ele seja amplificado. Além disto, várias proteínas, carboidratos e outros compostos

orgânicos podem se ligar aos íons magnésio e nucleotídeos requeridos pelas polimerases e alguns solutos podem ser tóxicos para estas enzimas (KOPECKA et al., 1993; SCHWAB et al., 1995, 1996; WILSON et al., 1997).

Os métodos de extração viral a partir de tecidos dos moluscos, chamados também de métodos de recuperação viral, são classificados em dois tipos. O primeiro, conhecido como "método de não concentração", baseia-se na extração direta dos vírus dos tecidos dos animais com ácidos, éter etílico, clorofórmio ou freon (CROMEANS et al., 1997). Por sua vez, os "métodos de concentração" envolvem uma combinação de etapas consecutivas a fim de desprender e depois eluir os vírus dos tecidos dos moluscos concentrando em volumes suficientemente pequenos, passíveis de serem processados para a identificação (LEWIS & METCALF, 1988; BOUHRITI & GOYAL, 1993; JAYKUS, DE LEON, SOBSEY, 1996; HENSHILWOOD et al., 1998; PINA et al., 1998; SHIEH et al., 1999). BOUHRITI & GOYAL (1993) afirmam que o método ideal deve ser rápido, simples e permitir uma recuperação viral alta e eficiente. Estes autores também destacam que uma revisão das metodologias existentes demonstrou que nenhuma delas é igualmente efetiva para produtos marinhos de diferentes lugares geográficos, sugerindo que os ensaios devem ser previamente realizados em condições laboratoriais, antes de serem aplicados para amostras de campo. O tipo de inibidores enzimáticos pode diferir com a espécie do molusco, restringindo potencialmente o uso de alguns métodos para uma única espécie. O tipo e concentração de inibidores enzimáticos também podem diferir de acordo com a estação de coleta e localização geográfica (HURST et al., 1997).

Apesar da extração direta de ácidos nucléicos ser geralmente um procedimento mais simples, ocorre destruição da integridade das partículas virais durante este processo, deixando o ácido nucléico viral desprotegido e exposto à potencial degradação além de inibir a infectividade viral, impedindo a comparação com experimentos de infectividade em culturas celulares (HURST et al., 1997).

Um método alternativo para a extração de RNA foi proposto e envolve o isolamento dos vírus diretamente de amostras ambientais e extratos de moluscos pela técnica de imuno-captura viral, o despreendimento do RNA por aquecimento e a subsequente reação de RT-PCR (JANSEN et al., 1990; DENG et al., 1994; JOTHIKUMAR et al., 1997).

Uma dificuldade encontrada no RT-PCR é que a maioria dos métodos limitam a sensibilidade da análise desde o início, porque mesmo que seja utilizada uma grande quantidade de amostra (50g) é necessário extrair alíquotas de pequenos volumes e produzir um concentrado que tenha simultaneamente pequeno volume e baixa concentração de inibidores enzimáticos.

Para métodos moleculares de detecção, os métodos de extração e concentração melhoram a eficácia da análise. Os métodos de concentração são realizados em dois esquemas gerais, designados de extração-concentração e adsorção-eluição-concentração. O objetivo em ambos os casos é separar os vírus da carne dos moluscos, fornecer um pequeno volume de solução aquosa que seja livre de material citotóxico e recuperar os vírus dos tecidos dos moluscos. Os métodos de adsorção-eluição-concentração são os mais utilizados atualmente (HURST et al., 1997).

Alguns pesquisadores têm proposto indicadores alternativos para melhor acessar a contaminação viral no ambiente marinho. Alguns dos mais promissores candidatos são várias espécies de bacteriófagos, por causa de sua similaridade físico-química e genômica com vírus entéricos humanos, sua abundância nos efluentes de esgotos e sua facilidade de análise (LUCENA et al., 1994; LEE et al., 1997; DORÉ et al., 2000; MUJICA & LUCENA, 2000). Os bacteriófagos não são considerados vírus entéricos porque, na verdade, eles infectam bactérias intestinais que estão presentes no hospedeiro animal e por isso eles próprios não representam risco à saúde pública. No entanto os bacteriófagos podem ser utilizados como potenciais indicadores de material fecal e de vírus entéricos no ambiente natural, além de serem também úteis como indicadores da remoção ou da destruição de vírus entéricos durante o processo de tratamento da água (HURST et al., 1997).

Tabela 3: Vantagens e desvantagens das técnicas moleculares

Vantagens	Desvantagens
1- Detecção mais rápida de organismos difíceis de cultivar	1- Não permite diferenciar entre organismos viáveis e não viáveis
2- Detecção de patógenos não-cultiváveis	2- Amostras ambientais geralmente precisam de extensa preparação e clarificação
3- Detecção simultânea de múltiplos patógenos	3- Resultados são mais qualitativos
4- Maior seletividade para detecção de grupos de organismos ou patógenos específicos dentro de um grupo	4- Técnicas quantitativas, quando disponíveis, são geralmente muito específicas para uma seqüência gênica modelo.

1.2- VÍRUS ENTÉRICOS

1.2.1- Generalidades

A Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental descreve o grupo dos vírus entéricos como sendo o modelo mais significativo, confiável e efetivo modelo a ser usado para monitoramento ambiental (PUIG et al., 1994; BOSCH et al., 1996). A família Picornaviridae é uma das maiores e mais importantes famílias de patógenos humanos, incluindo os gêneros *Enterovirus* (poliovírus, echovírus) e *Hepatovirus* (vírus da hepatite A).

O gênero *Enterovirus* (MINOR et al., 1990, 1999) faz parte da família Picornaviridae. Possuem genoma de RNA simples fita não segmentado. O virion é uma partícula caracteristicamente redonda, não-envelopado, com cerca de 27nm de diâmetro.

Os vírus entéricos e hepáticos eliminados nas fezes, são, geralmente, mais resistentes à inativação pelas condições ambientais do que os vírus relacionados a outros sítios. Uma exceção importante é o vírus da hepatite B, que é eliminado na bile para o intestino, mas é inativado e, conseqüentemente, não é transmitido pelas fezes.

Os vírus eliminados pelas fezes, normalmente sobrevivem diluídos nas águas bem como em superfícies secas, podendo permanecer estáveis por longos períodos de tempo quando adsorvidos à matéria particulada ou acumulados aos sedimentos (GERBA & GOYAL, 1978; METCALF et al., 1995).

Tratamentos de esgoto ineficientes, sistemas de irrigação contaminados e o uso de esterco animal são as primeiras fontes de contaminação fecal dos alimentos, suprimentos de águas e áreas de lazer. Qualquer destas condições promove um modo eficiente para reentrada contínua destes vírus no trato alimentar dos seus hospedeiros. Os vírus humanos transmitidos por água e alimentos e implicados em doenças estão representados na tabela 4 (SCIPIONI et al., 2000).

Há duzentos anos atrás tal contaminação era inevitável em quase todo o mundo. Porém hoje, com os modernos sistemas de saneamento, a rota de infecção fecal-oral foi interrompida em países desenvolvidos, mas ainda é comum no resto do mundo. Praias com índices elevados de coliformes fecais e a contaminação de locais de cultivo de mexilhões e ostras com esgotos promovem contínua exposição humana aos vírus entéricos e hepáticos (FLINT et al., 2000).

Tabela 4: Vírus patogênicos transmitidos ao homem pelos alimentos

Vírus			Sorotipos	Genoma	Doença
Família	Gênero	Espécie			
Caliciviridae	Calicivírus	Vírus tipo Norwalk (NLVs)	1	RNA simples-fita +7500 b	Gastroenterite
		SRSV (small round structured viruses)	3 ou mais	RNA simples-fita +7500 b	Gastroenterite
Picornaviridae	Enterovírus	Poliovírus	3	RNA simples-fita +7500 a 8500b	Paralisia, meningite
		Echovírus	32	RNA simples-fita +7500 a 8500b	Meningite, Infecção respiratória, conjuntivite
	Hepatovírus	Vírus da hepatite A	1	RNA simples-fita +7500b	Hepatite infecciosa
?	Hepatite tipo E	Vírus da hepatite E	1	RNA simples-fita +8000b	Hepatite infecciosa
Reoviridae	Rotavírus	Rotavírus humanos	3 (A, B, C)	RNA dupla-fita com 18 a 27 kpb	Gastroenterite
Astroviridae	Astrovírus	Astrovírus humanos	8 na Europa	RNA simples-fita +6800b	Gastroenterite
Adenoviridae	Mastadenovirus	Adenovírus humanos	41	DNA dupla-fita 30 a 37000b	Gastroenterite
Parvoviridae	Erythrovírus	Parvovírus B19	1	DNA simples-fita de 4600 a 6000b	Eritema infeccioso, algumas vezes aplasia medular e malformações fetais

Fonte: SCIPIONI et al., 2000

1.2.2- Virulência (LI et al., 1998; FLINT et al., 2000; LEES, 2000)

Refere-se a capacidade de um vírus causar a doença em um hospedeiro infectado e depende de fatores relacionados ao vírus, ao hospedeiro e ao ambiente. Somente quando todos estes fatores relacionados forem favoráveis, ocorrerá infecção e doença, sendo que cerca de 1/3 dos indivíduos que entrarem em contato com uma cepa viral patogênica irão adquirir a doença.

A virulência de uma única cepa viral pode variar dramaticamente dependendo da dose e rota de infecção, viabilidade das partículas virais e da etapa de replicação viral, bem como de fatores relacionados ao hospedeiro, tais como espécie, idade, susceptibilidade e imunidade. Fatores relacionados ao ambiente referem-se a condições ambientais que influenciam na estabilidade do vírus, na sua capacidade de virulência e também a fatores que possam predispor o hospedeiro e torná-lo mais susceptível ao vírus.

A susceptibilidade do hospedeiro à doença viral depende de fatores genéticos (receptores das células para o vírus, fatores hormonais) e não-genéticos (estresse, produção de radicais livres, dano celular que causa maior susceptibilidade). Por exemplo, os homens são mais susceptíveis a infecções virais do que as mulheres. Diferenças hormonais que afetam o sistema imune podem ser em parte responsáveis. Hepatites A, B e E são mais letais, e poliomielite paralisante é mais comum em mulheres grávidas do que em outras (FLINT, 2000).

Alimentos contaminados contêm números muito baixos de partículas virais, já que a contaminação é passiva e não existe multiplicação do vírus no alimento. As infecções virais geralmente tem uma dose infecciosa muito baixa. Um estudo realizado para NLV, mostrou que esta dose parece ser da ordem de 10-100 virions (CAUL, 1996b). Fica claro, portanto, que baixos títulos virais nos alimentos constituem um risco de infecção e métodos de detecção devem ser correspondentemente sensíveis.

1.2.3- Sazonalidade dos vírus (MBITHI, 1991)

Em regiões de clima temperado, infecções causadas por poliovírus, coxsackie- e echovirus geralmente alcançam picos no verão e no começo do outono. Isto sugere que a umidade relativa do ar (RU) e temperatura são importantes na sazonalidade de surtos por enterovírus. Já foi demonstrado que estes vírus sobrevivem melhor no ar e superfícies ambientais quando a umidade é maior do que 80%, mas o efeito da temperatura não está ainda totalmente esclarecido.

Com relação ao HAV, quando a sazonalidade é observada, os picos de surtos ocorrem principalmente no inverno. Foi demonstrado que o vírus sobrevive melhor a 5°C do que a 20 ou 35°C. A sobrevivência a 5°C foi inversamente proporcional a umidade relativa do ar, ou seja, uma baixa umidade favorece a viabilidade das partículas virais. Também foi comprovado que a influência da temperatura e da umidade na sobrevivência do HAV é muito diferente para os enterovírus (somente poliovírus foi usado como modelo). O HAV sobreviveu melhor que poliovírus com relação ao nível de umidade relativa do ar e temperatura testados. Os Rotavírus, outro vírus não-envelopado, também sobrevive melhor em superfícies inanimadas não porosas, quando a umidade do ar encontra-se em valores medianos ou baixos.

1.3- VÍRUS DA HEPATITE A (HAV)

1.3.1- Classificação do vírus

O HAV é um membro da família Picornaviridae (CROMEANS et al, 1994). Ele foi primeiramente descrito com um membro do gênero *Enterovirus* (sorotipo 72) por compartilhar com os outros vírus desse gênero algumas propriedades físico-químicas e características morfológicas e genômicas gerais, assim como a transmissão pela rota fecal-oral.

Atualmente, é classificado num gênero separado: *Hepatovirus* (Minor, 1999), devido a várias características: 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 é lenta e o isolamento primário em culturas celulares é difícil, lento e fastidioso. Além disso, a

multiplicação é lenta e o vírus selvagem não apresenta efeito citopático em culturas celulares e tende a estabelecer uma infecção persistente (BEARD & LEMON, 1999; SCIPIONI & THIRI, 2000).

O vírus possui um genoma bastante conservado, sendo que as diferentes cepas de HAV do mundo inteiro correspondem a um único sorotipo e foram classificadas em diferentes genotipos de acordo com análises de sequências (ROBERTSON et al, 1992; APAIRE-MARCHAIS et al., 1995; GOSWAMI et al., 1996). As regiões que foram sequenciadas para estas classificações incluem a região C-terminal de VP3 (+2020, -2211) e VP1 (+2984, -3265) (JANSSEN et al., 1990), a região VP1 amino-terminal (+2193, -2389) (ROBERTSON et al., 1992), e a região da junção VP1/ 2A (+2984, -3285; +2984, -3265; +2949, -3285; +2934, -3285; +2799, -3273) (LEMON et al., 1991; ROBERTSON et al, 1992). Baseando-se na seqüência genômica de 168 bases da junção VP1/ P2 de 152 cepas diferentes conhecidas de HAV, essas foram classificadas em quatro distintos genotipos humanos (I, II, III, VII) e três símios (IV, V, VI), que diferem em homologia por 15 a 25%. Cada grupo humano possui dois subgrupos (A e B) sendo que dentro de cada subgrupo a diferença em homologia é menor que 7,5% (ROBERTSON et al, 1992). Estudos de seqüenciamento de cepas de HAV, demonstraram que a maioria das cepas humanas pertence ao genotipo I, enquanto o segundo grupo mais prevalente pertence ao genotipo III (APAIRE-MARCHAIS et al, 1995; ROBERTSON et al., 1992).

No entanto, esta classificação baseada na análise de uma seqüência tão pequena (168 bases) é limitada, pois leva em consideração apenas 2% do genoma, não conseguindo detectar outros variantes genéticos e a presença de cepas em minoria é obscurecida pela cepa predominante numa amostra teste. Assim, mutações que ocorrem no genoma viral durante o progresso de um surto epidêmico não serão detectadas. Por isso alguns pesquisadores propuseram a classificação de HAV utilizando também análise de polimorfismos de seqüência, através do sequenciamento direto de produtos de PCR, com o objetivo de detectar variantes antigênicos (APAIRE-MARCHAIS et al., 1995; GOSWAMI et al., 1996).

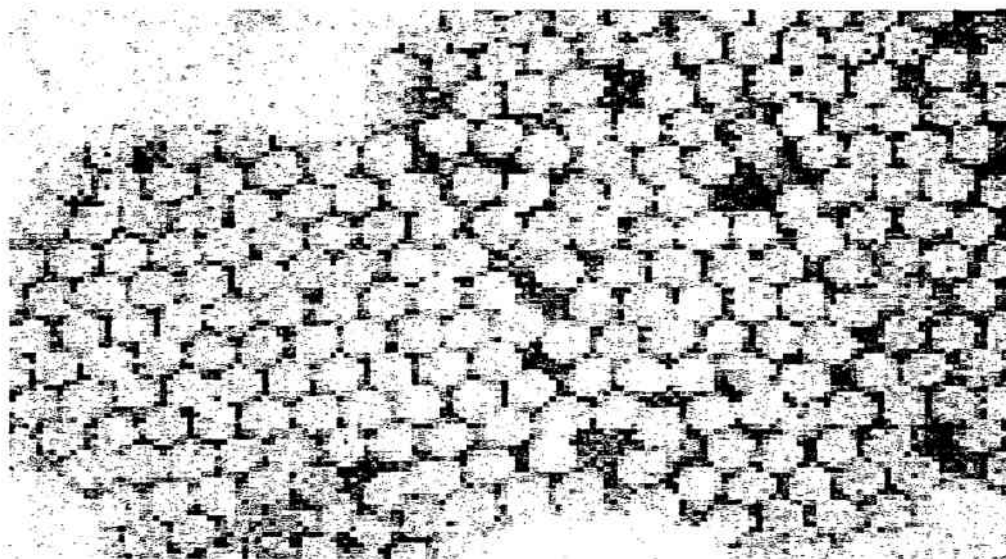


Figura 3: Fotografia de microscopia eletrônica do HAV (Fonte: CDC, 1999)

1.3.2- Características:

O HAV é um vírus não-envelopado com cerca de 27nm de diâmetro e é grosseiramente esférico ao microscópio eletrônico (Fig. 3). Seu capsídeo é de simetria icosaédrica com sessenta cópias dos três maiores polipeptídeos: 1B (VP2), 1C (VP3), 1D (VP1). Existe ainda uma pequena proteína de capsídeo, 1A (VP4), que está presente na família *Picornaviridae*. Seu genoma é de RNA simples-fita, não-segmentado com peso molecular de 7.500 pb (BEARD & LEMON, 1999). As extremidades 5' e 3' do genoma, constituem 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 codifica onze proteínas, cuja expressão é feita através de uma única poliproteína (BEARD & LEMON, 1999).

O HAV é amplamente distribuído pelo mundo e é extremamente resistente à degradação. O vírus pode sobreviver por aproximadamente um mês à temperatura ambiente e somente é parcialmente degradado após um tratamento de 12 horas a 60°C.

O HAV também sobrevive em fezes secas e superfícies de poliestireno, quando mantido a temperaturas entre 5 a 27°C (MBITHI et al., 1991). Dependendo das condições, o HAV pode manter-se estável no meio ambiente por meses. Para inativar o HAV é necessário o cozimento dos alimentos a mais que 90°C por 1 minuto ou a desinfecção das superfícies com uma solução 1:100 de hipoclorito de sódio em água (CDC, 1999).

Mais de 10⁸ partículas virais/ml de fezes podem ser excretadas durante a infecção, e estes vírus serão posteriormente liberados nas águas de esgotos contaminando, conseqüentemente, o meio ambiente (LE GUYADER et al., 1994).

1.3.3- Patogênese

O HAV é a principal causa de hepatites agudas no mundo inteiro, podendo conduzir para doença severa e até mesmo 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 (GRAAF et al., 1993).

1.3.3.1- Transmissão

O HAV é adquirido primariamente pela rota fecal-oral (HOLLINGER & TICEHURST, 1996), pelo contato pessoa-a-pessoa ou pela ingestão de água e alimentos contaminados. Via trato-alimentar, 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.

Em raras ocasiões, a infecção pelo HAV é transmitida por transfusão sanguínea ou produtos derivados do sangue coletados de doadores durante a fase virêmica da infecção. A transmissão pela saliva não foi demonstrada.

O período médio de incubação do HAV é cerca de 4 semanas.

1.3.3.2- Evolução clínica da doença

A infecção pode resultar numa variedade de casos clínicos, desde a infecção subclínica, detectável apenas por análises sorológicas, até hepatite fulminante que pode resultar em coma e morte. O fator mais significativo que influencia na doença clínica de uma infecção com HAV parece ser a idade (ROOS et al., 1991).

Aproximadamente 70% das infecções em crianças com idade abaixo de 6 anos são assintomáticas, se a doença ocorre, geralmente não é acompanhada de icterícia e somente sintomas bem leves podem ser percebidos durante aproximadamente 10 a 14 dias (WHITE & FENNER, 1995). Entre adolescentes e adultos, a infecção é geralmente sintomática com icterícia ocorrendo em mais de 70% dos pacientes.

Os adultos apresentam os sintomas da infecção durante 2 a 8 semanas, podendo inclusive permanecerem sintomas leves por até 4 meses. Cerca de 10%-15% dos pacientes sintomáticos tem a doença prolongada e debilitante por cerca de seis meses (CDC, 1999). A recuperação é completa e conduz à imunidade permanente.

A doença causada pela infecção do HAV tipicamente tem um início abrupto de sintomas que podem incluir febre, mal-estar, calafrios, dor de cabeça, anorexia, náusea e desconforto abdominal. O primeiro sintoma óbvio de hepatite é a urina escura, seguida de descoloração das fezes e icterícia da pele. A severidade aumenta com a idade do paciente. Em 5 a 15% dos pacientes ocorre hepato-esplenomegalia (ROSS, 1991; WHITE & FENNER, 1995).

O pico de infectividade ocorre durante o período de duas semanas antes do início da icterícia ou da elevação dos níveis de enzimas hepáticas, quando a concentração dos vírus nas fezes é mais alta (cerca de 10^8 virions por grama). O vírus é também detectável em títulos muito mais baixos no sangue e saliva antes do aparecimento dos sintomas característicos da doença e desaparece logo depois que os níveis séricos de transaminases alcançam seu pico. Portanto, as fezes de pacientes são mais prováveis de transmitir a infecção antes do aparecimento de icterícia (WHITE & FENNER, 1995).

A infecção pelo HAV parece ser responsável pelo aumento do número de casos com indicação de transplante de fígado. Pacientes com doenças hepáticas crônicas são especialmente vulneráveis aos danos pelo HAV, sendo que há um aumento no risco de morte por hepatite fulminante nestes pacientes. Desde que o vírus não causa infecção crônica, freqüentemente a morbidade pelo HAV é subestimada, havendo uma percepção errônea de que a doença não é séria. Porém, de fato a infecção por HAV é a causa mais comum de hepatites virais e uma causa substancial de morbidade e mortalidade (VAN DAMME, 2000).

1.3.3.4- Diagnóstico laboratorial

Os níveis séricos de alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST) encontram-se muito elevados nas hepatites virais, distinguindo-as das não-virais, mas não discriminam entre as hepatites A, B, C, D e E. Um único marcador sorológico, anti-HAV da classe IgM, é diagnóstico para hepatite. Radioimunoensaios (RIA) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) são os métodos de escolha para detecção do anticorpo IgM, que é demonstrável desde o aparecimento dos sinais e sintomas até cerca de 3-6 meses mais tarde.

1.3.4- Epidemiologia

A hepatite A corresponde a 20-25% dos casos de hepatite clinicamente sintomáticas, e aproximadamente 1,4 milhões de casos de hepatites são relatados por ano em todo mundo (STRADER et al., 1996).

A doença tende a ser prevalente em grupos sócio-econômicos mais baixos, bem como, em particular, grupos de alto risco ocupacional, trabalhadores do sistema de esgoto, usuários de drogas injetáveis e homossexuais masculinos.

Uma vez que as crianças são assintomáticas elas servem de fonte de infecção e qualquer membro da família com infecção pode contaminar outros.

Segundo o Centro de Controle de Doenças, CDC, nos Estados Unidos, 80 pessoas morrem por ano de hepatite A. O número de casos relatados, em 1997, foi em torno de 90.000 pessoas com hepatite A sintomática e 180.000 pessoas com infecção por HAV, o que representa o custo de 200 milhões de dólares anualmente. Entre 11% e 22% das pessoas com hepatite A são hospitalizadas. Adultos que apresentam a doença sintomática perdem uma média de 27 dias de trabalho (CDC, 1999).

A doença é hiperendêmica em países em desenvolvimento da Ásia, África e Américas do Sul e Central, onde há superpopulação, saneamento básico inadequado e baixas condições de higiene. Em lugares onde a pobreza e a carência são extremas, a infecção, geralmente subclínica, é adquirida na infância e conseqüentemente, os adultos possuem anticorpos protetores. A maioria dos casos clínicos são vistos em crianças e adultos jovens e em visitantes de países mais desenvolvidos.

A maioria dos surtos ocorrem, principalmente, quando poços e águas de consumo são contaminadas com esgotos.

Variações sazonais na incidência de hepatite A foram descritas em regiões de clima temperado com picos nos meses de outono e inverno (MBITHI, 1991). Contudo estas variações podem ser distorcidas por surtos da doença ou pelo impacto do turismo em larga escala (LE GUYADER, 2000).

Uma característica comum da hepatite A, em muitos países desenvolvidos, é o declínio da incidência da infecção, demonstrado por pesquisas epidemiológicas (MELE et al., 1990; KOFF, 1995; GDALEVICH et al., 1998). As taxas de soropositividade na população mais velha podem ser muito mais altas do que em adultos jovens. Em áreas endêmicas, a hepatite A é geralmente adquirida na infância, quando a doença pode ser branda ou subclínica e é, geralmente, adquirida pelo contato social. Em muitos países desenvolvidos, o declínio da exposição endêmica de crianças deixa a população exposta à potencial transmissão epidêmica do vírus da hepatite A de vetores tais como alimentos ou água, ou à aquisição da infecção em viagens para áreas endêmicas (ARMIGLIATO et al., 1986; PEBODY et al., 1998; LEES, 2000).

Uma vez que a população adulta torna-se cada vez mais susceptível à infecção e pelo fato de que está demonstrado que os moluscos bivalves são potenciais vetores do HAV em epidemias, torna-se importante sua contínua vigilância. A Austrália sofreu um importante surto de hepatite A, mediada por moluscos durante o ano de 1997, com 467 casos notificados de pessoas infectadas (ANON, 1999b; CONATY, et al., 2000).

1.3.5- Epidemiologia da doença associada a moluscos

A hepatite infecciosa causada pelo HAV é possivelmente a doença mais séria causada pela ingestão de moluscos bivalves crus ou levemente cozidos e também de outros alimentos que requerem preparação manual sem que sejam posteriormente cozidos antes do consumo (saladas, saladas de frutas, frios, sanduíches, etc (GROHMAN et al., 1980; GOUVEA et al., 1994; ROMALDE et al., 1994; CROMEANS et al., 1997; LEES, 2000).

Historicamente, o HAV tem sido o vírus mais comum associado a surtos pelo consumo de água e alimentos e relatos atuais continuam ocorrendo (HUTIN et al., 1999; DE SERRES et al., 1999; PEBODY et al., 1998).

O primeiro surto de hepatite infecciosa documentado ocorreu na Suécia em 1955, quando 629 casos foram associados ao consumo de ostras cruas (ROOS, 1956). Desde

então muitos surtos de hepatite A no mundo todo tem sido associados ao consumo de moluscos bivalves e foram documentados por vários autores (RICHARDS, 1985; JAYKUS et al., 1994; RIPPEY, 1994). Algumas vezes estes surtos assumem escala epidêmica. Um importante surto de hepatite A ocorreu em Shanghai, China, em 1988, quando 300.000 casos foram associados ao consumo de moluscos coletados de uma área poluída com esgotos (HALLIDAY et al., 1991; TANG et al., 1991). Nos Estados Unidos, também foram relatados alguns surtos de hepatite A relacionados ao consumo de moluscos (RICHARDS, 1985; RIPPEY, 1994), assim como no Reino Unido (BOSTO et al., 1979; SOCKETT et al., 1985) na Itália (MELE et al., 1989; MALFAIT et al., 1996) e no Japão (FUJIYAMA et al., 1985). Uma epidemia de hepatite A, ocorrida no oeste da França em 1991/1992, envolvendo cerca de 800 casos foi associada ao consumo de moluscos, apesar de não ter sido detectada evidência alguma que comprovasse esta correlação. (APAIRE-MARCHAIS et al., 1995). Cerca de 1.000 casos de hepatite A, associada com a ingestão de ostras e mariscos, ocorreram em vários estados americanos durante o período de 1961 a 1964 (RICHARDS, 1985). Desde então, episódios de menor proporção ocorreram, em 1973, associado a ostras na Lousiana (GLASS et al., 1996a) e, em 1988, associado a ostras da Flórida consumidas em vários Estados (DESENCLOS et al., 1991). O surto da Lousiana foi atribuído à poluição com esgotos das áreas de cultivo através de enchente do rio Mississipi e o surto da Flórida ao cultivo ilegal em áreas contaminadas. Apesar dos incidentes citados, surtos de hepatite A são menos freqüentes do que outros, particularmente gastroenterites. O demorado período de incubação do HAV (média de 4 semanas) torna muito difícil a associação da doença com um alimento particular. Normalmente, o alimento não está mais disponível para testes e as histórias de consumo são inconclusivas. Em conseqüência, os relatos de hepatite A associados à moluscos podem ser divididos em dois grupos: o de grandes surtos, onde o veículo de infecção é mais óbvio; e o de infecções esporádicas, onde o veículo só pode ser evidenciado através de investigações epidemiológicas. Já que tal investigação é muito difícil de ser realizada, a associação do consumo de moluscos contaminados com casos esporádicos de hepatite A é, provavelmente, considerada não relatável (RIPPEY, 1994). No entanto, um estudo realizado na Itália identificou o consumo de moluscos marinhos como um dos mais importantes fatores de risco (MELE et al., 1991). Inclusive, estimativas recentes sugerem que os moluscos podem ser responsáveis por 70% de todos os casos de hepatite na Itália (SALAMINA e D' ARGENIO, 1998).

1.3.6- Prevenção da doença: imunização e vacina da hepatite A

Um grande número de vacinas contra hepatite A, utilizando vírus vivos atenuados ou vírus inativados por formalina, vem sendo estudado. As vacinas atenuadas são preparadas com o HAV crescido em culturas de células fetais de rim de macaco ou células de pulmão humano (ANDRE et al., 1990). O vírus tipo selvagem replica muito lentamente e apresenta um título muito baixo. Com sucessivas passagens celulares, o vírus torna-se progressivamente adaptado ao crescimento em cultura, resultando na sua atenuação, devido a mutações nas proteínas virais envolvidas na replicação do RNA (SJOGREN et al., 1987; JANSEN et al., 1988). As vantagens evidentes da vacina viva atenuada, incluem os fatos de que uma baixa dose do inóculo viral é necessária para imunização, de que uma única dose é altamente efetiva e de que há potencial para induzir imunidade permanente (ABBAS et al., 2000). Por outro lado, existe possibilidade de reversão para o vírus selvagem e foram observados casos de atividade aumentada de amino-transferases indicando injúria hepática, presença do vírus vivo excretado nas fezes e baixa aquisição de imunidade (SHERLOCK et al., 1993).

Em 1978, Provost e Hilleman iniciaram os estudos em cobaias para o desenvolvimento de uma vacina anti-HAV inativada, procurando eliminar os problemas associados com as vacinas vivas. Hoje é utilizado preferencialmente o cultivo "*in vitro*" do antígeno viral em células embrionárias de fibroblastos humanos para a formulação de vacinas inativadas. No preparo da vacina inativada, o HAV viável é inativado por formalina a 35-37°C, utilizando concentrações de 1: 2000 e 1: 4000 (PROVOST & HILLEMANN, 1978; SIEGL & LEMON, 1990). Assim como na inativação do poliovírus, a infectividade do vírus decresce 1 milhão de vezes em 24 a 48 horas. Os vírus infecciosos residuais são removidos por filtração das suspensões do antígeno e por tratamento com formalina durante cerca de 20 dias. O antígeno purificado inativado é, então, adsorvido ao hidróxido de alumínio. Não há risco de reversão para o vírus selvagem e os problemas encontrados para o uso de vacinas vivas são geralmente eliminados com o processo de inativação viral. Vários estudos comprovaram a eficácia da proteção da vacina inativada, além de boa tolerância, segurança, imunogenicidade e indução rápida de imunidade, a qual é duradoura (WERZBERGER et al., 1992; SHOUVAL et al., 1993; INNIS et al., 1994). Por isso, a vacina inativada foi aprovada pela OMS e pelo FDA (CDC, 1999).

Atualmente, dois produtos são usados para prevenir a infecção pelo HAV:

1.3.6.1- Imunoglobulina: é uma preparação de anticorpos que pode ser administrada antes da exposição para obter proteção passiva por curto período de tempo e para pessoas que já foram expostas ao vírus. A imunoglobulina deve ser administrada até duas semanas após a exposição para um máximo de proteção (CDC, 1999). Seu mecanismo de ação ocorre pela imunidade ativa-passiva. Ela previne a doença clínica, mas permite o desenvolvimento da doença subclínica. Promove proteção por apenas 3-6 meses, necessitando repetir a inoculação se a exposição persistir por mais que 180 dias (STRADER et al., 1996).

1.3.6.2- Vacina anti-HAV: foi licenciada nos Estados Unidos para uso a partir dos dois anos de idade (STRADER et al., 1996). A vacina é recomendada (antes da exposição ao vírus) para pessoas que estão mais expostas à infecção ou que são mais susceptíveis a adquirir doença grave se forem infectadas com HAV. As vacinas licenciadas nos Estados Unidos são: HAVRIX® (fabricada pela SmithKline Beecham Biologicals) e VAQTA® (fabricada pela Merck & Co., Inc). Ambas são produzidas pela inativação do vírus, similar a vacina Salk-polio inativada. A vacina pode ser administrada ao mesmo tempo que a imunoglobulina, ou junto com outras vacinas como vacina contra hepatite B, raiva, difteria, poliovírus (oral ou inativada), cólera, tétano, febre amarela, considerando os sítios de administração indicados. A proteção conferida pela vacina começa quatro semanas depois da primeira dose. Estudos sugerem que a proteção permanece por, no mínimo, 20 anos (CDC, 1999).

1.3.7- Inativação do HAV em moluscos

O estudo realizado por CROCI et al. (1999), sugere que o corpo dos moluscos pode proteger o vírus do efeito do aquecimento tendo sido confirmado o papel protetor da carne do molusco para o HAV. Sob condições experimentais, os tratamentos a 60°C por 30 minutos, 80°C por 15 minutos e uma imersão a 100°C por 1 minuto não foram suficientes para inativar completamente o vírus, demonstrando haver ainda partículas virais infecciosas após estes tratamentos. Somente após dois minutos de imersão a 100°C (temperatura interna do molusco de 90°C) o vírus foi completamente inativado.

Este fato conduz à advertência de ingerir somente moluscos cozidos, prestando particular atenção nos tempos e temperaturas de cozimento. Preparações domésticas de moluscos geralmente envolvem aquecimento até abertura das conchas, o que é geralmente obtido a temperaturas abaixo de 70°C por 47+/- 5s (KOFF & SEAR, 1967). Este aquecimento não é suficiente para a descontaminação dos moluscos. Nos primeiros minutos de tratamento, a temperatura interna do produto é, em média, 7-8°C menor que a temperatura interna (CROCI et al., 1999).

A base de uma campanha efetiva para a prevenção e difusão de doenças virais, particularmente hepatite A, é a divulgação de informações corretas aos consumidores, especialmente com respeito ao alto risco do consumo de determinados alimentos, tais como moluscos crus ou levemente cozidos. Contudo, o cozimento raramente garante um produto livre de contaminação microbiológica, pois o aquecimento excessivo dos moluscos causa mudanças organolépticas indesejáveis, tais como enrijecimento na textura da carne do molusco (WEST et al., 1985).

1.4- ROTAVÍRUS

Os rotavírus são responsáveis por gastroenterites severas em humanos e em animais. Após replicarem-se no trato gastrointestinal, estes vírus são excretados e também podem se dispersar em águas ambientais principalmente devido à resistência dos mesmos a agentes físico-químicos utilizados no tratamento de águas servidas. Uma vez dispersos no meio ambiente, principalmente as crianças podem ser contaminadas através da ingestão de água e alimentos contaminados pelos rotavírus.

Os rotavírus pertencem a um gênero da família Reoviridae (BISHOP, 1996; SPIONE, 2000). Os virions apresentam morfologia esférica com simetria icosaédrica, não-envelopados, e possuem cerca de 72nm de diâmetro. O genoma é constituído de RNA dupla-fita, consistindo de 11 segmentos separados, que possuem de 18 a 27 kpb no total. Cada segmento representa um gene que codifica uma proteína seja ela estrutural ou não estrutural (ESTES, 1996).

A partícula viral é uma estrutura tripla, formada por capsídeo duplo, um externo e outro interno, formados por proteínas distintas, e por um núcleo mais interno que envolve o RNA viral.

As proteínas estruturais são denominadas VP e numeradas de 1 a 7 de acordo com o gene pelo qual cada uma é codificada. VP7 (codificada pelo gene 7, 8 ou 9 dependendo da cepa viral) é glicosilada e forma o capsídeo externo, que é penetrado por mais de 60 espículas da proteína VP4 (codificada pelo gene 4), esta proteína é hemaglutinante e responsável pelo ataque do vírus à célula. Para poder penetrar na célula ocorre a clivagem de VP4 em VP5 e VP8 pela tripsina (ESTES & COHEN, 1989). VP6 forma o capsídeo interno. O núcleo interno é composto pelas proteínas VP1, VP2 e VP3 (codificadas pelos genes 1, 2, 3 respectivamente).

São reconhecidos sete sorogrupos de rotavírus, definidos de acordo com a antigenicidade da proteína VP6, e nomeados de A a G, mas somente três são infectantes para o homem (A, B e C). Os rotavírus do grupo A podem ainda ser subdivididos de acordo com a antigenicidade de VP6 em subgrupos I e II.

Rotavírus do grupo A são freqüentemente identificados como o mais importante patógeno viral em doenças diarreicas que requerem tratamento ou hospitalização em crianças abaixo de 2 anos de idade. São os maiores responsáveis por diarreias severas em crianças no mundo todo (KAPIKIAN E CHANOCK, 1996; GLASS et al., 1996).

A via de contaminação é fecal-oral e o período de incubação é cerca de 48 horas. Os sintomas são gastroenterite com vômitos, diarreia aquosa e um pouco de febre.

Em pacientes imunocomprometidos e pacientes com HIV, os rotavírus podem causar várias complicações associadas as diarreias, tais como desidratação, desequilíbrios eletrolíticos, acidose, sintomas neurológicos e infecção persistente com grande envolvimento de todo o organismo (GILGER et al., 1992).

Em adultos os casos de gastroenterites causadas pelos rotavírus são menos freqüentes e estão associadas a contaminação pelos rotavírus do grupo B (SHAW et GREENBERG, 1999), ocorrendo pelo contato com crianças infectadas ou através da ingestão de água ou alimentos contaminados. (LEES, 2000; DUBOIS et al., 1997).

Em países em desenvolvimento ocorrem 125 milhões de casos e estima-se que 873.000 casos chegam a óbito (números para crianças menores que 5 anos) (KAPIKIAN E CHANOCK, 1996).

Os vírus são eliminados nas fezes em grandes quantidades ($> 10^{12}$ partículas virais/ g fezes) levando à presença do vírus prontamente detectável em efluentes de esgotos e águas poluídas (GAJARDO et al., 1995; DUBOIS et al., 1997). Conseqüentemente a presença de rotavírus tem sido demonstrada em moluscos bivalves crescidos em águas contaminadas. Os rotavírus no entanto, não estão freqüentemente

associados com doença infecciosa devido ao consumo de alimentos do mar. A ausência geral de sintomas na população adulta provavelmente influencia nesta falta de associação. Adultos mais que as crianças tendem a ser os consumidores primários de moluscos marinhos e tendem a não demonstrar a doença clínica seguinte à infecção de rotavírus. A resistência à infecção severa relacionada à idade pode ser devida à imunidade ativa reforçada por infecção repetida através da vida (BISHOP, 1996).

1.5- POLIOVÍRUS

Os poliovírus pertencem ao gênero *Enterovirus*, família *Picornaviridae*, existindo 3 sorotipos. As partículas virais possuem um capsídeo de simetria icosaédrica e um diâmetro entre 25 e 30nm. O genoma é composto de RNA simples-fita de polaridade positiva de 7,5 a 8,5 kb, que constitui um único segmento gênico ORF. Na extremidade 5' do genoma estão os genes que codificam as proteínas estruturais (VP 1 a 4), e segue para extremidade 3' onde localizam-se os genes codantes para as proteínas não-estruturais. Na realidade, uma única poliproteína é sintetizada e posteriormente clivada em 11 proteínas individuais (MELNICK, 1996).

Os vírus circulantes no mundo inteiro são principalmente a forma selvagem nos países em vias de desenvolvimento e a forma vacinal nos países industrializados. Os hospedeiros naturais são os homens e chimpanzés. Os vírus são excretados nas fezes ou pela naso-faringe (SCIPIONI et al., 2000).

A transmissão da infecção é pela via fecal-oral. Pode ocorrer também a disseminação caso a caso pela contaminação direta das mãos, de alimentos ou utensílios alimentares, especialmente em locais superlotados ou onde as condições de higiene são precárias.

O vírus multiplica-se na faringe e intestino delgado, espalha-se pelos linfonodos até corrente sanguínea, ocorrendo viremia e dissemina-se pelo corpo. Em alguns poucos casos o sistema nervoso central é envolvido. O vírus é conduzido pela corrente sanguínea para medula espinhal onde se multiplica. As lesões resultantes são distribuídas através da medula espinhal e partes do cérebro, mas ocorre grande variação na severidade da doença o que ocasiona um largo espectro de apresentações clínicas. O período de incubação é de 1 a 2 semanas, ou entre 3 dias e 1 mês. A imunidade adquirida é permanente, mas monotipo (WHITE & FENNER, 1995).

A evolução genética dos vírus é rápida e ocorre por mutação (10 mutações por genoma por multiplicação) e por recombinação. Os poliovírus de diferentes sorotipos são antigenicamente distintos e não conferem imunidade cruzada.

Quanto a ocorrência sazonal, nos trópicos a doença é endêmica o ano todo e em países de clima temperado, antes da introdução da vacinação ela classicamente ocorria em epidemias no verão e outono (WHITE & FENNER, 1995).

As crianças constituem o reservatório de infecção. Onde as condições de higiene são baixas, a frequência de transmissão é maior. Nos países desenvolvidos onde foram introduzidos modernos padrões de higiene e saneamento, a disseminação do vírus pela rota fecal-oral ficou limitada e a incidência aumentou em adolescentes e adultos, porque a maioria da população não estava adquirindo imunidade até adolescência.

O controle do poliovírus só tornou-se efetivo com o desenvolvimento de duas vacinas. O tipo Salk, que é o vírus inativado com formol e o tipo Sabin, trivalente, atenuada (MINOR, 1999). A Organização Mundial da Saúde (OMS) adotou em 1988 um programa de erradicação mundial da poliomielite que é esperado para o ano 2003. A redução considerável da incidência global da doença é atribuída ao sucesso da vacinação pela vacina oral Sabin atenuada (LEVY, 1999), que consiste das cepas atenuadas de três sorotipos, derivadas da passagem seriada dos vírus em culturas primárias de células de rim de macaco.

Os poliovírus, sorotipo 2, linhagem vacinal, podem ser utilizados no monitoramento da qualidade das detecções realizadas em moluscos para os outros vírus (DIVIZIA et al., 1999). Os poliovírus são facilmente manipuláveis em laboratório, podem ser cultivados *in vitro* em grande quantidade, possuem pronta disponibilidade de dados de sequências gênicas para elaboração de iniciadores para RT-PCR, além de, principalmente, servirem como bons indicadores de poluição fecal humana no meio ambiente (MUSCILLO et al., 1997).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

- Padronizar uma metodologia de detecção do vírus da hepatite A, por RT-PCR, em ostras *Crassostrea gigas* experimentalmente inoculadas e aplicá-la para análise de ostras produzidas em quatro locais de cultivo da grande Florianópolis, coletadas durante um ano.

2.2- Objetivos Específicos

- Produzir fluidos infecciosos do vírus da hepatite A cepa HM175 em células fetais de rim de macaco Rhesus (Frhk-4).
- Testar a eficiência do método de preparação dos extratos tissulares de ostras *Crassostrea gigas*, experimentalmente inoculadas com o vírus da hepatite A, cepa HM175 através da reação de RT-PCR.
- Avaliar a sensibilidade da reação de RT-PCR específica para a detecção do vírus da hepatite A cepa HM 175, em RNA de fluido viral e em extratos tissulares de ostras *Crassostrea gigas*, experimentalmente inoculadas.
- Avaliar a recuperação virai a partir de extratos tissulares de ostras *Crassostrea gigas*, experimentalmente inoculadas.
- Aplicar a metodologia padronizada para a detecção de vírus da hepatite A na detecção do rotavírus da linhagem símia SA11 e do poliovírus vacinal sorotipo 2.
- Propor a realização de um método de RT-PCR multiplex para detecção simultânea dos três tipos virais e comparar com o método específico.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Vírus e células:

3.1.1- Vírus da Hepatite A (HAV) cepa HM 175

Este vírus foi propagado em células Frhk-4 (células fetais de rim de macaco Rhesus), e titulado pelo método de análise de formação de placas de lise, como descrito previamente por CROMEANS et al (1987) e também por imunofluorescência (BINN et al., 1984).

3.1.2- Rotavírus Símio SA11

Este vírus foi propagado em células MA104 (células fetais de rim de macaco Rhesus), e titulado por imunofluorescência, com título de 3×10^7 pfu/ ml (SANTOS, 2000).

3.1.3- Poliovírus sorotipo 2

Este vírus foi propagado em células VERO (células fetais de rim de Macaco Verde da África), titulado por análise de formação de placas de lise, com título viral de 10^7 pfu/ml.

3.2- Cultivo de células FrhK-4 :

Foi utilizada a linhagem celular Frhk-4, células fetais de rins de macaco Rhesus (CROMEANS et al., 1987), 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 preparação de estoques virais de HAV e de placas para a análise da citotoxicidade, efeitos citopáticos e titulação viral.

3.2.1- Preparação do Meio:

O cultivo das células foi realizado em garrafas descartáveis de 25 cm² e 75 cm², e com menor frequência em placas com 12 ou 24 poços, contendo meio Mínimo Essencial com sais de Earle's (MEM®, Sigma). Este último trata-se de um reagente em pó, estocado em geladeira, e em seu preparo, foram adicionados 19,4 gramas de meio e 2,2 gramas de

bicarbonato de sódio (NaHCO_3 , Sigma) sendo ambos dissolvidos em 2 litros de água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração, em filtro Millipore estéril, no fluxo laminar. Ao final, o meio reconstituído MEM[®] foi suplementado com: glutamina 2 mM (Sigma), aminoácidos não essenciais 1X (Gibco), HEPES 15mM (Sigma), soro fetal bovino (SFB, Gibco) a 10%, antibióticos penicilina G 100U/ml (Gibco) e sulfato de estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ (Gibco) e fungizona (Gibco) 0,25 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.2- Manutenção das células FrhK-4

As células foram mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% CO_2 , sendo observadas diariamente, de modo a verificar a formação da monocamada de células. Quando estas mostraram-se homogêneas e confluentes, foi efetuado o repique das mesmas para expansão do crescimento.

3.2.3- Propagação das células FrhK-4

Foram produzidas subculturas, passagens sucessivas das células com a finalidade de manutenção da viabilidade celular. O meio de crescimento das garrafas que apresentavam uma monocamada celular confluyente foi removido, e as células foram lavadas duas vezes com tampão salina fosfato (PBS) esterilizado, constituído por: NaCl 150 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 20 mM e KCl 27 mM, pH 7,2. Em seguida, foi realizado um tratamento enzimático pela adição de 0,5ml (para 25 cm^2) ou 1,0ml (para 75 cm^2) de tripsina (1:250, Sigma) utilizada na forma de solução a 0,05% (NaCl 0,8%; KCl 0,04%; Dextrose 0,1%; NaHCO_3 0,058%, EDTA 0,02% e vermelho de fenol 0,045%), na quantidade suficiente para cobrir a monocamada celular e foram incubadas a 37°C durante 2 minutos. Após a desagregação da monocamada, as células dissociadas imediatamente receberam meio MEM[®] suplementado com SFB, com a finalidade de bloquear a ação da tripsina e evitar citólise. As células foram ressuspensas e distribuídas em novas garrafas e suas subculturas foram incubadas nas condições de temperatura e atmosfera de CO_2 anteriormente descritas com a finalidade de formação de novas monocamadas.

3.3- Infecção de células FrhK-4 com o vírus HAV, cepa HM 175

Foram realizadas sucessivas passagens do vírus HAV (CROMEANS et al, 1987) em cultura celular para adaptação do vírus e aumento do título infeccioso viral. Nos experimentos, foram utilizados sobrenadantes infecciosos de células FrhK-4 infectadas *in vitro*.

As células FrhK-4 foram previamente cultivadas como descrito anteriormente até atingirem uma monocamada confluyente. O meio de crescimento foi então removido e as células lavadas duas vezes com PBS estéril pH7,2. Neste ponto, foram inoculadas com 1ml de fluido celular infeccioso de HAV (estocado no laboratório e não quantificado) e incubadas por 90 minutos sob atmosfera de 5% CO₂ a 37°C, para ocorrer adsorção das partículas virais às células. Após este período, o excesso de inóculo foi removido e as células foram suplementadas com MEM completo contendo 2% FSC (meio de infecção) para manutenção celular e incubadas 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 24 horas, verificando 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 a -80°C e descongeladas a 37°C, por três vezes, para rompimento das membranas ocorrendo total liberação das partículas virais ainda no citoplasma celular. A suspensão foi transferida para tubos de centrifuga e centrifugada a 350Xg, durante 20 minutos, a 4°C, em centrífuga refrigerada, sendo o sobrenadante transferido para outro tubo.

O procedimento de preparação dos fluidos infecciosos foi realizado rotineiramente a fim de obter um estoque virai com alto título infeccioso. Quando o efeito citopático característico tornou-se perceptível após 48 horas de infecção e um máximo de destruição celular foi visível em 5-6 dias pós-infecção, os fluidos foram considerados prontos para estocagem. O sobrenadante final resultante (o próprio fluido infeccioso) foi aliquoteado em volumes de 1ml em tubos eppendorf e estocado em freezer a -80°C.

3.4- Titulação do vírus HAV

O título infeccioso do estoque viral produzido conforme o item 3.2 foi determinado através de duas técnicas disponíveis: o ensaio de imunofluorescência (IFA) indireta conforme descrito por BARARDI et al. (1998), com algumas modificações, e também pelo método de análise de formação de placas de lise (CROMEANS et al., 1987).

3.4.1- Titulação do HAV por imunofluorescência (IFA) indireta

Células FrhK-4 foram cultivadas em meio de crescimento durante 24 ou 48h em câmaras de 8 poços estéreis (Lab Tek, NUNC), especiais para este tipo de ensaio, até a formação de um tapete confluyente. A concentração celular ideal de células em cada poço da câmara foi de 5×10^4 células/mL.

O fluido infeccioso foi diluído seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} , em meio de infecção, e distribuído nas câmaras segundo o esquema apresentado na figura 4. Foram realizados também controles negativos contendo somente o meio de infecção e a monocamada de células.

Negativo	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Negativo	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}

Figura 4: Esquema de preparação das câmaras para titulação do HAV.

Para infecção viral, as células contidas em cada poço foram semeadas com $100 \mu\text{L}$ de cada diluição viral, conforme o esquema da figura 4. As câmaras foram incubadas durante 90 minutos a 37°C , sob atmosfera de 5% de CO_2 para adsorção viral às células. Após esse período, o inóculo foi removido e em seu lugar, foi adicionado $300 \mu\text{l}$ de meio

de infecção. As células foram então incubadas por 6 a 7 dias, sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera acima mencionadas.

Após o período de incubação, o meio foi removido das câmaras. Em seguida as células foram fixadas à câmara pela adição de 300µl de metanol a -20°C e mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida para garantir adequada fixação das células e posteriormente as câmaras foram secas ao ar. As células foram reidratadas com 100µl PBS, retirado após 5 minutos. A próxima incubação foi realizada com 300µl de solução bloqueadora (PBS, soroalbumina bovina a 1% e Tween-20 a 0,05%), durante 15 minutos, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo monoclonal na etapa seguinte. Em seguida cada poço foi incubado com o anticorpo monoclonal MAB 8241, diluído 1:100 em solução bloqueadora, e incubado por 16 horas a 4°C. Após, as células foram lavadas três vezes com solução bloqueadora e finalmente incubadas por 15 minutos a 37°C, com volume de 100µl adicionado a cada poço, de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fluoresceína (FITC, Selenius), diluído a 1:50. As células foram lavadas três vezes com solução bloqueadora. Deixou-se secar para proceder a adição de 10 µL de meio de montagem (PBS a 40%, glicerol 50%, formalina a 5%, NaCl a 5% e DABCO a 2,5% pH 8,6). As câmaras foram recobertas por lamínula para a realização da leitura em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40). O título viral foi determinado através da observação de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos/mL (ffu/mL).

3.4.2- Titulação do fluido infeccioso pelo método de análise de formação de placas de lise (CROMEANS et al., 1987)

Células Frhk-4 foram adicionadas em uma densidade celular de 2×10^5 células/ml em placas de 12 e 24 poços e cultivadas até confluência. Após 48 horas, as células em cada poço foram infectadas com 0,5ml de diluições do fluido infeccioso HAV variando de 10^{-1} a 10^{-10} e mantidas a 37°C em incubadora com atmosfera de CO₂ a 5% por 90 minutos para adsorção viral. Após este período, adicionou-se meio de infecção contendo meio MEM 1X + 0.75% carboximetilcelulose. Foram realizados também controles negativos de células não infectadas. As células foram mantidas sob as condições de atmosfera e temperatura descritas acima e observadas por 10 dias. Após este período, o meio foi retirado por aspiração à vácuo e as células foram coradas com solução 0,1%

(p/v) de Negro de Naftaleno, contendo 5% de ácido acético (v/v), pH 2,3-2,5, durante 30min, depois o corante foi eliminado.

O título viral foi determinado pela observação em microscópio óptico invertido da última diluição do vírus que apresentou efeito citopático caracterizado por focos infecciosos mais corados ou placas claras de lise celular. O título viral foi calculado da seguinte forma:

N° de focos de infecção x recíproca da diluição x recíproca do volume em ml

3.5- Extração do RNA viral a partir do fluido infeccioso do vírus HAV

3.5.1- Extração com fenol

A extração do RNA do fluido infeccioso de HAV, previamente titulado, foi realizada segundo a metodologia proposta por SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS (1989).

O processo foi realizado em duplicata para cada amostra, onde foi adicionado 500 μ L do fluido infeccioso em cada tubo tipo eppendorf contendo mesmo volume de Freon 113 Vertrel (Dupont) (Triclorotrifluoroetano, Aldrich). Em seguida os tubos foram agitados vigorosamente por 30seg para homogeneização do conteúdo e centrifugados a 30.000Xg por 5 min em minicentrífuga eppendorf, à temperatura ambiente. Após, a fase aquosa foi transferida com auxílio de micropipeta para novos tubos estéreis, acrescida de dodecil sulfato de sódio (10mg/mL) e incubada a 37°C, durante 30 min. Ao final deste período, foi adicionado à cada amostra 500 μ L da mistura dos solventes fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Novamente, as amostras foram agitadas por 30 segundos e centrifugadas a 30.000 Xg por 5 min, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para tubos novos e acrescida de 500 μ L de clorofórmio, agitada vigorosamente por 30 seg e centrifugada nas mesmas condições anteriores. Para precipitação dos ácidos nucleicos, foram adicionados à fase aquosa acetato de sódio 3M pH 5,3 na concentração final de 0,3M e três volumes de etanol absoluto (Merck) mantido a -20°C. As amostras de RNA foram incubadas a -20°C durante uma noite ou alternativamente por 30 minutos a -80°C. Nesta fase o RNA pode ser estocado a -20°C por longos períodos de tempo.

Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 30.000Xg, durante 20min a 4°C. A fase aquosa foi desprezada e em cada tubo foram acrescentados 3 volumes (1,5ml) de etanol 70% mantido a -20°C. Os tubos foram centrifugados a 30.000Xg, por

20min, a 4°C. A fase aquosa foi descartada, o tubo vertido sob papel absorvente e o RNA precipitado foi seco ao ar. O precipitado foi ressuspensão em 50µL de água tratada com dietilpirocarbonato® (Gibco), e estocado a -20°C para posterior utilização.

Para avaliar o grau de pureza em relação à contaminação por proteínas as amostras de RNA foram dosadas por leitura espectrofotométrica a UV 260/280nm conforme descrito por SAMBROOK et al, (1989). Esta leitura também foi realizada para as amostras obtidas com o método de extração por Trizol®.

3.5.2- Extração com Trizol®

Foi realizada a extração de 500µl de fluido infeccioso viral, em duplicata, conforme as instruções do fabricante, com algumas modificações de volumes, como segue:

As amostras foram processadas também em duplicata, onde adicionou-se 500µl de fluido viral em tubos tipo eppendorf estéreis e igual volume de reagente Trizol®. A lise das células na suspensão de amostra foi obtida através da passagem da suspensão várias vezes através da ponteira da pipeta. Incubou-se à temperatura ambiente por 5min. Após, adicionou-se 400µl de clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente por 15seg, e incubados por 15min, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 Xg a 4°C por 15min. Ao final da centrifugação, foi visualizada uma fase inferior vermelha, contendo Trizol® - clorofórmio, uma interface, que consiste de proteínas e restos celulares, e uma fase aquosa superior incolor, na qual está presente o RNA. A fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa foi transferida para outro tubo. Adicionou-se 1ml de álcool isopropílico para precipitação do RNA, sendo realizada incubação durante 10min, à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 20.000Xg por 10min a 4°C, havendo a formação de um precipitado semelhante a um gel incolor nas paredes e fundo do tubo, que trata-se do RNA precipitado. O sobrenadante foi removido e ao sedimento foi adicionado 1mL de etanol (Merck) 75% gelado. Nesta etapa o RNA precipitado foi estocado em etanol 75%, a -20°C. Alternativamente o RNA foi preparado para análise da seguinte forma: Com auxílio de um homogeneizador tipo vortex, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 16.250Xg por 5min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o RNA seco ao ar. Após secagem, o RNA foi dissolvido em cada tudo pela adição de 50µL de água tratada com dietilpirocarbonato® (GibcoBRL), homogeneizado em vortex e mantido a -20°C até utilização.

3.6- Ensaios de RT-PCR para o vírus HAV

Para padronização da técnica de RT-PCR, foi utilizado RNA purificado do fluido infeccioso do vírus da HAV obtido de acordo com os métodos de extração descritos nos itens 3.5.1 e 3.5.2.

No desenvolvimento deste trabalho de padronização de uma metodologia de RT-PCR para detecção do HAV em ostras experimentalmente inoculadas, foram sendo introduzidas modificações nos protocolos iniciais para melhorar a sensibilidade e positividade da detecção por RT-PCR, nos controles virais. Cada alteração realizada no protocolo de RT-PCR inicial (protocolo A, item 3.6.1.1), é apresentada nos materiais e métodos como um novo protocolo, até chegar-se aos protocolos C e D (item 3.6.1.3), cujas reações de PCR foram realizadas com os reagentes Super Mix (Gibco) e Platinum Super Mix (Gibco) respectivamente.

A manipulação de reagentes durante todos os procedimentos foi realizada com luvas. O preparo das reações foi realizado em ambientes físicos adequados e separados, reservados para as reações de PCR, livre de contaminantes como RNAses e outros materiais biológicos que possam causar alguma interferência nas análises. Em uma sala adequada os reagentes foram preparados, manipulados e pipetados. A adição de RNA, ou cDNA, ocorreu em um segundo ambiente físico e a análise dos produtos das reações de PCR foi processada num terceiro ambiente distinto dos demais. Foram utilizados materiais novos e autoclavados, ponteiras com barreira novas e estéreis. Em todas as análises foram realizados também controles negativos e controles positivos das reações. Os reagentes destinados às reações de RT-PCR foram estocados a -20°C e durante o procedimento foram mantidos permanentemente em gelo.

As reações de RT-PCR envolvem o uso de iniciadores, e para a padronização desta técnica para detecção do vírus da hepatite A foram utilizados dois pares diferentes de iniciadores específicos.

O primeiro par de iniciadores testado, HAV-CR e HAV-CL, foi específico para amplificação de uma região do gene codificador da proteína de capsídeo externo VP1 do vírus HAV. As sequências dos iniciadores utilizados encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação gênica do HAV, HM 175, através da reação de PCR pelos protocolos de amplificação A e B, itens 3.7.1.1 e 3.7.1.2

Iniciador	Sequência (5'- 3')
HAV-CR	CTCCAGAATCATCTCC
HAV-CL	ACAGGTATACAAAGTCAG

O programa de temperaturas e ciclos com estes iniciadores envolve 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1min e 50s, anelamento a 50°C por 1min e 50s e extensão a 72°C por 1min e 50s, seguidos de um passo final a 72°C por 5 min.

O peso molecular do produto de PCR de hepatite A gerado pelos iniciadores HAV-CR e HAV-CL foi de 207 pares de bases.

Na segunda etapa do trabalho, em que já estava definido o método de extração de RNA a ser utilizado, outro par de iniciadores foi testado através do protocolo de amplificação C (item 3.6.1.3). Estes iniciadores foram adquiridos e adotados com o propósito de posteriormente, testar a utilização de um método multiplex para amplificação simultânea de HAV, Rotavírus (RV) e Poliovírus (PV), pois neste caso, o segundo par de iniciadores para HAV, pode ser utilizado com o mesmo programa de amplificação de temperaturas e ciclos requerido pelos iniciadores específicos para RV e PV (TSAI et al., 1994).

O segundo par de iniciadores para HAV, HAV-R e HAV-L (tabela 6), foi específico para amplificação da região genômica correspondente à interface dos genes codificadores das proteínas de capsídeo VP1 e VP3, amplificando uma sequência molde de 192 pares de base (SCHWAB et al., 1991, 1995; TSAI et al., 1994; CHUNG et al., 1996).

Para estes iniciadores foram realizados ensaios a fim de definir a concentração ideal a ser utilizada nas reações de PCR, pelo protocolo de amplificação C (Super Mix, item 3.6.1.3)

Tabela 6: Sequência de iniciadores específicos utilizados para a amplificação gênica do HAV, HM 175, através da reação de PCR pelo protocolo de amplificação C, item 3.7.1.3

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

O programa de temperaturas e ciclos com estes iniciadores requer um passo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C, 1min; 55°C, 1min; 72°C, 1min; e finalmente um passo de extensão: 72°C por 7min.

3.6.1- Protocolos de amplificação para o vírus HAV

3.6.1.1- Protocolo A: RT-PCR tradicional

Este ensaio foi realizado com RNA de HAV isolado de fluido viral pelo método tradicional de extração fenol-clorofórmio, descrito no item 3.5.1.

A mistura de reação para síntese do DNA complementar (cDNA) (tabela 7), foi preparada em sala adequada, conforme instruções do fabricante com algumas modificações, em tubos para PCR estéreis, adicionou-se tampão de reação (Promega) para concentração final 1X contendo Tris-Cl 50mM, pH 8,4, KCl₂ 50mM e 5,0mM de MgCl₂, 5,0mM de DDT, 0,5mM de espermidina e acrescentou-se também 0,5mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado ATP, TTP, CTP, GTP; 10U de inibidor de RNAses (Gibco), 100 pmoles de iniciador HAV-CR e 20U de AMV-RT (Promega). Todos os reagentes foram diluídos em água livre de RNAses (Gibco) e calculados para conter as concentrações acima no volume final de reação após adição do RNA.

Em outra sala, as amostras de 5,0µl RNA viral foram adicionadas aos tubos de PCR e desnaturadas a 99°C por 5min, no Termociclador (Minicycler™, PTC-150-16&-25, MJ RESEARCH). Os tubos foram transferidos rapidamente para o gelo por 2min e centrifugados brevemente para coletar a amostra no fundo do tubo, e 25µl da mistura de reação descrita acima foi adicionada a cada tubo. A transcrição reversa do RNA viral foi realizada a 42°C por 90min, na qual o segmento de RNA foi transcrito a sequência de DNA complementar.

Tabela 7: Composição da mistura de reação para síntese do cDNA

Reagente componente	Concentração final no tubo de reação
Tampão de reação 5X concentrado	1X
dNTP 10mM (mistura contendo dATP, dCTP, dGTP e dTTP em quantidades equimolares)	0,5 mM
Inibidor de RNases	10U
HAV-CR 33,8 pmoles/ μ L	100 pmoles
Enzima Transcriptase Reversa	20U

Em todos os ensaios foram realizados controles negativos, que não contém RNA, o qual foi substituído por 5 μ l de água e controle positivo de RNA viral purificado, além das amostras ou diluições de RNA a serem testadas.

Para realizar a reação de PCR, a mistura de reagentes (tabela 8) foi previamente preparada em tubos estéreis, em ambiente adequado, contendo as seguintes concentrações finais: Tampão de reação de PCR na concentração final 1X, contendo Tris-HCL 10mM pH 8,0, KCl 50mM. Acrescentou-se 1,5mM de MgCl₂ (Sigma), 0,4mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado ATP, TTP, CTP, GTP; 4% de DMSO, 100 pmoles de cada um dos iniciadores HAV-CR e HAV-CL e 10U de enzima Taq Polimerase (Cenbiot). Todos os reagentes foram diluídos em água livre de RNases (Gibco) e adicionados para conter a concentração final acima após a adição do material genético.

O volume de 45 μ l desta mistura foi distribuído em tubos de PCR. Foram acrescentados 3 μ l do cDNA produzido na reação anterior. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas. Em seguida, o material foi aquecido à 99°C, por 5min no Termociclador Minicycler™, as amostras foram cobertas com 20 μ l óleo mineral, e a reação de amplificação foi realizada de acordo com o seguinte programa: de temperaturas e ciclos: 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1min e 50s, anelamento a 50°C por 1min e 50s e extensão a 72°C por 1min e 50s, seguidos de um passo final de extensão a 72°C por 5 min.

Tabela 8: Composição da mistura de reação de PCR

Reagente componente	Concentração final
Tampão de Taq polimerase 10X concentrado	1X
MgCl ₂ 25mM	1,5mM
dNTP 10mM	0.4mM
HAV-CR (33,8 pmol/μL)	100 pmoles
HAV-CL (48,1 pmol/ μL)	100 pmoles
DMSO 100%	4%
Enzima Taq Polimerase	10U

3.6.1.2- Protocolo B: RT-PCR realizado com reagente PCR Super Mix®

Neste ensaio foi utilizado RNA isolado de fluido viral pelo método Trizol®, item 3.5.2 e a reação de transcrição reversa para produzir cDNA foi realizada conforme descrito no item anterior, no entanto utilizando a enzima transcriptase reversa RT-MLV da Gibco e a reação foi realizada a 37°C por 90min.

A reação de PCR foi testada com uma mistura comercial de reação "PCR Super Mix®" (Gibco BRL), conforme as especificações do fabricante, apenas com variação na concentração de MgCl₂.

Para síntese do DNA complementar (cDNA), a mistura de reação foi preparada em sala adequada, em tubos para PCR novos e estéreis, adicionando-se tampão de reação (Gibco) para concentração final 1X contendo Tris-Cl 50mM, pH 8,4, KCl₂ 75mM e 3,0mM de MgCl₂, acrescentou-se também 0,5mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado ATP, TTP, CTP, GTP; 10mM de DDT, 10U de inibidor de RNases (Gibco), 100 pmoles de iniciador HAV-CR e 40U de MLV-RT (Gibco). Todos os reagentes foram diluídos em água livre de RNases (Gibco) e calculados para conter as concentrações acima no volume final de reação após adição do RNA.

Em outra sala, as amostras de 5,0μl RNA viral foram adicionadas a tubos de PCR e desnaturadas a 99°C por 5min, no Termociclador (Minicycler™, PTC-150-16&-25, MJ RESEARCH). Os tubos foram transferidos rapidamente para o gelo por 2min e

centrifugados para coletar a amostra no fundo do tubo, e 25 μ l da mistura de reação descrita acima foi adicionada a cada tubo. A transcrição reversa do RNA viral para DNA complementar foi realizada a 37°C por 90min.

Para reação de PCR este protocolo difere do tradicional por excluir a preparação da mistura de reagentes para a reação da Taq Polimerase, que já encontra-se pronta com o uso da "PCR Super Mix[®]", sendo necessário somente a adição dos iniciadores, de MgCl₂ para acertar a concentração ideal deste reagente e do material genético. A mistura PCR Super Mix[®] é constituída por: Tris-HCl 22mM, pH8,4; KCl 55mM; MgCl₂ 1,65mM; deoxinucleotídeos trifosfatados 220 μ M cada e 22U/mL de Taq DNA Polimerase recombinante. Para reação de amplificação, foram acrescentados 3 μ l do cDNA obtido na reação anterior à 45 μ l de mistura de reação Super Mix[®] (Gibco-BRL), cuja concentração de MgCl₂ foi acertada com solução de MgCl₂ 25mM e adicionou-se 100 pmoles de cada um dos iniciadores HAV-CR e HAV-CL. As amostras foram cobertas com 20 μ l de óleo mineral e desnaturadas por 2min a 95°C, em seguida a reação de amplificação foi iniciada utilizando o mesmo programa de temperaturas e ciclos descrito no item anterior.

3.6.1.3- Protocolos C e D: RT-PCR realizado com reagente PCR Super Mix[®] (C) ou Platinum Super Mix[®] (D), utilizando iniciadores HAV-R e HAV-L:

Estes protocolos diferem do anterior, pois foram utilizados outros iniciadores específicos para HAV, HAV-R e HAV-L (tabela 6), descritos no item 3.6.

A reação para síntese de cDNA foi preparada conforme descrito no item anterior, substituindo o iniciador HAV-CR (Graff et al., 1993), por 40pmoles do iniciador HAV-R (SCHWAB et al., 1995).

O reagente Platinum Super Mix[®] (Gibco-BRL), possui a mesma composição mistura de reação Super Mix[®], porém a enzima taq polimerase possui um anticorpo ligado ao seu sítio de reação.

Para reação de amplificação, foram acrescentados 3 μ l do cDNA à 45 μ l de mistura de reação Super Mix[®] ou Platinum Super Mix[®] (Gibco-BRL), cuja concentração de MgCl₂ foi acertada para 2,5mM com solução de MgCl₂ 25mM e adicionou-se 40pmoles de cada um dos iniciadores HAV-R e HAV-L. As amostras foram cobertas com 20 μ l de óleo mineral e desnaturadas por 2min a 95°C no termociclador (Minicycler[™], PTC-150-16&-25, MJ RESEARCH) em seguida foram amplificadas pelo seguinte programa de ciclos e

temperaturas de PCR: desnaturação: 40 ciclos: 95°C, 1min; 55°C, 1min; 72°C, 1min; seguido do passo de extensão final de 72°C por 7min.

3.6.2- Curva de MgCl₂

Com o objetivo de definir a concentração ideal de MgCl₂ para as reações de PCR, foram utilizados 5µL do RNA viral por amostra, correspondendo a 500 pfu de HAV, sendo que estas amostras foram testadas com diferentes concentrações de MgCl₂.

Neste ensaio, as amostras de RNA foram obtidas através de duas técnicas diferentes de extração, e as reações de RT-PCR realizadas com os dois protocolos tradicional (Protocolo A, item 3.6.1.1) e Super Mix[®] (Protocolo B, item 3.6.1.2), visando dessa forma, avaliar também a efetividade dos métodos de purificação de RNA viral e amplificação gênica.

A reação de transcrição reversa foi realizada com a concentração de 3,0mM de MgCl₂ e quatro diferentes concentrações de MgCl₂ foram testadas durante a reação de PCR: 1,5mM; 2,0mM; 2,5mM; 3,0mM. Para o protocolo A foi testada também a concentração de 1,0mM de MgCl₂.

Após o primeiro PCR, 3µL do produto desta primeira reação foram utilizados para a realização de um segundo PCR, que utiliza o mesmo protocolo e os mesmos iniciadores. O segundo PCR tem como objetivo aumentar ainda mais a amplificação do DNA, possibilitando maior sensibilidade na detecção.

3.6.3- Curva de iniciadores HAV-R e HAV-L: Definição da concentração ideal de iniciadores do RT-PCR, utilizando PCR Super Mix[®], para RNA de HAV extraído com Trizol[®] (Protocolo C, item 3.6.1.3)

Com o objetivo de definir a concentração ideal destes iniciadores para a reação de PCR, foram utilizados 5µL do RNA viral por amostra, correspondendo a 500pfu HAV, sendo estas testadas com 6 diferentes concentrações de iniciadores: 100, 75, 50, 40, 30 e 20pmoles. Em cada amostra, a concentração do iniciador HAV-R utilizada na reação de transcrição reversa foi a mesma concentração testada na reação de amplificação para ambos os iniciadores.

Neste ensaio, as amostras de RNA foram obtidas através da técnica de extração que utiliza Trizol[®], e as reações de RT-PCR foram realizadas com o protocolo C Super Mix[®], utilizando a concentração de MgCl₂ definida no ensaio anterior.

3.6.4- Sensibilidade de detecção do RNA purificado

Os quatro protocolos de RT-PCR A, B, C e D (itens 3.6.1.1, 3.6.1.2, 3.6.1.3 respectivamente) foram testados quanto ao limite de sensibilidade da detecção.

Para isto, foram utilizadas diluições seriadas do RNA purificado (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000, 1:1500, 1:2000). O limite de sensibilidade foi definido em pfu de HAV, já que o título viral é conhecido (tabela 9).

Tabela 9: Diluições do RNA de HAV isolado de fluido e seus respectivos títulos de HAV em pfu em 5µl de amostra

RNA viral	Título de HAV/ 5µl (pfu)
RNA puro	5×10^3
1:2	$2,5 \times 10^3$
1:4	$1,25 \times 10^3$
1:8	$6,25 \times 10^2$
1:16	$3,12 \times 10^2$
1:32	7156
1:64	78
1:128	39
1:256	19,5
1:500	9,7
1:750	6,7
1:1.000	5
1:1.500	3,5
1:2.000	2,5

3.7- Protocolo de Amplificação para Poliovírus (PV): RT-PCR específico

As mesmas condições para as reações de transcrição reversa e PCR padronizadas para o RNA de HAV no item 3.6.1.2, foram aplicadas para amplificação do RNA de PV isolado de fluido viral pelo método Trizol[®]. Na reação de transcrição reversa foram utilizados 5µl de RNA de PV (5x10⁵ pfu) e 50pgramas de iniciadores randômicos, substituindo o iniciador específico para o HAV.

Na reação de PCR, foi utilizado 45µl do reagente PCR Super Mix[®]. A concentração de MgCl₂ foi acertada para 2,5mM com solução de MgCl₂ 25mM e adicionou-se 100pmoles de cada um dos iniciadores Polio-R e Polio-L (tabela10), específicos para a região genômica 5' não-codificadora (ATMAR et al, 1993). O peso molecular do produto de amplificação com estes iniciadores foi de 394 pares de base.

Tabela 10: Sequência dos iniciadores específicos para amplificação de PV

Iniciador	Sequência (5' - 3')
Polio-R	ACGGACACCCAAAGTA
Polio-L	AGCACTTCTGTTTCCC

À mistura de PCR, foram acrescentados 3,0µl do cDNA produzido na reação de transcrição reversa do RNA de PV. O restante do ensaio seguiu conforme descrito no item 3.6.1.2, utilizando o mesmo programa de ciclos e temperaturas descritos no item 3.6.1.3 para iniciadores HAV-R e HAV-L.

Programa de PCR: desnaturação: 95°C, 2 minutos, 40 ciclos: 95°C, 1min; 55°C, 1min; 72°C, 1min; seguido do passo de extensão: 72°C por 7min.

3.8- Protocolo de Amplificação para Rotavírus (RV): RT-PCR específico

As mesmas condições para as reações de transcrição reversa e PCR padronizadas para o RNA de HAV no item 3.6.1.2, foram aplicadas também para amplificação do RNA de RV isolado de fluido viral pelo método Trizol[®]. Sendo que na

reação de transcrição reversa foram utilizados 5µl de RNA de RV (15×10^5 FFU) e 50pgramas de iniciadores randômicos, e 100pmoles do iniciador END9.

Na reação de PCR, foi utilizado 45µl do reagente PCR Super Mix[®], e a concentração de MgCl₂ foi acertada para 2,5mM com solução de MgCl₂ 25mM e adicionou-se 100 pmoles de cada um dos iniciadores END9 e Rota785 (tabela 11), específicos para a região genômica codificadora da glicoproteína VP7 (GOUVEA, 1990). O peso molecular do produto de amplificação para estes iniciadores é de 278 pares de base.

Tabela 11: Sequência de iniciadores específicos para amplificação de RV

Iniciador	Sequência (5' - 3')
End 9	GGTCACATCATAAATTCTAATCTAAG
Rota 785	TTCGAAATTGTAAGAAATTAG

À mistura de PCR, acrescentou-se 3,0µl do cDNA produzido na transcrição reversa do RNA de RV. O restante do ensaio seguiu conforme descrito no item 3.6.1.2., utilizando o programa de ciclos e temperaturas descritos no item 3.6.1.3.

3.9- Protocolos Triplex para amplificação simultânea de HAV, RV e PV

Foram testados dois diferentes protocolos triplex para amplificação simultânea de HAV, PV e RV, que foram comparados com os protocolos específicos para amplificação individual de cada vírus (itens 3.6.1.3; 3.7 e 3.8 respectivamente).

Neste ensaio, os iniciadores utilizados para HAV, PV e RV são os mesmos descritos nos protocolos específicos citados acima, assim como o programa de temperaturas e ciclos é o mesmo para os três vírus utilizando estes iniciadores.

Os RNAs virais utilizados para estes ensaios foram obtidos pelo método de extração com Trizol[®], e a concentração de MgCl₂ utilizada foi 2,5mM, a mesma definida como ideal para amplificação de HAV no item 3.6.2. Utilizou-se nestes ensaios o reagente Super Mix[®] (Gibco-BRL).

Esquemáticamente foi realizada a comparação entre as três metodologias que seguem, utilizando as reações de amplificação indicadas na tabela 12:

- cDNA específico (RNAs de cada vírus separadamente): PCR específico
- cDNA Triplex (“pool” dos três RNAs virais): PCR Triplex (“pool” de iniciadores para HAV, RV, PV), item 3.9.1.
- cDNA Triplex (“pool” dos três RNAs virais): PCR específico para cada vírus, item 3.9.2.

Tabela 12: Esquema básico das reações de RT-PCR pelos métodos triplex e específico e respectivos produtos de amplificação gênica, para os vírus HAV, RV e PV.

<i>RT-PCR</i>	<i>TRIPLEX</i>	<i>HAV</i>	<i>ROTAVÍRUS</i>	<i>POLIOMÍRUS</i>
CDNA	Iniciadores randômicos + END 9	Iniciador HAV-R	Iniciadores randômicos + END 9	Iniciadores randômicos
PCR	3 pares de iniciadores específicos HAV + RV +PV	HAV-R + HAV-L	Rota 785 + END9	Polio-R + Polio-L
PRODUTO	192 pb+278 pb+394 pb	192 pb	278 pb	394 pb

3.9.1- Protocolo triplex número 1: cDNA Triplex (“pool” dos três RNAs virais): PCR Triplex (“pool” de iniciadores para HAV, RV, PV)

No primeiro protocolo triplex, foi realizada a reação de transcrição reversa utilizando um pool dos três RNAs virais num único tubo de reação, e adicionando-se iniciadores randômicos e o iniciador END9, específico para RV. A reação de PCR foi conduzida também num único tubo de reação utilizando o cDNA obtido na reação anterior e um “pool” dos 3 pares de iniciadores específicos para HAV, PV e RV.

RT-PCR Triplex: Reação de transcrição reversa: O "pool" de alíquotas de 3.0µl de cada RNA foi desnaturado a 99°C por 5min e adicionado à mistura de reação contendo 50 pgramas de iniciadores randômicos (Gibco) e 100 pmoles de END9, Tris-Cl 50mM, pH 8.4, KCl₂ 75mM, MgCl₂ 3.0mM, 0.5mM de cada nucleotídeo ATP, TTP, CTP, GTP; DDT 10mM e 40U de RT-MLV (Gibco-BRL). A transcrição reversa do RNA viral foi realizada a 37°C por 90min. O cDNA (3µl) obtido nesta reação, foi acrescentado à 45µl de mistura de reação Super Mix[®] (Gibco-BRL). A concentração de MgCl₂ foi acertada para 2,5mM com solução de MgCl₂ 25mM e adicionou-se 100 pmoles de cada um dos iniciadores para HAV, RV e PV. Protocolo de PCR: desnaturaçãõ: 95°C, 2 minutos, 40 ciclos: 95°C, 1min; 55°C, 1min; 72°C, 1min; seguido do passo de extensão: 72°C por 7min.

3.9.2- Protocolo triplex 2: cDNA Triplex ("pool" dos três RNAs virais):

PCR específico para cada vírus

No segundo protocolo triplex testado, o cDNA foi obtido da mesma forma que no ensaio anterior, porém para reação de amplificação foram preparados três tubos distintos de reação, cada um contendo os iniciadores específicos para cada vírus separadamente. A reação de PCR seguiu conforme descrito nos itens 3.6.1.3, 3.7 e 3.8 para os PCRs específicos para HAV, PV e RV respectivamente.

3.10- Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação das reações de RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (preparado em tampão TBE), concentração adequada para visualização dos produtos de amplificação esperados, conforme tabela 13, ou eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10% (tabela 14) (SAMBROOK et al., 1989). Para visualização, os géis foram corados por brometo de etídeo e em seguida fotografados para documentação sob luz ultra-violeta.

Tabela 13: Concentração ideal de agarose no gel de acordo com o peso molecular dos fragmentos de DNA.

Concentração de agarose no gel (%)	Faixa de tamanho da molécula de DNA separada (Kb)
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Fonte: SAMBROOK et al., 1989

Uma alíquota de 10 μ l de cada amostra amplificada foi misturada a 2 μ l do tampão de aplicação 6X (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30% p/v em água Milli-Q) e aplicadas no gel, sendo submetidas à eletroforese à voltagem constante de 100V em tampão de corrida Tris-Borato-EDTA 1X (TBE, Tris-HCl 0,09M, ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M).

Em cada gel, para cada conjunto de amostras, foi aplicado 10 μ l de um marcador de peso molecular, correspondendo ao 100pb DNA ladder (GibcoBRL) ou 123pb DNA ladder (Sigma) na concentração de 300ng/10 μ l, a fim de definir o peso molecular dos fragmentos amplificados.

Após a corrida eletroforética os géis foram corados com Brometo de Etídeo (Sigma) a 1 μ g/ml e os produtos de amplificação foram visualizados através da exposição à luz ultravioleta, no transiluminador Pharmacia Biotech® e fotografados para documentação com câmera polaróide ou pelo sistema digital de fotodocumentação Kodak.

Tabela 14: Composição do gel para eletroforese tipo PAGE

Componente	Concentração final
Acrilamida (Sigma)	10%
Bis-acrilamida (Sigma)	0,26%
TBE 5X (Sigma)	1X
Persulfato de amônio (APS, Sigma)	1%
N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamino (Temed, Sigma)	0,03%

Adaptado de SAMBROOK et al. (1989)

3.11- Coleta das ostras

Para a etapa de padronização da metodologia, as ostras da espécie *Crassostrea gigas* foram adquiridas diretamente com os produtores da grande Florianópolis, no município de Palhoça, no continente, Praia do Sonho, ao sul, distante 50 Km de Florianópolis. Este local foi escolhido por possuir água de qualidade bacteriológica satisfatória, segundo a Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente (FATMA). As ostras foram trazidas ao laboratório em sacos plásticos, à temperatura ambiente.

As conchas foram cuidadosamente limpas com o auxílio de uma escova e a seguir foram desinfetadas externamente com solução de álcool iodado a 10% por 10 min e secas ao ar durante 30 min. As valvas foram então abertas com auxílio de uma faca especial, desinfetada através de uma solução aquosa de hipoclorito de sódio a 10%. A carne das ostras foi retirada e estocada em tubos Falcon® 50ml no freezer -80°C até o processamento.

3.12- Preparação dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com fluido viral

3.12.1- Inoculação artificial de ostras com fluido infeccioso de HAV, RV e PV

Com a finalidade de padronizar um método sensível para detecção do HAV em amostras ambientais, foi realizada a inoculação artificial de ostras com fluido viral.

Após a padronização das metodologias para detecção de HAV por RT-PCR ter sido concluída, estas foram aplicadas para detecção de RV e PV, sendo que a inoculação artificial de ostras e extratos controles foram preparados para cada vírus individualmente seguindo a mesma metodologia utilizada para HAV.

Cada duas ostras (10 a 20g de tecido vivo de cada animal) foram preparadas como uma única amostra. Em cada experimento realizado as amostras foram individualmente inoculadas com 600 μ l de fluido viral, correspondendo a 6×10^4 pfu de HAV na região gastrointestinal dos animais, com o auxílio de ponteiras de micropipetas escolhendo-se 3 ou 4 sítios distintos de inoculação como descrito por CROMEANS et al, 1997 e BARARDI et al, 1999. Depois da adsorção viral por 30 minutos à temperatura ambiente, as ostras semeadas foram processadas para preparação de um extrato tissular que foi designado de **Extrato O.S.**

Nos experimentos realizados com rotavírus (RV) e poliovírus (PV), cada amostra foi inoculada individualmente também com 600 μ l de cada fluido viral, correspondendo a $1,8 \times 10^7$ ffu de RV e 6×10^6 pfu de PV respectivamente.

Em todos os ensaios foram preparados extratos tissulares a partir de ostras não inoculadas para servirem de controles negativos do experimento e designados de **Extratos negativos.**

Foram preparados também extratos tissulares de ostras não inoculadas, cujos extratos finais foram inoculados com a mesma quantidade de fluido viral injetado nas ostras do Extrato O.S.. Este extrato, inoculado ao final do processo, serviu de controle positivo dos experimentos, representando 100% de recuperação viral, já que não houve perda do vírus durante o processo e foram designados de **Extratos Controles (E.C.).**

3.12.2- Preparação dos extratos de ostras

A preparação dos extratos de ostras foi realizada conforme BARARDI et al, 1999, com algumas modificações, segundo esquema apresentado na Figura 5. O protocolo de preparação dos extratos de ostras foi realizado com PEG 6000 ou PEG 8000 e comparado quanto à recuperação viral para cada polímero. Os tecidos de duas ostras foram transferidos para uma garrafa estéril SIMAX® contendo 100ml de solução gelada de meio triptose fosfato (TPB) 10% v/v (TPB 100% contém 20g de triptose; 2,0g de glicose; 5,0g de NaCl e 2,5g de Na₂HPO₄ pH 7,3), preparado em tampão glicina 0.05M, pH 9.0 e macerados e homogeneizados com o triturador Ultra Turrax T-25 Ika® a 24000 rpm por 30s. A suspensão resultante foi agitada por 30min a 250rpm a 15°C e centrifugada a 10.000Xg por 30min a 4°C. Após centrifugação, os sedimentos foram descartados e o pH do sobrenadante foi ajustado para 7.5 e foi adicionada uma solução de Polietilenoglicol (PEG 6000 ou PEG 8000) (50% p/v) preparada em TPB 10% à concentração final de 8%. A mistura foi agitada por 16 horas a 4°C e centrifugada a 10.000Xg por 20min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado final foi ressuspensão em 5ml de Na₂HPO₄, 0.15M, pH 9.0. As partículas virais agregadas ao PEG 6000 foram dispersas por ultrassom no aparelho Sonic Dismembrator, Modelo 60 (Fisher Scientific) na velocidade 20 por 1min, sendo realizada duas etapas de 30seg cada, com intervalo de 5seg

Os extratos tiveram o pH ajustado para 7.5 estando prontos para serem utilizados no isolamento do RNA viral para RT-PCR e para ensaios envolvendo cultivo *in vitro* em células Frhk-4. Neste ponto os extratos foram estocados em freezer a -80°C até sua utilização.

Também nesta etapa extratos de ostras não infectadas foram semeados com as mesmas quantidades de vírus utilizadas na contaminação artificial para servirem como controle positivo de 100% de recuperação (Extrato E.C.) tanto nos ensaios de RT-PCR quanto nos ensaios de infecção de células *in vitro*.

Os extratos utilizados na infecção de células *in vitro* foram tratados com solução de penicilina e estreptomicina 150µg/ml cada e 50µg/ml de anfotericina B e então estocados.

Preparação dos extratos de ostras semeadas artificialmente com HAV, RV e PV

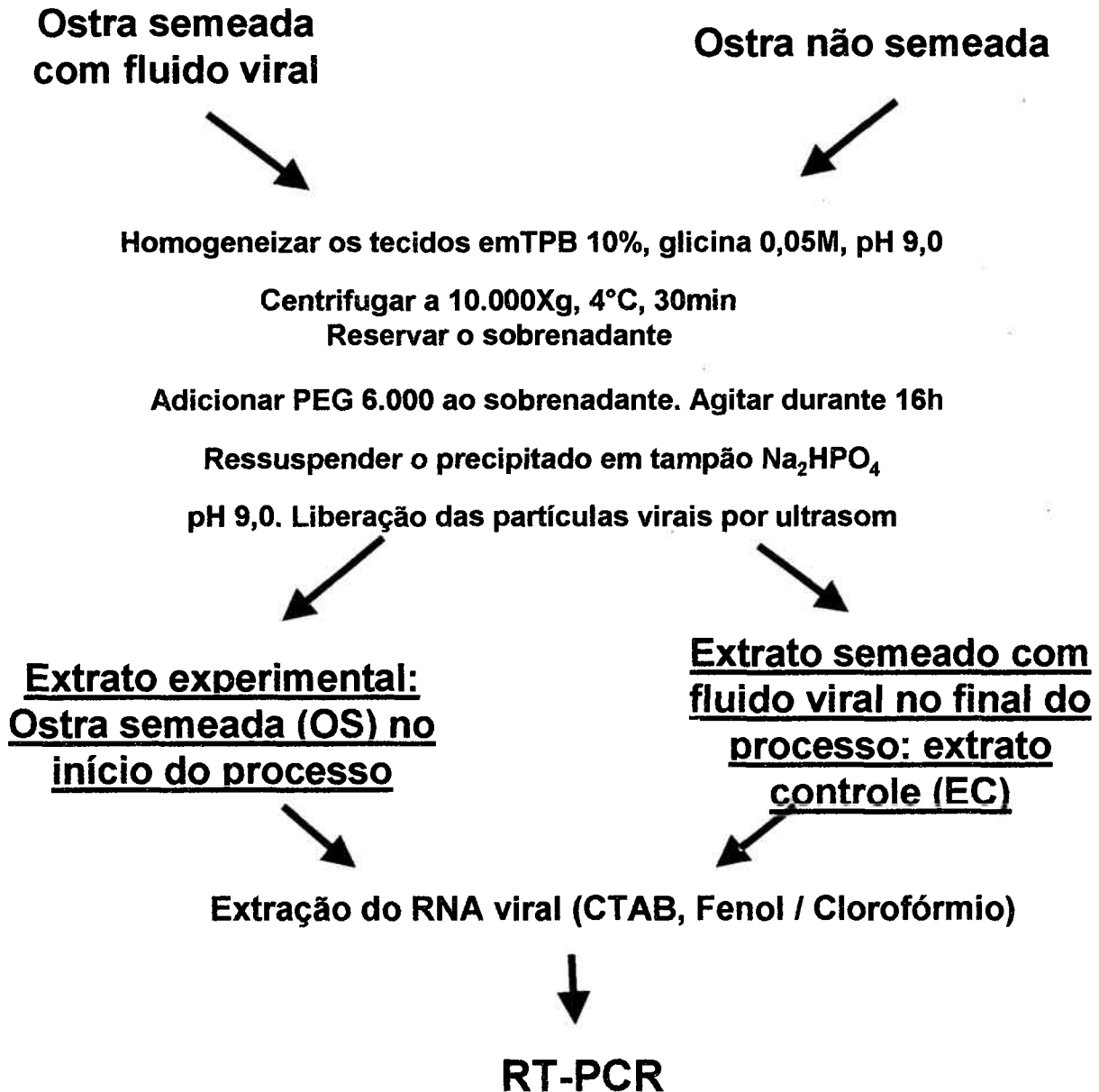


Figura 5: Esquema de preparação de extratos de ostras semeadas com fluido celular de vírus da hepatite A (HAV), rotavírus(RV) ou poliovírus (PV)

3.13- Extração do RNA viral de extratos de ostras

O procedimento de isolamento de RNA a partir dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas com fluido viral foi realizado segundo LEE et al. (1994), ATMAR et al. (1993); BARARDI et al. (1999) com algumas modificações.

O processo foi realizado em duplicata. Duas alíquotas de quinhentos microlitros de cada amostra de extratos de ostras infectados ou não, foram utilizadas para extração do RNA viral. Os extratos foram clarificados com igual volume de Freon 113 (triclorotrifluoroetano, Aldrich), sendo agitados por vortex por 30seg para homogeneização do conteúdo e em seguida centrifugados a 30.000Xg, por 5min a 4°C. A fase aquosa de cada amostra foi transferida para novos tubos, adicionadas de Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA (Sigma) 5mM, SDS 0,5%(p/v) e proteinase K (GibcoBRL) (400 µg/ml), e incubadas a 37°C, durante 30min. Após este período, adicionou-se brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, Sigma) à concentração final de 1,3% (p/v) em presença de NaCl 0,4M (Sigma) e as amostras foram então incubadas a 56°C durante 30min. Após realizou-se o procedimento padrão de extração de ácidos-nucleicos com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol conforme descrito no item 3.5.1 (SAMBROOK et al., 1989). Após precipitação dos ácidos nucleicos em etanol, as amostras de RNA foram incubadas a -20°C durante uma noite ou alternativamente por 30 minutos a -80°C. Nesta etapa as amostras em etanol podem ser estocadas a -80°C por longos períodos ou preparadas para análise, através de centrifugação e dissolução em água.

Para análise, o precipitado final foi dissolvido em 500µl de água Milli-Q livre de RNAses ou água tratada com dietilpirocarbonato (Gibco) e 5,0µl foi utilizado nas reações de RT-PCR.

3.14- Ensaios de RT-PCR para detecção de RNA de HAV extraído dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas

Todas as precauções necessárias à realização das reações de RT-PCR foram consideradas e efetuadas conforme descrito no item 3.6.

O protocolo C de RT-PCR, Super Mix[®] (item 3.6.1.3) foi utilizado para realizar os ensaios de curva de MgCl₂ e curva de iniciadores HAV-R e HAV-L com amostras de RNA extraído conforme item 3.13, de extratos controles (E.C) semeados com HAV, para definir a concentração ideal destes reagentes nos ensaios de RT-PCR. Os protocolos C, Super

Mix[®] e protocolo D, Platinum Super Mix[®] (item 3.6.1.3), foram comparados nos ensaios de limite de sensibilidade da reação de RT-PCR utilizando ambos para diluições de extratos controles (E.C.), e também para diluições de extratos O.S. (ver item 3.12.1 e figura 5).

3.14.1- Curva de MgCl₂: Definição da concentração ideal de MgCl₂ do RT-PCR, para RNA de HAV extraído de extrato controle de ostras (E.C), utilizando Protocolo C, PCR Super Mix[®], item 3.6.1.3

Neste ensaio foi utilizada somente a primeira diluição do RNA de E.C., ou seja 5 μ l do RNA dissolvido em água obtido após procedimento de extração no item 3.13 correspondendo a 50pfu de HAV, não sendo necessário a utilização de outras diluições.

A reação de transcrição reversa foi conduzida contendo a concentração de 3,0mM de MgCl₂ e quatro diferentes concentrações de MgCl₂ foram testadas durante a reação de PCR: 1,5mM; 2,0mM; 2,5mM; 3,0mM, através do protocolo C, PCR Super Mix[®] (descrito no item 3.6.1.3).

3.14.2- Curva de iniciadores HAV-R e HAV-L: Definição da concentração ideal de iniciadores do RT-PCR, para RNA de HAV extraído de extratos controles (E.C.) utilizando Protocolo C, PCR Super Mix[®], item 3.6.1.3

Com o objetivo de definir a concentração ideal destes iniciadores para a reação de PCR para RNA de extratos de ostras, foram utilizados 5 μ L do RNA de E.C. por amostra, correspondendo a 50pfu de HAV, sendo que estas foram testadas com 6 diferentes concentrações de iniciadores: 100, 75, 50, 40, 30 e 20pmoles. Em cada amostra, a concentração do iniciador HAV-R utilizada na reação de transcrição reversa foi a mesma concentração testada na reação de amplificação para ambos os iniciadores.

As reações de RT-PCR foram realizadas conforme o protocolo C Super Mix[®], item 3.6.1.3, utilizando a concentração de MgCl₂ definida no ensaio anterior.

3.14.3- Sensibilidade de detecção do RNA purificado

Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar a sensibilidade do ensaio de amplificação gênica para detecção do HAV a partir de ostras inoculadas experimentalmente (extrato OS), e comparar com a detecção de HAV no extrato controle EC.

Nos ensaios foram utilizados 5µl do RNA extraído dos extratos tissulares de ostras (item 3.12.2) e suas diluições, sendo testados: RNA dissolvido obtido no item 3.13 e diluições ½, ¼, 1/8; 1/10; 1/15; 1/20, correspondendo a 50; 25; 12,5; 6,25; 5,0; 3,3; e 2,5 pfu de HAV (tabela 15).

Para realização dos limites de sensibilidade foram utilizados os dois protocolos C e D, item 3.6.1.3. Foram realizados controles positivos com 5,0µl (500pfu) de RNA purificado obtido no item 3.5.2, e controles negativos de amostra realizados com RNA obtido da extração de extratos negativos de ostras e controle negativo de reagentes realizado com 5,0µl de água substituindo o RNA.

Tabela 15: Diluições do RNA de HAV obtido a partir do extrato tissular de ostras experimentalmente inoculadas e título viral equivalente (pfu)

Diluições do RNA viral	Título HAV/ 5µl (pfu)
RNA puro	50
1:2	25
1:4	12,5
1:8	6,25
1:10	5,0
1:15	3,3
1:20	2,5

3.14.3.1- Limite de sensibilidade para RNA obtido de Extratos Controles (E.C.)

Neste ensaio o RNA foi obtido através do procedimento de extração descrito no item 3.13 a partir do extrato controle E.C. semeado no final do procedimento de preparação do extrato com 600µl de fluido viral, correspondente a 6×10^4 pfu de HAV. Este extrato corresponde a um controle de 100% de recuperação viral.

As reações de transcrição reversa e PCR foram realizadas de acordo com o protocolo C, item 3.6.1.3, sendo que os cDNAs obtidos foram também amplificados pelo protocolo D, Platinum Super Mix[®], item 3.6.1.3.

3.14.3.2- Limite de sensibilidade para RNA obtido de extratos de ostras semeadas (O.S.)

Este ensaio difere do anterior por utilizar RNA isolado de extrato de ostras experimentalmente inoculadas antes do procedimento de preparação do extrato (item 3.12.1), sendo que foi utilizada a mesma quantidade de vírus. Pretendeu-se com estes ensaios avaliar a perda viral durante o procedimento de preparação dos extratos e definir o limite de sensibilidade da reação de RT-PCR para detecção viral.

3.15- Ensaio de RT-PCR para detecção de RNA de Poliovírus (PV) extraído dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas

Amostras de RNA obtidas a partir de extratos de ostras semeadas experimentalmente (O.S.) com 6×10^6 pfu de PV (item 3.12), extraídas segundo protocolo 3.13, foram amplificadas sob as condições descritas no item 3.7 para as reações de transcrição reversa e PCR. Na reação de transcrição reversa foram utilizados $5\mu\text{l}$ de RNA, correspondendo a 3×10^3 pfu de PV, considerando que o volume final do extrato foi 10ml. Foi utilizada a concentração de 3,0mM de MgCl_2 na reação de PCR.

3.16- Ensaio de RT-PCR para detecção de RNA de Rotavírus (RV) extraído dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas

As amostras de RNA foram obtidas a partir de extratos de ostras experimentalmente inoculadas com $1,8 \times 10^7$ ffu de RV (item 3.12) e extraídas segundo o protocolo descrito no item 3.13.

Para amplificação gênica foi utilizado o protocolo descrito no item 3.8 e utilizou-se $5,0\mu\text{l}$ do RNA, correspondendo a 9×10^3 ffu de RV, considerando que o volume final de extrato semeado foi 10ml. A concentração de 3,0mM de MgCl_2 foi utilizada na reação de PCR.

3.17- Ensaios de RT- PCR Triplex para amplificação simultânea de RNAs de HAV, RV e PV obtidos a partir extratos de ostras experimentalmente semeadas

Nestes ensaios foram utilizados os protocolos descritos nos itens 3.9.1 e 3.9.2. As amostras de RNA utilizadas foram obtidas conforme o protocolo descrito no item 3.13,

realizado para extratos de ostras inoculadas O.S. e extratos controles E.C. (item 3.12). Foram realizados também controles negativos de amplificação. Para as reações de RT-PCR foi utilizada a concentração de 3,0mM de MgCl₂. Os protocolos triplex foram comparados com os protocolos específicos para detecção individual de HAV, PV e RV (itens 3.6.1.3; 3.7 e 3.8 respectivamente) em RNAs obtidos de extratos de ostras.

3.18- Estudos de citotoxicidade e citopatogenicidade dos extratos de ostras em células Frhk-4

Foram realizados ensaios de citotoxicidade e efeito citopático nas células *in vitro* com extratos negativos de ostras sadias e com extratos de ostras infectadas com HAV (item 3.12).

As células Frhk-4 foram cultivadas durante 48h em placas de 24 poços até atingirem confluência ($\sim 1,0 \times 10^6$ células/ml) sob atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Os extratos negativos de ostras foram então diluídos seriadamente desde 1:2 até 1:1000 pelo fator de diluição 2, em meio de infecção de células. Cada um dos poços contendo a monocamada celular foi lavado 2x com 1ml de PBS estéril, pH 7,2 e inoculado com 500µl de cada diluição do extrato, e também com extrato negativo não diluído (puro). As placas foram incubadas durante 1h30min a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5% e após este período retirou-se o extrato por aspiração e as células foram suplementadas com 1ml de meio de infecção. As placas foram mantidas sob as mesmas condições de atmosfera e temperatura já descritas e as monocamadas celulares foram observadas diariamente durante 7 dias, com o objetivo de identificar alterações morfológicas celulares. As observações foram comparadas com um controle negativo contendo apenas células e meio de infecção o qual não foi inoculado com extrato. Observou-se a diluição limite que provocou citotoxicidade em 72 hs até o fim do experimento. Foram realizadas sete repetições deste experimento.

Para avaliação da citopatogenicidade dos extratos de ostras infectadas com HAV, as células Frhk-4 foram cultivadas durante 48h em placas de 24 poços sob as condições de temperatura e atmosfera de CO₂ descritas anteriormente.

Extratos de ostras negativos foram diluídos em meio de infecção a partir da diluição não citotóxica 1:32 encontrada no ensaio anterior em 72h até 1:1000 e 500µl foram inoculados em placas de 24 poços (toxicidade x efeito citopático), o mesmo procedimento foi realizado para o extrato de ostras sementeadas com HAV no início do

processo (O.S.) (a partir do ensaio de inoculação artificial, item 3.12.1) e o extrato controle (E.C.) semeado com HAV no final do processo. A tabela 16 indica os títulos virais nas respectivas diluições de extratos. Após 90min de incubação para adsorção, os inóculos foram retirados por aspiração a vácuo e as células foram suplementadas com 1ml de meio de infecção.

Na mesma placa foi realizado controle negativo do experimento, contendo somente células e meio de infecção. O controle positivo foi realizado através de inoculação de fluido infeccioso viral de HAV diluído nas mesmas proporções que os extratos, em meio de infecção, contendo o mesmo título equivalente de vírus em pfu para as diluições dos extratos.

As células foram incubadas sob atmosfera de 5% CO₂ a 37°C e observadas diariamente durante 10 dias após a infecção. Observou-se o efeito citotóxico do extrato negativo diariamente e comparou-se com os extratos positivos e com os controles negativos de células e controles positivos de fluido viral.

Tabela 16: Diluições dos extratos de ostras inoculados com HAV e respectivos títulos de vírus em pfu de HAV

500µl de diluição do extrato	Título do HAV/ 500µl (pfu)
puro	3 x 10 ⁹
1:32	96,7
1:64	48,38
1:128	24
1:256	12
1:512	6
1:1000	3

3.19- Análise de ostras coletadas como amostras de campo no período de outubro de 1998 a outubro de 1999 em Florianópolis

Após finalizada a etapa de padronização das metodologias para detecção viral em ostras por RT-PCR, as metodologias para detecção de HAV foram aplicadas para análise de ostras coletadas em quatro sítios de cultivo de moluscos da grande Florianópolis.

As amostras foram coletadas em quatro locais de cultivo da grande Florianópolis, dois locais no continente e dois na Ilha de Santa Catarina. A cada mês, durante um ano de outubro de 1998 a outubro de 1999, foram coletadas doze ostras de cada um destes locais (tabela 17). As ostras foram coletadas e preparadas conforme descrito no item 3.11 e estocadas até análise em freezer -80°C .

Durante as análises, cada duas ostras foram processadas como uma única amostra. Os protocolos utilizados para preparação das amostras estão descritos nos itens anteriores, sendo 3.12.1 para preparação dos controles positivos e negativos, 3.12.2 para preparação dos extratos, 3.13 para extração do RNA total a partir dos extratos tissulares, e finalmente os ensaios de RT-PCR para detecção de HAV conforme item 3.6.1.3, utilizando concentração de MgCl_2 padronizada para extratos de ostras no item 3.14.1 e concentração ideal de iniciadores do item 3.14.2. A reação de RT-PCR foi realizada através dos protocolos C ou D padronizados para detecção de RNA viral obtido dos extratos de ostras.

Para cada bateria de amostras processadas, correspondendo a seis amostras de um local de coleta, foram processados três controles positivos, sendo um para cada um dos vírus HAV, RV e PV em que as amostras foram semeadas com $600\mu\text{l}$ de fluido viral. Assim das doze ostras coletadas por local por mês, seis foram testadas e processadas como três amostras experimentais (duas ostras = 1 amostra) não inoculadas com vírus e portanto supostamente negativas, a menos que já estivessem contaminadas no próprio ambiente e seis ostras (três amostras) foram processadas como três controles virais.

Tabela 17: Locais de cultivo de ostras e número de ostras coletadas por local

Local	Número de amostras coletadas de 1998 a 1999	N° de amostras analisadas (2 ostras= 1 amostra)	
		Testes	Controles
Sítio 1	72	36	36
Sítio 2	54	27	27
Sítio 3	72	36	36
Sítio 4	66	33	33
Total de ostras	264	132	132

4- RESULTADOS

4.1- Cultivo e infecção de células Frhk-4

O cultivo celular ocorreu conforme descrito em métodos no item 3.2, e o tapete celular confluyente pode ser visualizado na figura 6A.

A infecção das células ocorreu através da inoculação do fluido viral (item 3.3), demonstrando, após 3 dias, o efeito citopático característico do HAV e destruição completa do tapete em 6 dias pós - infecção (figura 6B).

4.2- Título infeccioso do vírus da hepatite A

O fluido infeccioso do HAV, produzido de acordo com o item 3.3, foi titulado através do ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) (item 3.4.1), utilizando o anticorpo monoclonal Mab 8241 e revelado com o anti-IgG de camundongo conjugado a FITC. De acordo com este ensaio, o título viral foi de 1×10^5 ffu/ml (figura 7).

Na titulação do HAV por IFA, as células infectadas apresentam fluorescência citoplasmática e núcleo não fluorescente; observa-se também uma leve fluorescência de fundo.

Foi realizada também a titulação do HAV pelo método de análise de formação de placas de lise (CROMEANS et al., 1987), conforme descrito no item 3.4.2, e o título viral encontrado foi de 1×10^5 pfu/ml, confirmando o ensaio de imunofluorescência indireta.

4.3- Ensaio de citotoxicidade e citopatogenicidade dos extratos de ostras em culturas celulares, realizados conforme item 3.18

Para o ensaio inicial de citotoxicidade realizado até 72 horas de incubação, a diluição com citotoxicidade mínima foi 1/32. Partindo-se desta diluição até a diluição 1/1000, foram realizados os ensaios simultâneos de citotoxicidade para extratos negativos e citopatogenicidade para extratos inoculados com HAV.

Para os extratos negativos, a partir da diluição 1/32, em 72 horas de incubação começou a ser observado efeito citotóxico, que aumentou gradativamente a cada dia.

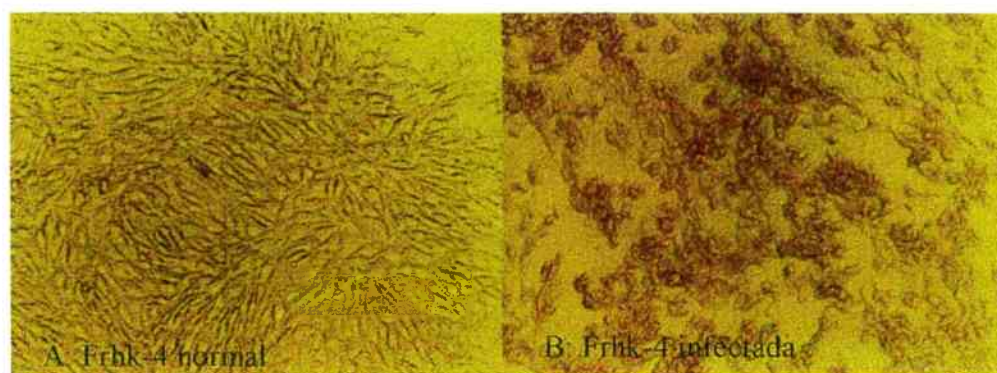


Figura 6: Infecção de células Frhk-4 pelo vírus da Hepatite A, cepa HM 175

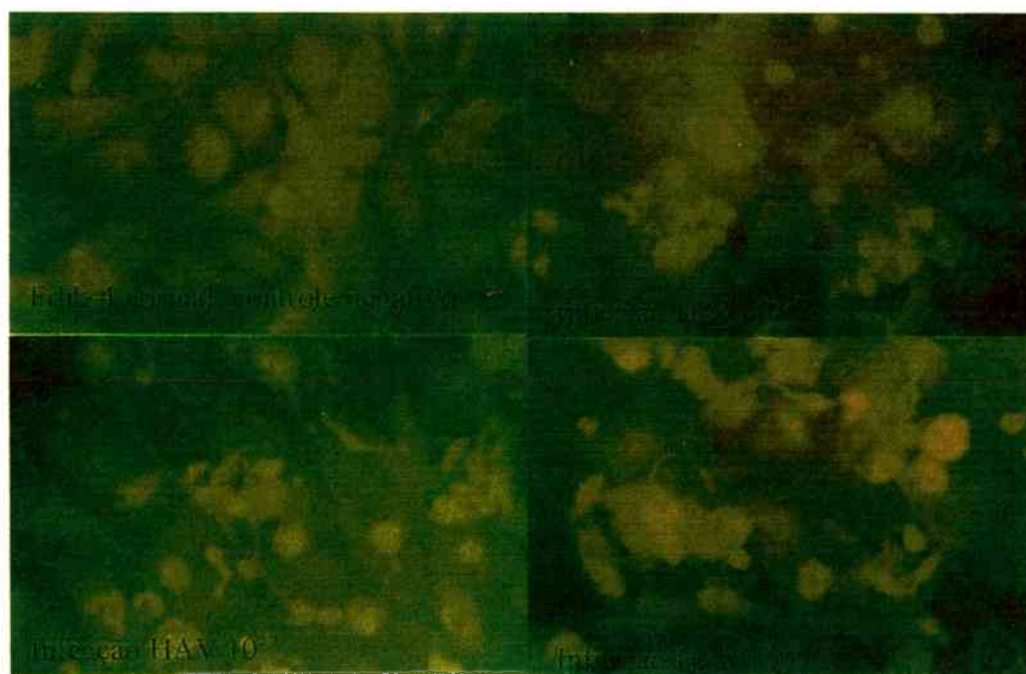


Figura 7: Titulação do fluido infeccioso do vírus da Hepatite A por imunofluorescência

Em 7 dias de incubação, o tapete celular já se apresentava bastante danificado e estava completamente destruído em 10 dias de incubação.

Para o controle viral, realizado conforme item 3.18, apenas com fluido viral diluído em meio de cultura de infecção, a partir da diluição 1/32, igual aos extratos, o efeito citopático característico do HAV começou a ser observado após 5 dias de infecção, ou seja, no mesmo período em que os extratos negativos apresentavam citotoxicidade. Conseqüentemente, não foi observado efeito citopático do vírus nos extratos semeados, pois no quinto dia de incubação as células já estavam morrendo devido ao efeito citotóxico dos extratos.

4.4- Preparação dos extratos teciduais de ostras utilizando PEG 6000 e PEG 8000

O protocolo de preparação de extratos foi realizado com PEG 6000 e com PEG 8000. Este protocolo, realizado conforme item 3.12.2, foi utilizado também para a preparação de extratos de ostras inoculadas com RV e PV, separadamente.

Na figura 8 podem ser visualizados resultados de RT-PCR, utilizando protocolo de amplificação C, item 3.6.1.3, para RNAs obtidos de extratos (OS) de ostras semeadas com HAV, PV e RV, preparados segundo item 3.12.

Para os extratos O.S. preparados com PEG 8000 observou-se que o fragmento específico para HAV, correspondente a 50pfu, foi fracamente amplificado, e também observou-se boa visualização dos produtos amplificados para RV (900ffu) e PV (300pfu) (Figura 8A).

O resultado de amplificação fraca para HAV, detectando no mínimo 50pfu de HAV, se repetiu por vários experimentos no extrato OS, enquanto que para o extrato controle, que representou 100% de recuperação viral, o limite mínimo de detecção foi de 5pfu (Figura 18A) utilizando também detecção pelo protocolo C de RT-PCR. Isto representou recuperação de HAV de apenas 10% quando PEG 8000 foi utilizado na preparação dos extratos.

Na figura 8B, os extratos OS foram preparados com PEG 6000 e detectados pelo protocolo C de RT-PCR. Observa-se que os produtos amplificados específicos para HAV (50pfu), RV (900ffu) e PV (300pfu) apresentaram boa intensidade para visualização.

Nos extratos inoculados com HAV, preparados com PEG 6000, os limites mínimos de detecção para os extratos controle EC., e extratos OS., utilizando o protocolo C de amplificação (Figuras 18A e 19A) foram ambos de 5pfu, o que correspondeu a 100% de recuperação viral. Para o RT-PCR realizado com o protocolo D (Platinum Super Mix[®]), foram de 2,5 e 3,3pfu respectivamente (figuras 18B e 19B), correspondendo a 75,7% de recuperação viral. Com estes experimentos ficou definido o uso de PEG 6000 para preparação dos extratos de ostras.

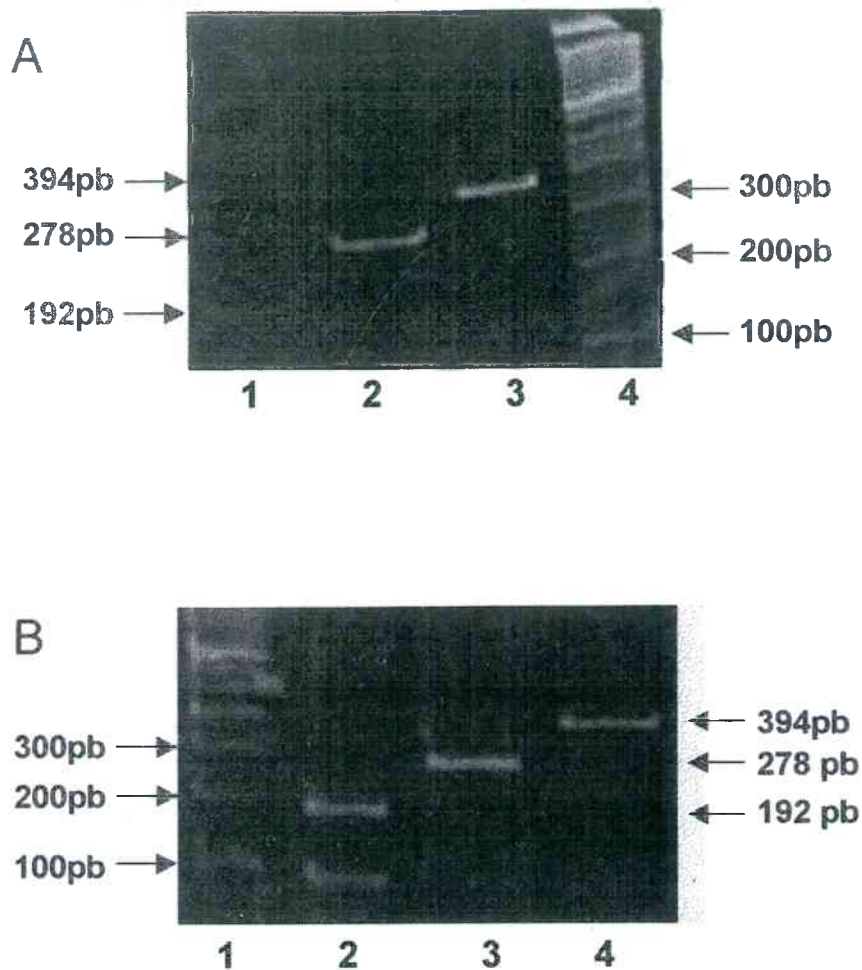


Figura 8: RT-PCR específico para RNA de ostras semeadas com vírus da Hepatite A (HAV), rotavírus (RV) e poliovírus (PV), métodos de preparação dos extratos utilizando PEG 8000 (fig. A) e PEG 6000 (fig. B).

A: Linhas 1, 2 e 3- HAV (50pfu), RV (900ffu) e PV (300pfu), respectivamente.

4- Padrão de tamanho molecular - 100pb ladder

B: Linha 1- Padrão de tamanho molecular - 100pb ladder

Linhas 2, 3 e 4: HAV (50pfu) , RV (900ffu) e PV (300pfu), respectivamente.

4.4- Extração do RNA de fluido de células infectadas e ensaios de RT-PCR

Foram realizados ensaios de RT-PCR para comparação dos protocolos A e B, utilizando RNA purificado de fluido viral por ambas as técnicas de extração descritas nos itens 3.5.1 e 3.5.2. respectivamente, extração com fenol-clorofórmio e extração com Trizol[®]. Estas amostras de RNA foram analisadas juntamente com os ensaios de limite de sensibilidade de detecção do RNA e curva de concentrações de MgCl₂ nas reações de RT-PCR descritas a seguir.

4.5- Padronização das concentrações ideais de MgCl₂ nas reações de RT-PCR

4.5.1- Curva de MgCl₂ para detecção de RNA obtido de fluido virai

Estes ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.6.2 de materiais e métodos. Os resultados são mostrados nas figuras 9, para o protocolos A (tradicional), e 10 (A e B), para o protocolo B (Super Mix), onde observa-se que para o protocolo A, item 3.6.1.1, as concentrações de 1,5; 2,5 e 3,0mM de MgCl₂ na reação de PCR foram as mais eficientes e apresentaram intensidades semelhantes no produto amplificado em primeira reação de PCR. O segundo PCR, realizado com as mesmas concentrações de MgCl₂, não intensificou os produtos de PCR.

Para o protocolo B, item 3.6.1.2, o melhor resultado de amplificação foi demonstrado com 2,5mM de MgCl₂, tanto no primeiro quanto no segundo PCR.

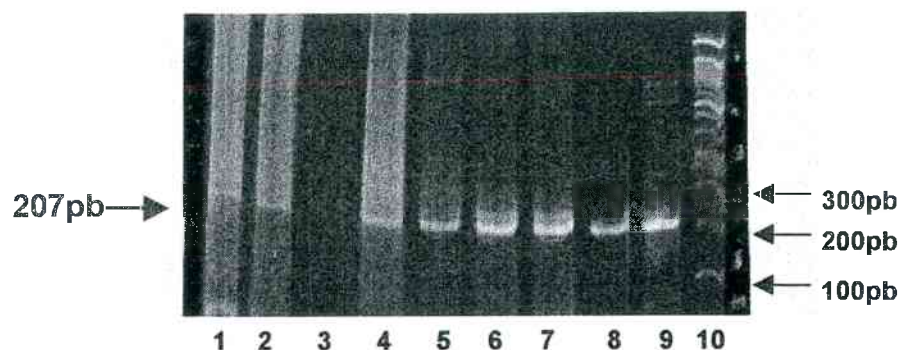


Figura 9: Padronização das concentrações de $MgCl_2$ na reação de RT-PCR, protocolo A (tradicional), utilizando RNA do vírus da Hepatite A extraído com fenol-clorofórmio.

Linhas 1, 2 e 4- Segunda reação de PCR utilizando respectivamente 3,0; 2,5 e 1,5 de $MgCl_2$;

Linha 3- Controle Negativo

Linhas 5 a 9- Primeira reação de PCR utilizando respectivamente 1,0; 3,0; 2,5; 2,0 e 1,5mM de $MgCl_2$

Linha 10 - Padrão de Tamanho Molecular 100pb ladder;

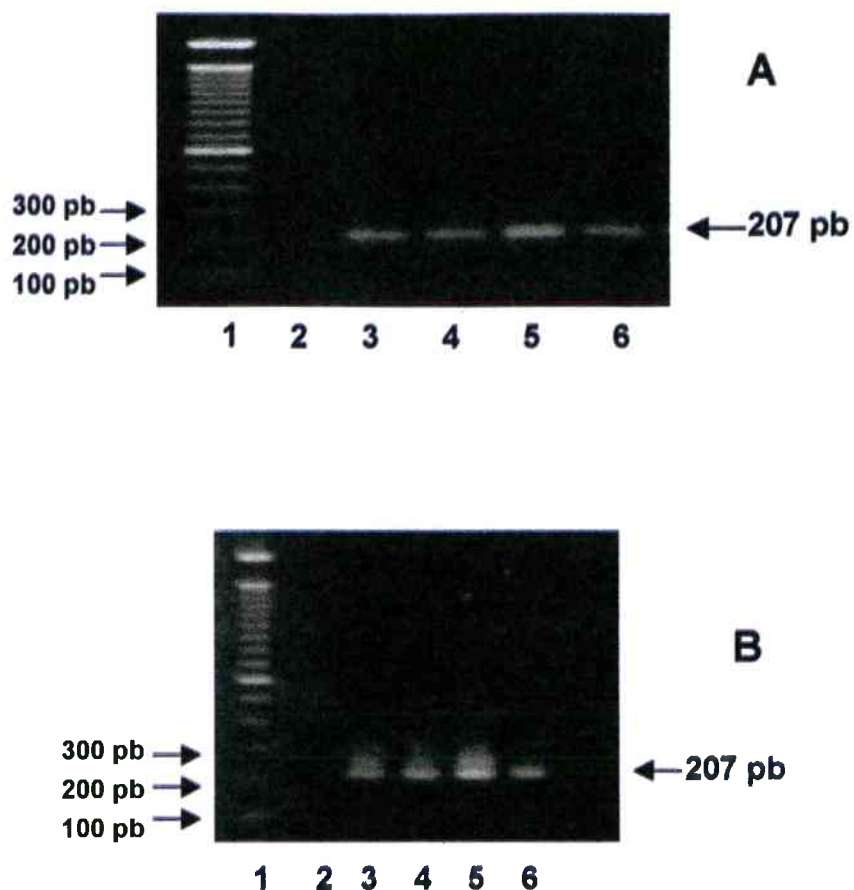


Figura 10: Padronização das concentrações de $MgCl_2$ na reação de RT-PCR, utilizando protocolo B (PCR Super Mix[®]), para RNA de vírus da Hepatite A, extraído com Trizol[®]

A (Primeira reação de PCR) e B (Segunda reação de PCR):

Linha 1 - Padrão de tamanho molecular 100pb ladder;

Linha 2 - Controle negativo,

Linhas 3, 4, 5 e 6- perfil dos produtos de PCR utilizando 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0mM de $MgCl_2$ respectivamente.

4.5.2- Curva de MgCl₂ para detecção de RNA de extratos teciduais de ostras

Este ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.14.1 utilizando o protocolo C (Super Mix[®]) de amplificação (item 3.6.1.3)

Na figura 11, observa-se que somente na reação de PCR onde foi empregada a concentração de 3,0mM de MgCl₂ houve amplificação do fragmento específico de HAV com boa intensidade para visualização. A concentração de 2,5mM apresentou amplificação muito fraca que não pode ser visualizada na fotodocumentação.

Ficou comprovado que a concentração de 3,0mM é a ideal para a realização das reações de RT-PCR para amplificação de RNA do HAV proveniente de extratos de ostras, já que o produto amplificado possui intensidade idêntica ao controle positivo.

4.6- Padronização da concentração ideal de iniciadores do RT-PCR, utilizando Protocolo C, PCR Super Mix[®] (item 3.6.1.3)

4.6.1- Curva de iniciadores HAV-R e HAV-L para detecção de RNA de fluido

A reação de amplificação foi conduzida com 2,5mM de MgCl₂ que foi a concentração ideal encontrada no ensaio anterior utilizando a mistura de reação de PCR Super Mix[®], e RNA extraído com Trizol[®]

O resultado deste ensaio é mostrado na figura 12, onde pode ser observado que para as concentrações de 100, 75 e 50 pmoles de iniciadores aparece uma mancha abaixo do produto amplificado que provavelmente corresponde a excesso de iniciadores que não foram utilizados na amplificação. Para as reações que utilizaram as concentrações de 40 e 30 pmoles o produto amplificado apresentou forte intensidade e a mancha referente a excesso de iniciadores não é observada. A concentração limite de iniciadores que ainda apresentou amplificação fraca foi de 20pmoles.

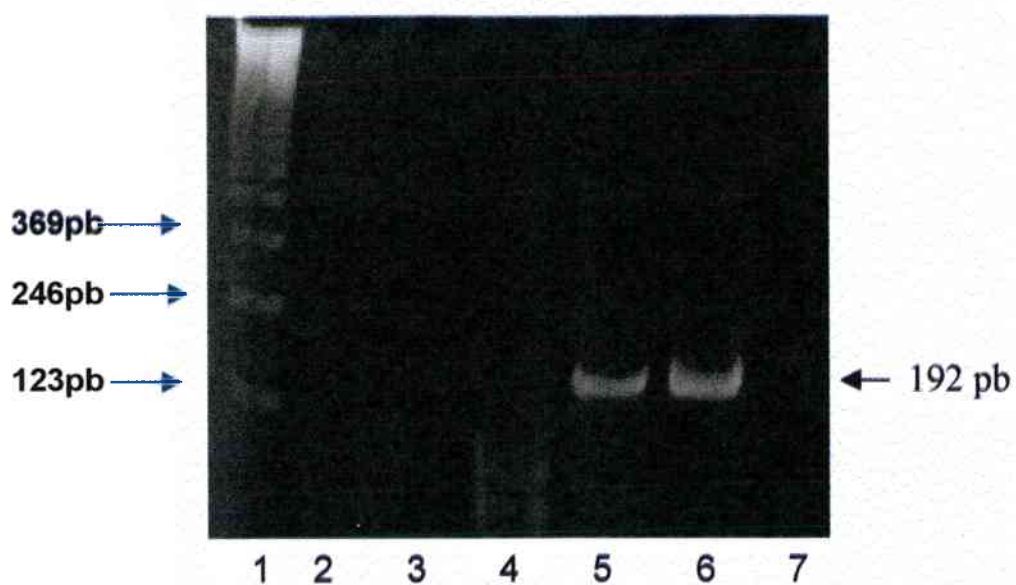


Figura 11: Padronização da concentração ideal de MgCl₂ para RT-PCR HAV para RNA obtido de extratos controles de ostras (E.C.), utilizando protocolo C de amplificação.

Linha 1- Padrão de tamanho molecular 123 pb ladder;

Linhas 2, 3, 4 e 5- Produtos de RT-PCR utilizando concentrações de MgCl₂ 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0mM de MgCl₂

Linha 6- Controle positivo de RNA HAV isolado de fluido virai



Figura 12: Padronização da concentração de iniciadores HAV-R e HAV-L na reação de RT-PCR, protocolo C, utilizando 2,5mM de $MgCl_2$, para detecção de RNA de vírus da Hepatite A purificado de fluido celular

1- Linha 1: Padrão de Tamanho Molecular 100pb ladder;

Linhas 2 a 7: Primeira reação de PCR utilizando respectivamente 100, 75, 50, 40, 30 e 20 pmoles de iniciadores;

Linha 8- Controle negativo

4.6.2- Curva de iniciadores HAV-R e HAV-L para detecção de HAV em RNA de extratos teciduais de ostras

Este ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.14.2, utilizando o protocolo C, PCR Super Mix[®] (item 3.6.1.3) para a definição da concentração ideal de iniciadores do RT-PCR. Foi utilizado RNA de HAV extraído de extratos controles (E.C.).

Na figura 13, observa-se os produtos de amplificação com as diferentes concentrações de iniciadores. Para as concentrações de 100, 75 e 50 pmoles, pode-se visualizar produtos de amplificação intensos, porém para as duas primeiras concentrações, ainda há excesso de iniciadores. Para as concentrações de 40 e 30 pmoles, observa-se o produto de amplificação com boa intensidade, no entanto a banda específica mostrou menor intensidade que na concentração anterior, sendo que também apareceram bandas inespecíficas. Não foi visualizada amplificação, quando a concentração de 20pmoles foi utilizada.

4.7- Limites de sensibilidade da detecção de RNA de fluido viral

Estes ensaios foram realizados conforme especificado no item 3.6.4., onde foram amplificadas diluições seriadas do RNA a fim de verificar a maior diluição em que ainda é possível a detecção do HAV, definindo o limite mínimo de detecção da técnica de RT-PCR.

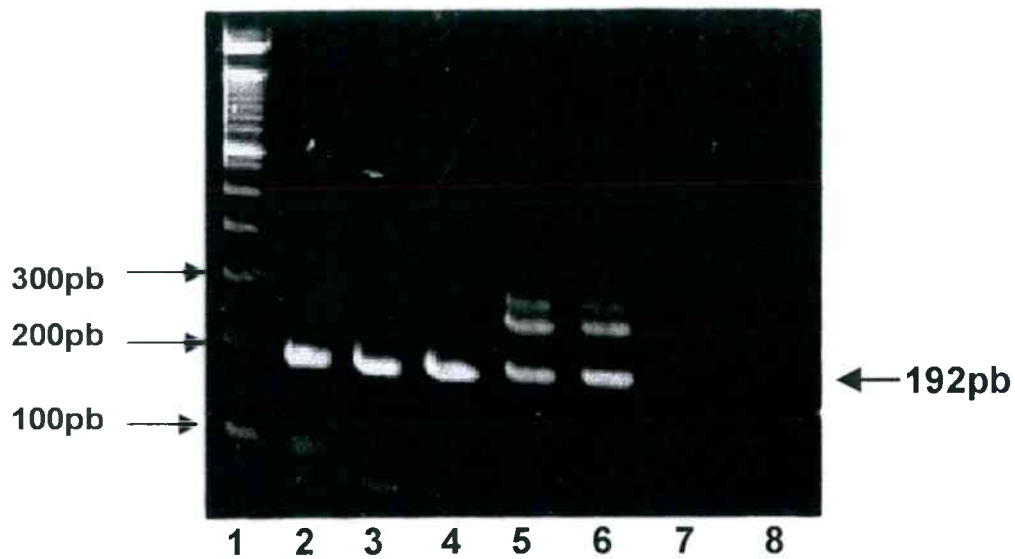


Figura 13: Padronização da concentração de iniciadores HAV-R e HAV-L na reação de RT-PCR, protocolo C, para detecção de RNA de vírus da Hepatite A obtido de extratos controles de ostras (EC)

Linha 1- Padrão de tamanho molecular 100pb ladder

Linhas 2 a 7- Primeira reação de PCR utilizando respectivamente 100, 75, 50, 40, 30 e 20 pmoles

8- Controle negativo

4.7.1- Limite de sensibilidade da reação de RT-PCR utilizando Protocolo A para detecção de RNA de HAV, extraído com fenol-clorofórmio

As amostras de RNA utilizadas foram extraídas com fenol-clorofórmio (conforme item 3.5.1) e a reação de amplificação ocorreu de acordo com o protocolo A (tradicional, descrito no item 3.6.1.1), que utiliza iniciadores HAV-CR e HAV-CL. Para a reação de PCR foi utilizada a concentração de $MgCl_2$ de 1,5mM.

O resultado deste ensaio é apresentado na figura 14, onde pode ser observado que o limite mínimo de detecção do HAV foi de 19,5ffu já que esta foi a maior diluição onde pode ser visualizado o produto específico de amplificação.

4.7.2- Limite de sensibilidade do RT-PCR utilizando Protocolo B, PCR Super Mix® para RNA de HAV extraído com Trizol®

A primeira e segunda reação de amplificação gênica foram realizadas através do Protocolo B, PCR Super Mix® (item 3.6.1.2), onde também foram utilizados iniciadores HAV-CR e HAV-CL e concentração de 2,5mM $MgCl_2$, definida no item 4.5.1.

O resultado deste ensaio pode ser visualizado na figura 15, onde o limite mínimo de detecção observado foi de 19,5ffu de HAV na primeira reação de PCR (Fig.15A). O segundo PCR não apresentou melhora na amplificação, ao contrário, os produtos de amplificação foram mais fracos e o limite de detecção foi igual ao primeiro PCR.

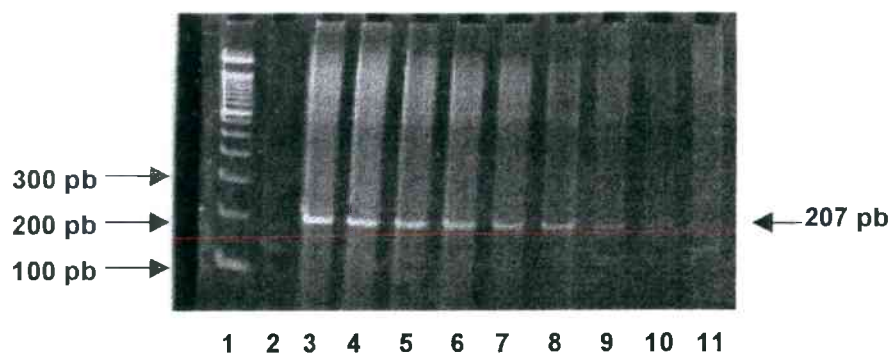


Figura 14: Limite de sensibilidade do RT-PCR, protocolo A (tradicional), para detecção de RNA do vírus da Hepatite A (HAV) extraído de fluido infeccioso pelo método fenol-clorofórmio.

Linha 1- Marcador de Tamanho Molecular 100pb ladder

Linha 2- Controle negativo

Linhas 3, 4 ,5 ,6, 7, 8, 9, 10 e 11: diluições de RNA virai com títulos virais respectivos: $2,5 \times 10^3$; $1,25 \times 10^3$; $6,25 \times 10^2$; $3,12 \times 10^2$; 7- $1,56 \times 10^2$; 78; 39; 19,5 e 9,7pfu de HAV.

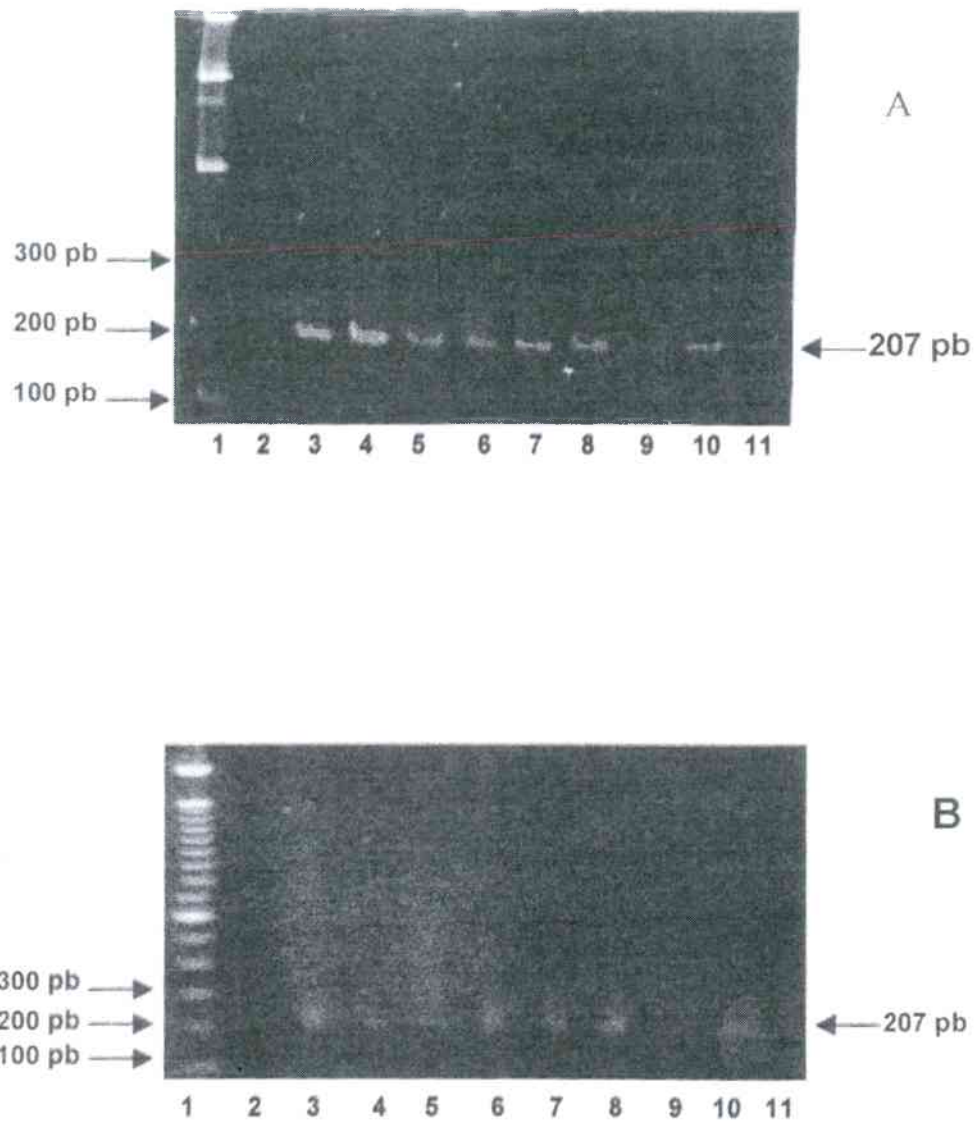


Figura 15: Limite de sensibilidade do RT-PCR, utilizando protocolo B, (PCR Super Mix[®]) para detecção de RNA do vírus da Hepatite A (HAV) extraído com Trizol[®]

A (Primeiro PCR) e B (Segundo PCR):

Linha 1- Padrão de tamanho molecular 100pb ladder

Linha 2- Controle negativo

Linhas 3 a 11 titulos virais respectivos: 5×10^3 ; $2,5 \times 10^3$; $1,25 \times 10^3$; $6,25 \times 10^2$; $3,12 \times 10^2$; 156 ; 78; 39; 19,5ffu de HAV.

4.7.3- Limites de sensibilidade dos ensaios de RT-PCR, protocolos C (PCR Super Mix[®]) e D (Platinum Super Mix[®]), utilizando iniciadores HAV-R e HAV-L

Após ter sido definido o método de extração de RNA viral a ser utilizado para fluido celular, foi realizada a comparação entre os protocolos de RT-PCR, que utilizam o reagente PCR Super Mix[®] (protocolos B e C, itens 3.6.1.2 e 3.6.1.3), utilizando os dois diferentes pares de iniciadores específicos para HAV descritos no item 3.7 e seus respectivos programas de amplificação.

Para os protocolos C e D, o par de iniciadores HAV-R e HAV-L foi utilizado nestes ensaios que foram realizados com as diluições de RNA extraído com Trizol[®].

Os resultados podem ser visualizados na figura 16 A (protocolo C) e 16 B (protocolo D). Os cDNAs obtidos para cada diluição, através do protocolo C, foram utilizados na reação de amplificação do protocolo D. Em ambos os protocolos, uma única reação de PCR foi realizada. O limite mínimo de detecção encontrado para ambos os protocolos C e D, foi 3,5 pfu de HAV. A figura 17 mostra graficamente os limites de sensibilidade do RT-PCR específico para detecção de HAV, utilizando os quatro protocolos (A, B, C, D) testados para RNA isolado de fluido viral.

4.8- Limites de sensibilidade dos ensaios de RT-PCR para RNA obtido de extratos tissulares de ostras

Com a finalidade de determinar a maior diluição em que ainda ocorre a visualização dos produtos de PCR, foram efetuadas diluições seriadas dos RNAs obtidos dos extratos de ostras, conforme descrito no item 3.14.3.

Estes ensaios foram realizados tanto para extratos EC (controles), quanto para extratos OS (experimentais), conforme descrito nos itens 3.14.3.1 e 3.14.3.2 respectivamente. Para ambos os extratos foram utilizados os dois protocolos de amplificação C e D (item 3.6.1.3).

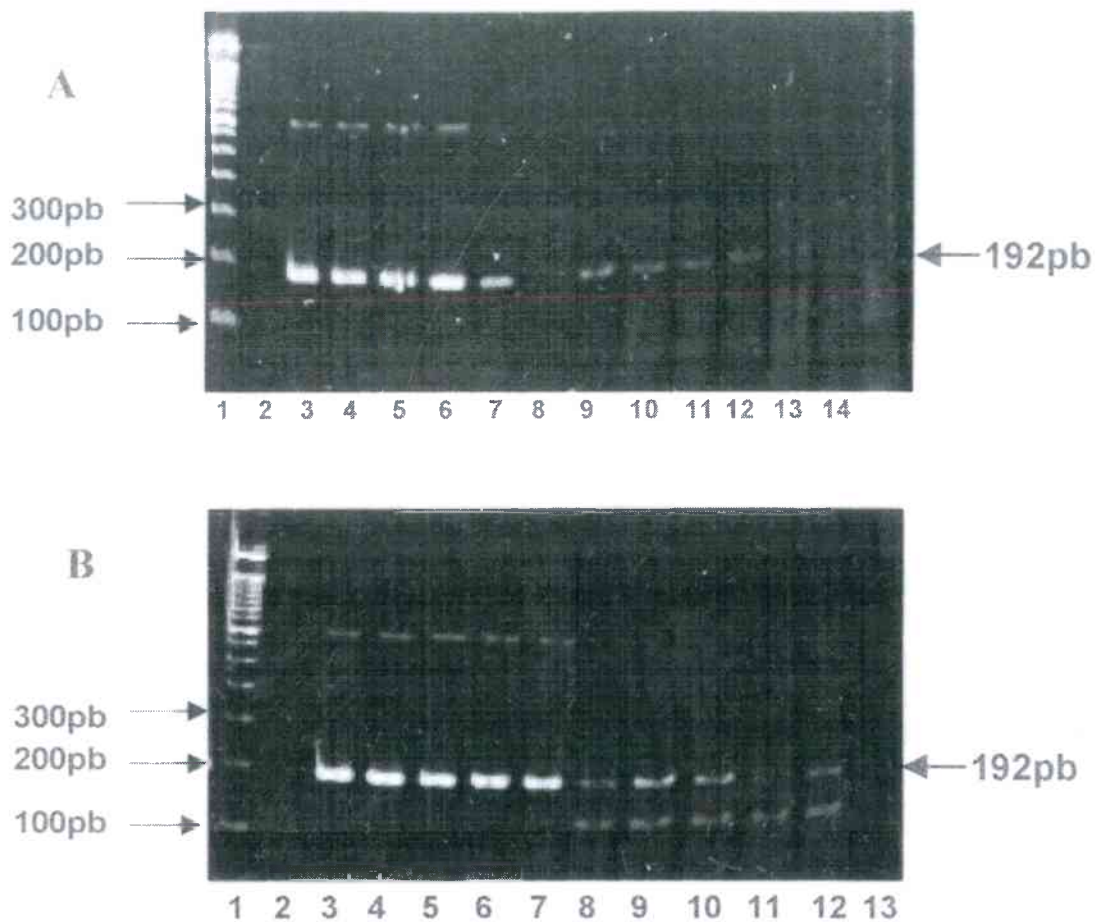


Figura 16: Limite de sensibilidade do RT-PCR em primeira reação de PCR, utilizando protocolos C (Super Mix[®]) e D (Platinum Super Mix[®]), para diluições de RNA do vírus da Hepatite A (HAV) extraído de fluido viral

A: Protocolo C:

1- Marcador de tamanho molecular 100 pb ladder; 2- CN;

Linhas 3 a 14: títulos virais respectivamente: $1,25 \times 10^3$; $6,2 \times 10^2$; $3,12 \times 10^2$; 156; 78; 39; 19,5; 9,7; 6,7; 5; 3,5 e 2,5pfu de HAV.

B: Protocolo D:

1- Marcador de tamanho molecular 100pb ladder; 2- CN;

Linhas 3 a 13: títulos virais respectivamente: $2,5 \times 10^3$; $1,25 \times 10^3$; $6,2 \times 10^2$; $3,12 \times 10^2$; 78; 19,5; 9,7; 6,7; 5; 3,5; 2,5pfu de HAV.

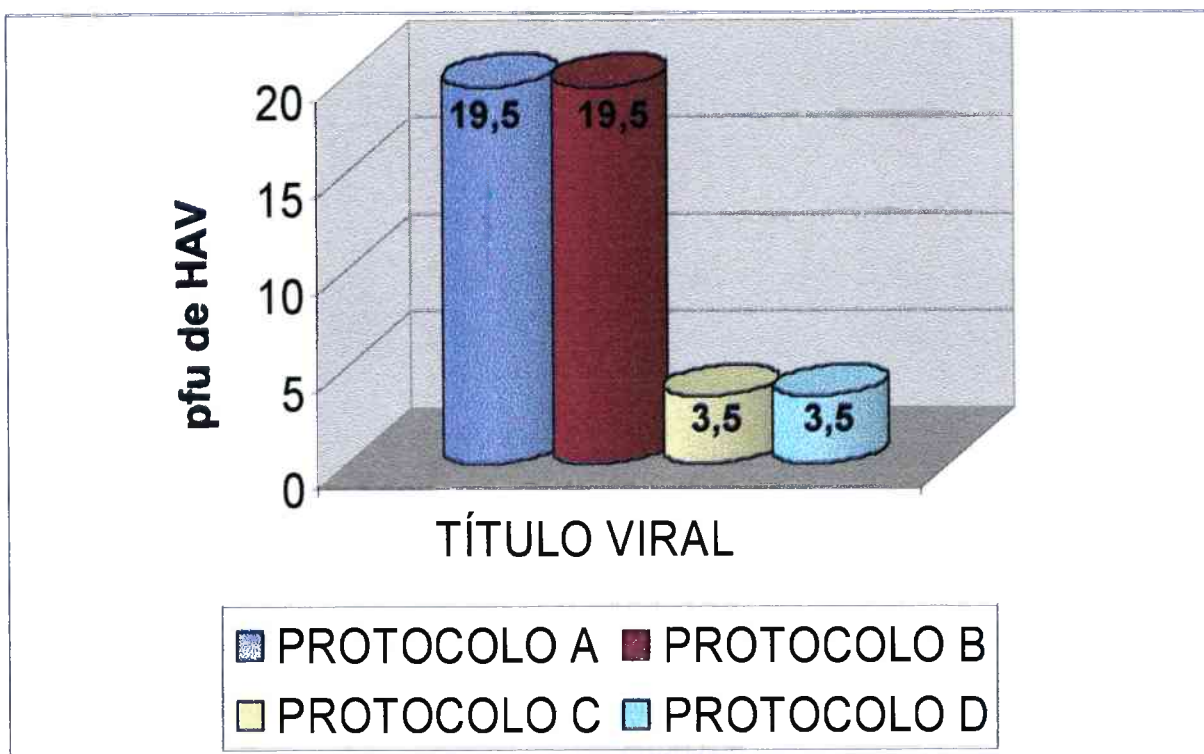


Figura 17: Limites de sensibilidade do RT-PCR específico para detecção de HAV, utilizando os quatro protocolos para RNA isolado de fluido virai

4.8.1- Limite de sensibilidade para RNA obtido de extratos EC

Os resultados obtidos para diluições do RNA de extratos controles E.C. são visualizados na figura 18. Utilizando o protocolo C de RT-PCR (figura 18A), a banda de 192pb específica para HAV foi observada até o título 5,0 pfu de HAV, sendo este o limite de sensibilidade. Podem ser observadas também bandas inespecíficas nas linhas correspondentes aos títulos virais de 12,5; 6,25 e 5,0 pfu de HAV.

Utilizando o protocolo D, Platinum Super Mix, o limite de sensibilidade foi de 2,5ffu HAV, até onde foi observada a banda específica (Figura 18B). As bandas inespecíficas também apareceram neste ensaio, nas linhas correspondentes a 5,0 e 3,3 pfu HAV.

4.8.2- Limite de sensibilidade para RNA obtido de Extratos OS

Na figura 19A apresenta-se o resultado da amplificação utilizando o protocolo C, PCR Super Mix. O limite de sensibilidade foi de 5,0 pfu de HAV. Neste ensaio não apareceram bandas inespecíficas.

Na figura 19B mostra-se o ensaio de limite de sensibilidade realizado através do protocolo de amplificação D. O produto de amplificação pode ser visualizado até o limite de 3,3 pfu de HAV. Comparando-se com a amplificação realizada pelo protocolo C, os produtos apresentaram-se com maior intensidade e a detecção foi mais sensível utilizando protocolo D.

A figura 20 mostra os limites de sensibilidade encontrados para detecção de HAV em RNA de fluido celular, RNA de extrato controle (EC) e RNA de extrato OS, utilizando protocolos C e D.

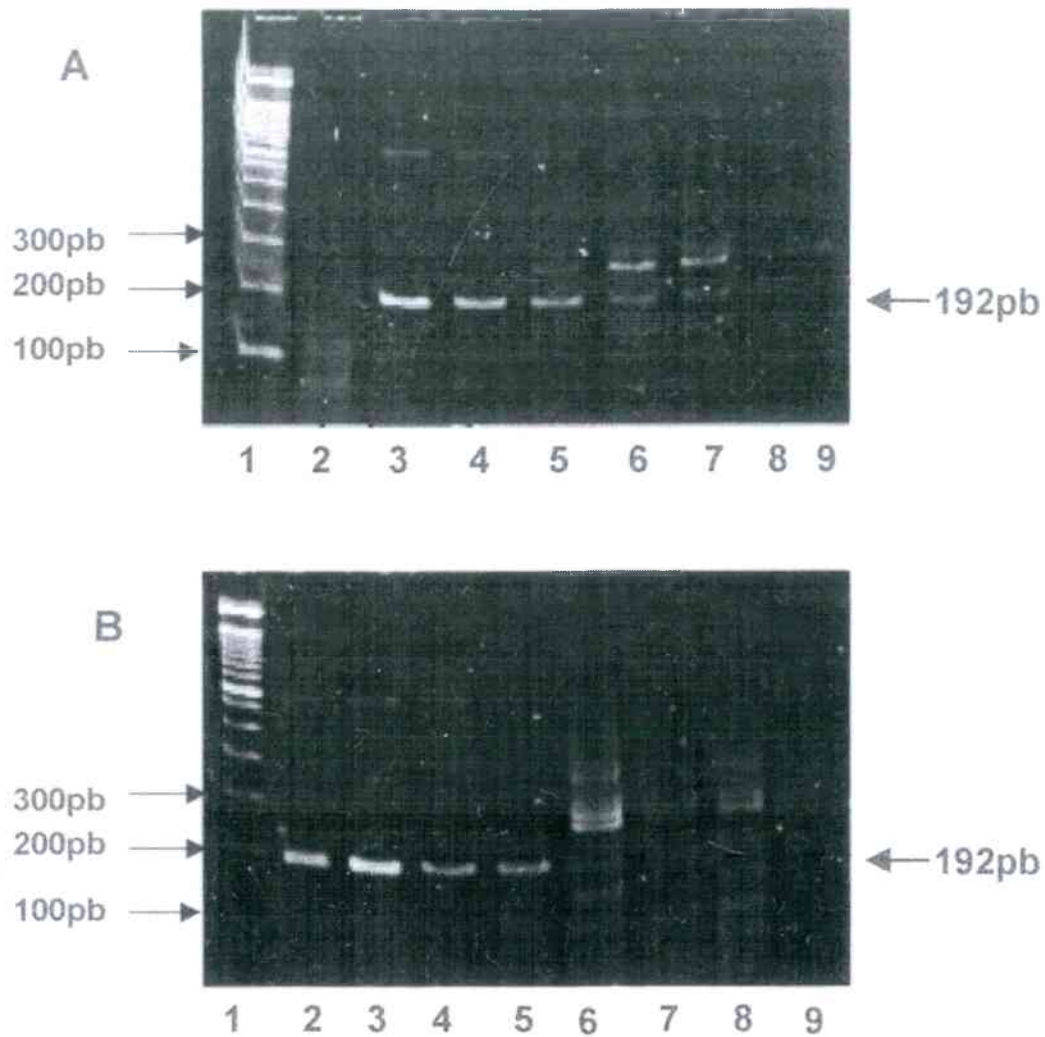


Figura 18: Limite de sensibilidade do RT-PCR na detecção de RNA do vírus da Hepatite A (HAV) em extrato controle de ostras (EC) utilizando protocolo C (Super Mix - Fig.A) e protocolo D (Platinum Super mix - Fig.B):

A: Linha 1- Marcador de peso molecular; Linha 2-CN;

Linhas 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9- títulos virais respectivos: 50; 25; 12,5; 6,25; 5; 3,3 e 2,5pfu de HAV

B: Linha 1- Marcador de tamanho molecular;

Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 - títulos virais respectivos: 50; 25; 12,5; 6,25; 5; 3,3 e 2,5pfu de HAV; Linha 9: CN

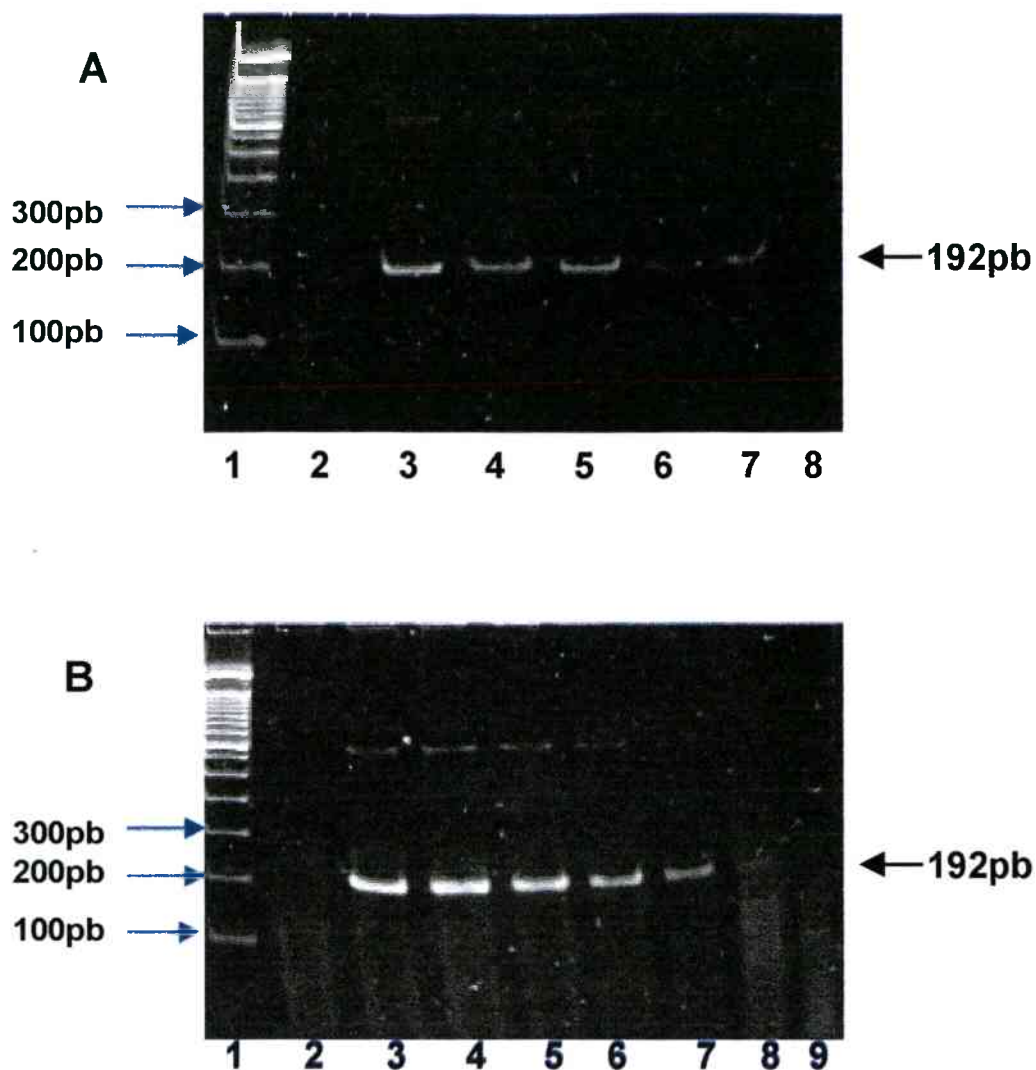


Figura 19: Limites de sensibilidade do RT-PCR para detecção de RNA do vírus da Hepatite A (HAV) em extratos de ostras semeadas (OS) utilizando protocolos C (Super Mix®- fig. A) e D (Platinum Super Mix®-fig. B)

**Linha 1- Marcador de tamanho molecular 100pb Ladder
Linha 2- Controle negativo**

Linhas 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9- títulos virais respectivos: 50; 25; 12,5; 6,25; 5; 3,3 e 2,5 pfu de HAV

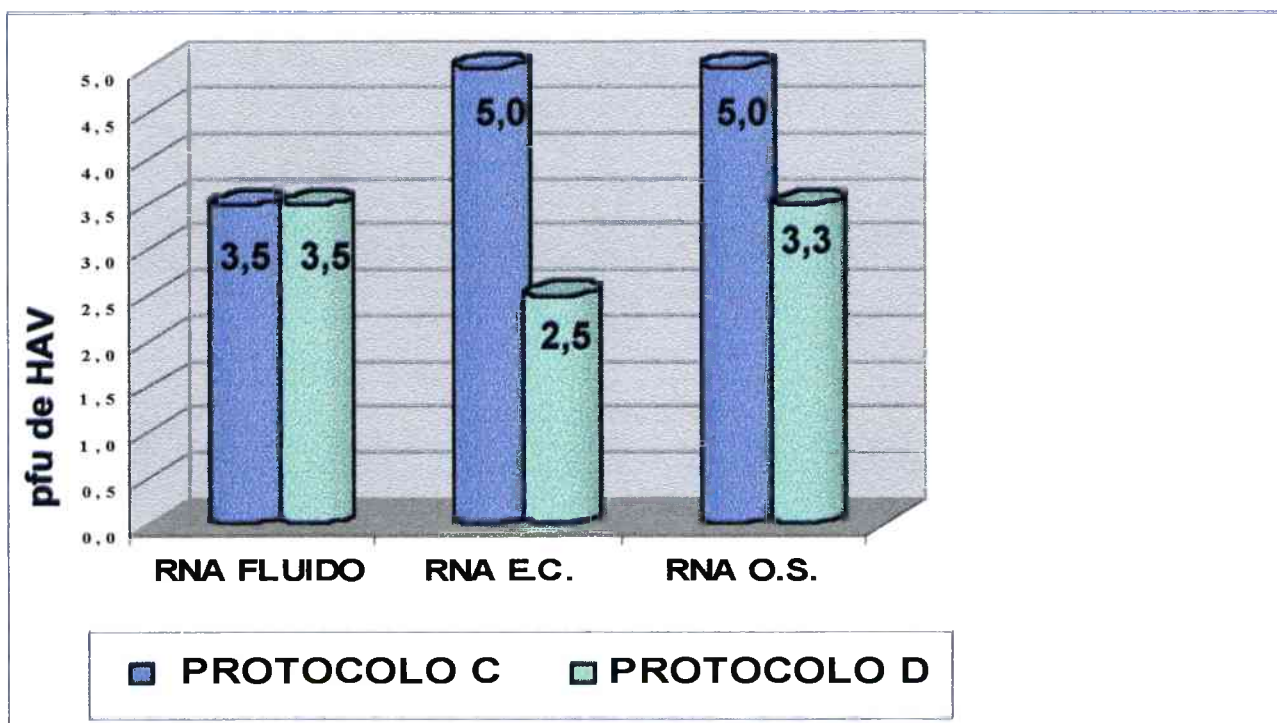


Figura 20: Limites de sensibilidade do RT-PCR específico para detecção de HAV em RNA de fluido celular, extrato controle EC e extrato OS, através dos protocolos C (Super Mix) e D (Platinum Super Mix)

4.9- Reações de RT- PCR específico para detecção de Poliovírus (PV) e Rotavírus (RV) e Protocolo Triplex para amplificação simultânea de HAV, RV e PV

4.9.1- Detecção de RNAs extraídos de fluidos virais

Os RNAs virais utilizados nestas reações foram extraídos a partir de fluidos virais de células infectadas pelo método do Trizol[®]. A tabela 18 indica os títulos virais nos fluidos celulares e no RNA detectado nas reações de RT-PCR específicas e triplex.

Na figura 21 podem ser observados os resultados das reações de RT-PCR onde foram utilizados os protocolos específicos para HAV, PV e RV realizados conforme descritos nos itens 3.6.1.3; 3.7 e 3.8 respectivamente. Os resultados das amplificações simultâneas realizadas conforme descrito no protocolo triplex n°1, item 3.9.1, são também apresentados nesta figura.

Na figura 21 observa-se três produtos distintos de amplificação, representando HAV (192pb), RV (278pb) e PV (394pb), mostrando que os protocolos de RT-PCR específicos e o protocolo triplex n°1 foram eficientes para a detecção dos três vírus, de forma individual (linhas 3, 4 e 5) e simultânea (linhas 6, 7 e 8).

Para o protocolo triplex, o melhor resultado de amplificação foi observado quando 8µl de cDNA foram utilizados na reação de PCR.

Tabela 18: Títulos virais nos fluidos e RNA detectado nas reações de RT-PCR

	HAV	PV	RV
Título viral fluido	10 ⁵ ffu/ ml	10 ⁷ pfu/ ml	3x10 ⁷ ffu/ ml
Título em 5µl RNA (RT-PCR específico)	5 x 10 ³ ffu	5 x 10 ⁵ pfu	15 x 10 ⁵ ffu
Título em 3µl RNA (RT-PCR triplex)	3 x 10 ³ ffu	3 x 10 ⁵ pfu	9 x 10 ⁵ ffu

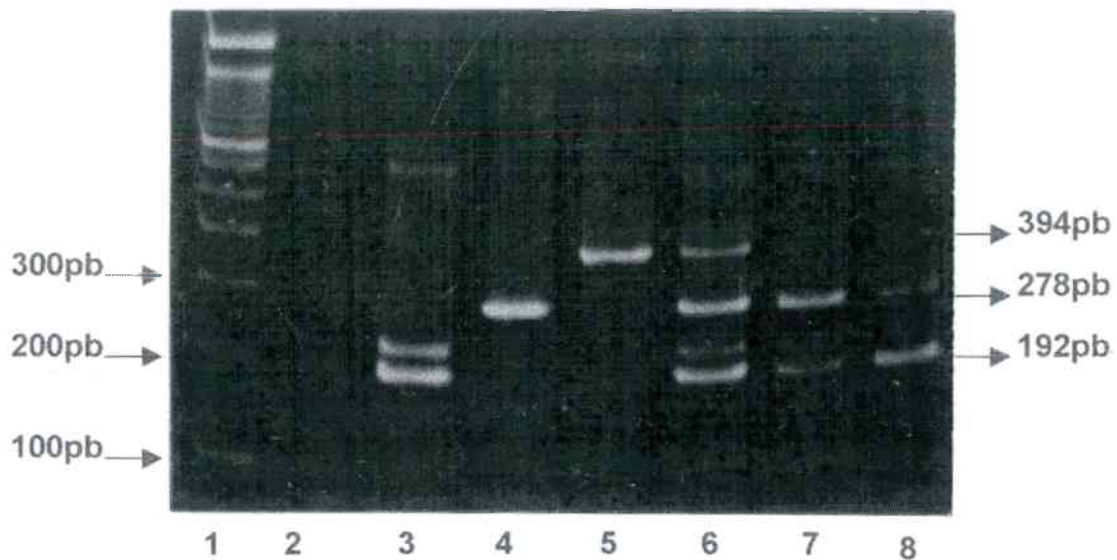


Figura 21: RT-PCRs específicos e Triplex, para detecção individual e simultânea do vírus da Hepatite A (HAV), rotavírus (RV) e poliovírus (PV) utilizando RNAs controles extraídos de fluidos virais

Linha 1- Marcador de tamanho molecular - 100pb Ladder
Linha 2- Controle negativo

Linhas 3, 4 e 5- HAV (192pb); RV (278pb); PV (394pb), respectivamente

Linhas 6, 7 e 8- RT-PCR triplex (8, 5 e 3 μ l de cDNA respectivamente)

4.9.2- Detecção de RNA HAV, RV e PV obtidos a partir de extratos controles (EC) e extratos de ostras semeadas (OS)

Foram testados dois diferentes protocolos triplex para amplificação simultânea de HAV, PV e RV, que foram comparados com os protocolos específicos para amplificação individual de cada vírus (itens 3.6.1.3; 3.7 e 3.8 respectivamente). A tabela 19 indica os títulos virais nos fluidos celulares, extratos inoculados e RNA detectado na reação de RT-PCR.

Tabela 19: Títulos virais nos fluidos, extratos inoculados, RNA total obtido dos extratos e RNA detectado nas reações de RT-PCR

	HAV	PV	RV
Título viral fluido	10^5 ffu/ ml	10^7 pfu/ ml	3×10^7 ffu/ ml
Título viral no extrato inoculado com 600 μ l de fluido (ffu ou pfu)	6×10^4 ffu	6×10^6 pfu	$1,8 \times 10^7$ ffu
Volume final extrato (ml)	6	10	10
Título em 500 μ l extrato ou 500 μ l RNA (pfu ou ffu)	5×10^3	3×10^5	9×10^5
Título em 5 μ l RNA (RT-PCR)	50 ffu	300 pfu	900 ffu

Através dos resultados apresentados nas figuras 22 (Extrato EC) e 23 (Extrato OS), foi realizada a comparação entre as três metodologias que seguem:

- cDNA específico (RNAs de cada vírus separadamente): PCR específico
- cDNA Triplex ("pool" dos três RNAs virais): PCR Triplex ("pool" de iniciadores para HAV, RV, PV), item 3.9.1.
- cDNA Triplex ("pool" dos três RNAs virais): PCR específico para cada vírus, item 3.9.2.

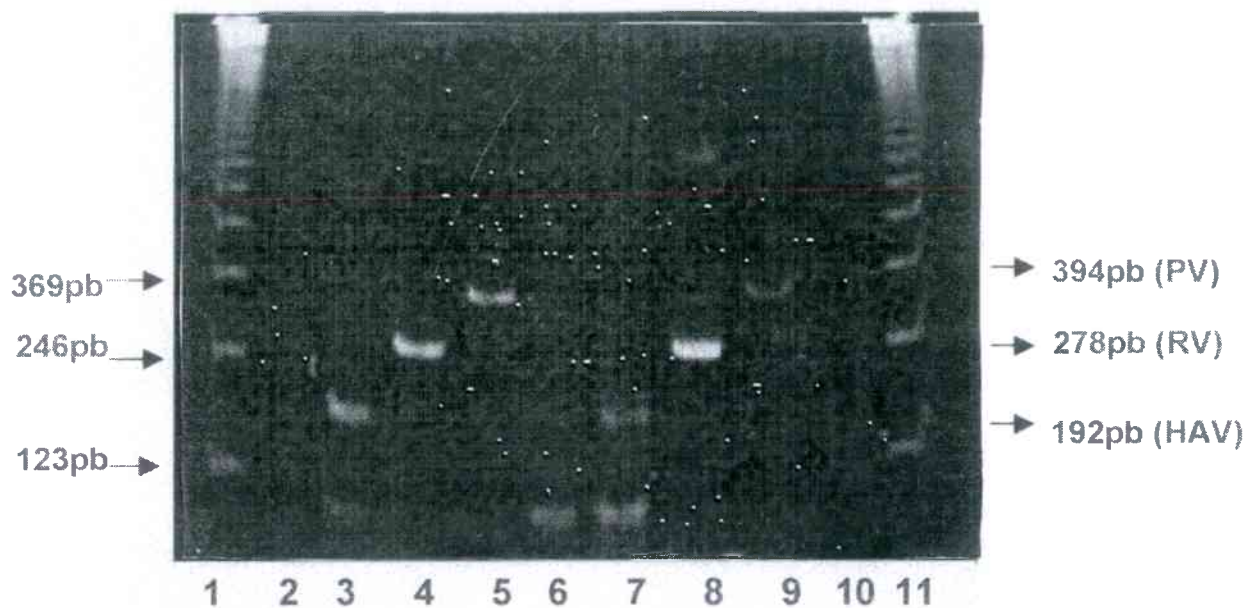


Figura 22: Comparação entre protocolos RT-PCR triplex e específicos para detecção do vírus da hepatite A (HAV), rotavírus (RV) e poliovírus (PV) em RNAs de extratos controles positivos (EC)

Linha 1 e 11- Marcador de tamanho molecular 123pb

Linha 2- Controle negativo

Linhas 3, 4 e 5- HAV, RV, PV respectivamente

Linhas 6- RT-PCR triplex HAV+RV+PV

Linhas 7, 8 e 9 - cDNA triplex X PCR HAV, RV e PV respectivamente

Linha 10- cDNA HAV X PCR triplex

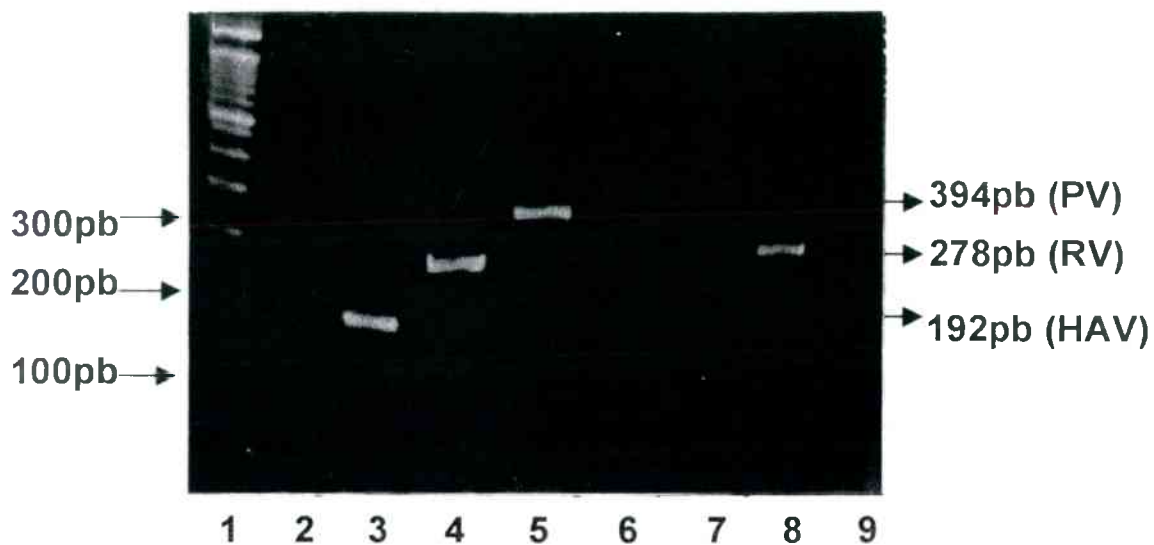


Figura 23: Comparação entre protocolos RT-PCR triplex e específicos para detecção de vírus da Hepatite A (HAV), rotavírus (RV) e poliovírus (PV) em RNAs de ostras experimentalmente semeadas (OS)

1- Marcador de tamanho molecular-100pb Ladder

2- Controle negativo

3, 4 e 5- HAV, RV e PV respectivamente

6- RT-PCR Triplex HAV+RV+PV

7, 8 e 9- cDNA Triplex X PCR HAV, RV, PV respectivamente

Na figura 22 mostra-se que quando os protocolos de RT-PCR foram aplicados para os extratos controles (EC), foi possível detectar os três vírus de forma individual através dos protocolos específicos (linhas 3, 4 e 5), mas não simultaneamente através do protocolo triplex n°1 (linha 6). Os testes realizados com EC mostraram que, quando foi realizado cDNA triplex com RNAs dos três vírus X PCR protocolo específico (protocolo triplex n°2, item 3.9.2), para HAV e PV (linha 7 e 9), a eficiência da amplificação gênica foi menor do que quando o cDNA é realizado individualmente nos RT-PCRs específicos (linhas 3, 4 e 5). Para RV a amplificação observada apresentou a mesma eficiência (linha.8).

Quando foi realizado o cDNA com RNA de E.C semeado com HAV e PCR com mistura dos três pares de iniciadores, não foi observado produto de amplificação (linha 10).

Na figura 23 observa-se a comparação dos protocolos de RT-PCR específicos e triplex para os extratos OS. As linhas 3, 4 e 5 correspondem ao RT-PCR específico, onde pode-se observar os produtos de amplificação para HAV, RV e PV respectivamente. A linha 6 corresponde ao RT-PCR protocolo triplex n°1 (item 3.9.1), e não se observa produto de amplificação para qualquer um dos três vírus.

As linhas 7, 8 e 9 correspondem à metodologia de cDNA triplex X PCR específico (protocolo triplex n°2) para os extratos OS de HAV, RV e PV, sendo que não observamos amplificação para HAV (linha 7) e PV (linha 9). No caso dos RV (linha 8) a amplificação foi igualmente eficiente. No caso do OS, o produto de PCR foi somente observado quando o RT-PCR específico para cada vírus foi realizado.

4.10- Amostras de campo

As amostras foram analisadas através dos protocolos C ou D de RT-PCR, padronizado para detecção de HAV em RNA total obtido de extratos teciduais de ostras.

Foram coletadas doze ostras por mês em cada local, seis foram testadas e processadas como três amostras experimentais (duas ostras = 1 amostra) não inoculadas com vírus e, portanto, supostamente negativas, a menos que já estivessem contaminadas no próprio ambiente e as outras seis ostras (três amostras) foram processadas como três controles virais (HAV, RV e PV).

Como cada duas ostras corresponderam a uma única amostra, ao todo foram analisadas 132 amostras experimentais para todos os quatro locais de cultivo (tabela 20).

Durante estas análises realizou-se um controle positivo de HAV, para cada mês e local de coleta, utilizando-se uma das amostras coletadas a qual foi semeada com vírus HAV. O número total de controles positivos realizados para HAV foi de 44. Quando estes controles foram analisados, 41 foram realmente positivos e 3 não funcionaram, o que correspondeu a 93% de sucesso no RT-PCR com a utilização dos protocolos C e D.

Tabela 20: Locais de cultivo de ostras e número de amostras analisadas por local

Local	Nº meses coletados	Nº de amostras analisadas	Nº amostras positivas	Nº de controles HAV
SÍTIO 1	12	36	0	12
SÍTIO 2	9	27	6	9
SÍTIO 3	11	33	0	11
SÍTIO 4	12	36	0	12
Total de amostras		132	6	44

Os resultados das análises por RT-PCR específico para detecção de HAV podem ser visualizados nas tabelas 21 e 22.

Nos sítios 1, 2, 3 e 4 foram analisadas respectivamente 36, 27, 33 e 36 amostras experimentais. Para os sítios 1, 3 e 4, todas as amostras analisadas foram negativas para HAV. No sítio 2, das 27 amostras experimentais analisadas, foram encontradas seis amostras positivas para HAV (tabelas 21 e 22, figura 24), o que correspondeu a 22% do total de amostras coletadas neste local.

No sítio 2 foram encontradas amostras positivas para HAV durante três meses: 3 amostras em abril, 2 amostras em junho e 1 em setembro de 1999, no mesmo local de cultivo (tabelas 21 e 22). Nos meses de fevereiro, março, maio e agosto as ostras não puderam ser coletadas, assim foi realizada análise de apenas 9 meses de coleta.

Na figura 25 pode-se observar o resultado da análise por RT-PCR específico para HAV, aplicado para duas baterias experimentais de amostras de campo. Foram realizados controles negativos de ostras não inoculadas, linhas 13 e 14, e controles positivos de extratos O.S. (ostras inoculadas) linhas 11 e 12. A banda de 192pb corresponde ao produto específico de amplificação do HAV. No controle positivo, linha 12, é visualizada uma banda inespecífica acima de 200pb. Esta banda apareceu também no controle negativo. O controle negativo não apresentou a banda específica de 192pb, assim as amostras em que esta banda foi visualizada foram consideradas positivas. As linhas de 1 até 9 correspondem a amostras experimentais de ostras que foram coletadas para análise. As linhas 1, 2 e 3 são amostras que apresentaram a banda específica de 192pb e são positivas para HAV.

Tabela 21: Resultados das análises por RT-PCR específico para HAV nos quatro pontos de coleta de ostras

DATA	SÍTIO 1	SÍTIO 2	SÍTIO 3	SÍTIO 4
1998				
OUTUBRO	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
NOVEMBRO	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
DEZEMBRO	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1999				
JANEIRO	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
FEVEREIRO	Negativo	Não coletado	Não coletado	Negativo
MARÇO	Negativo	Não coletado	Negativo	Negativo
ABRIL	Negativo	Positivo: 3 amostras	Negativo	Negativo
MAIO	Negativo	Não coletado	Negativo	Negativo
JUNHO	Negativo	Positivo: 2 amostras	Negativo	Negativo
JULHO	Negativo	Negativo	Não coletado	Negativo
AGOSTO	Não coletado	Não coletado	Negativo	Negativo
SETEMBRO	Negativo	Positivo: 1 amostra	Negativo	Negativo
OUTUBRO	negativo	Negativo	Negativo	Não coletado
Total de meses coleta	12 meses	9 meses	11 meses	12 meses

Tabela 22: Resultados das análises por RT-PCR específico para HAV nos quatro pontos de coleta

DATA	SÍTIO 1		SÍTIO 2		SÍTIO 3		SÍTIO 4	
	Nº amostras analisadas	Nº amostras positivas	Nº amostras analisadas	Nº amostras positivas	Nº amostras analisadas	Nº amostras positivas	Nº amostras analisadas	Nº amostras positivas
1998	-	-	-	-	-	-	-	-
OUTUBRO	3	0	3	0	3	0	3	0
NOVEMBRO	3	0	3	0	3	0	3	0
DEZEMBRO	3	0	3	0	3	0	3	0
1999	-	-	-	-	-	-	-	-
JANEIRO	3	0	3	0	3	0	3	0
FEVEREIRO	3	0	Não colet	-	Não colet	-	3	0
MARÇO	3	0	Não colet	-	3	0	3	0
ABRIL	3	0	3	3	3	0	3	0
MAIO	3	0	Não colet	-	3	0	3	0
JUNHO	3	0	3	2	3	0	3	0
JULHO	3	0	3	0	Não colet	-	3	0
AGOSTO	Não colet	-	Não colet	-	3	0	3	0
SETEMBRO	3	0	3	1	3	0	3	0
OUTUBRO	3	0	3	0	3	0	Não colet	-
Nº total	36	0	27	6	33	0	36	0

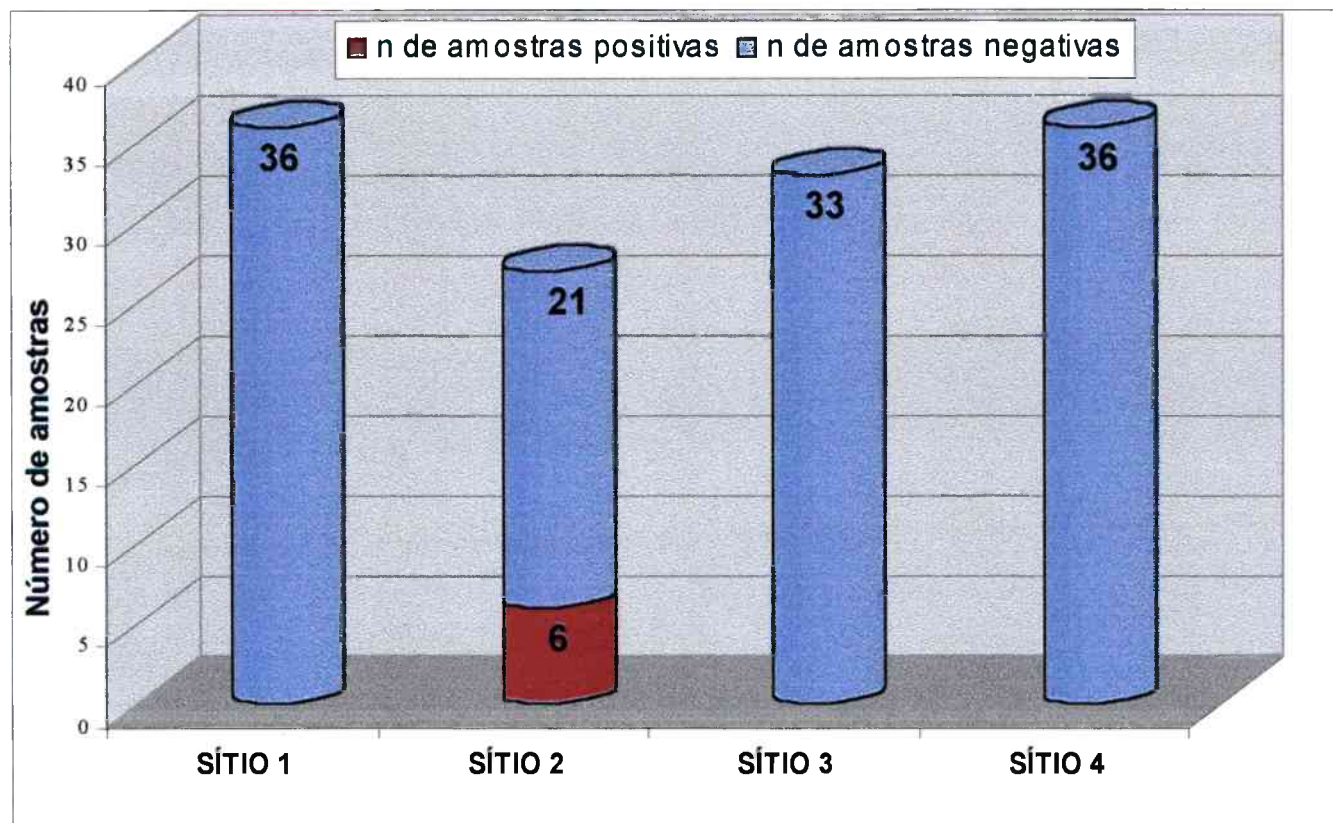


Figura 24: Amostras de campo dos sítios 1, 2, 3 e 4 analisadas por RT-PCR específico para detecção de HAV

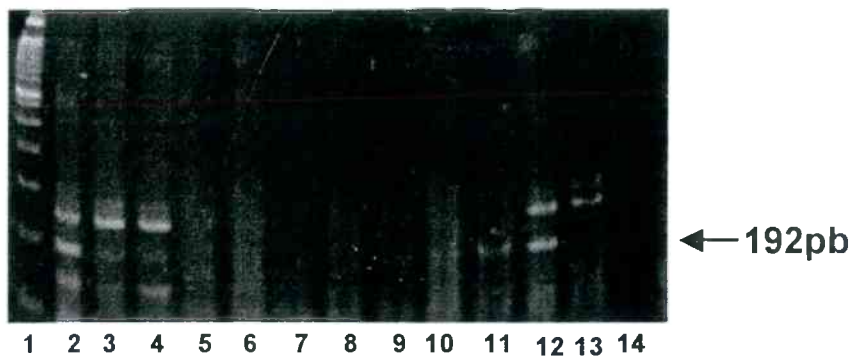


Figura 25: RT-PCR específico para detecção de vírus da hepatite A, aplicado para amostras de campo de ostras coletadas para análise

Linha 1: Marcador de tamanho molecular – 100pb Ladder

Linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9- Amostras de campo experimentais

Linhas 11 e 12 - Controles positivos de ostras

Linhas 13 e 14- Controles negativos de ostras

5- DISCUSSÃO

5.1- Crescimento e infecção de células Frhk-4 pelo HAV

As células Frhk-4, permissivas à infecção *in vitro* pelo vírus da hepatite A, foram utilizadas para a produção de todos os estoques virais empregados neste trabalho, como também para os experimentos de titulação viral por imunofluorescência indireta. Para a produção das subculturas, as células foram tratadas com tripsina (1:250, Sigma), enzima proteolítica, que cataliza as reações de quebra da cadeia polipeptídica, e tem a função de promover o desagregamento da monocamada celular (FRESHNEY, 1986; BURLESON et al, 1992). A manutenção da atmosfera de CO₂ a 5% foi importante para manutenção do pH do meio de cultura (que deve permanecer entre 7,2 e 7,4), principalmente no sistema tampão HCO₃/CO₂ empregado neste trabalho. Os frascos de cultura não foram hermeticamente fechados e, portanto, encontraram-se sujeitos à pressão do CO₂ atmosférico. Desta forma, a adição do tampão Hepes auxiliou a estabilização do pH do meio de cultura. A adição do soro fetal bovino (SFB), uma mistura complexa de biomoléculas, incluindo fatores hormonais, no meio de cultura teve o propósito de favorecer o crescimento celular (FRESHNEY, 1986).

O isolamento primário do HAV de espécimes de origem humana ou animal permanece difícil, prolongado e incerto já que não se observa efeito citopático em isolamento primário, mas apenas depois de várias passagens (CROMEANS et al., 1987).

Desde que HAV foi adaptado pela primeira vez em culturas celulares por PROVST e HILLEMANN (1979), o vírus se replica vagarosamente na maioria dos sistemas de cultivo descritos na literatura (DAEMER et al., 1981; BINN et al., 1984; CROMEANS et al., 1987; 1997). Geralmente o HAV não apresenta efeito de modificação citopatogênica em culturas celulares durante o isolamento primário (DE FILIPPIS et al., 1987; SCIPIONI et al., 2000), mas somente depois de várias passagens (DIVIZIA et al., 1986; 1998; FLEHMIG, 1981; VALLBRACHT, 1984).

BINN (1984) relatou estudos de HAV em algumas linhagens celulares, tais como células AGMK (BS-C-1), Frhk-4 entre várias outras, demonstrando através de ensaios de detecção por imunofluorescência e radioimunoensaio que estas eram as linhagens mais permissivas e mesmo assim, ele não observou efeito citopático até a 10^o ou 12^o passagem. Na 5^o passagem, com 14 a 28 dias de inoculação, sem nenhum efeito

citopático, o vírus pode ser detectado pelos dois ensaios citados. Porém a maioria das variantes isoladas de HAV que apresentam um crescimento rápido, alcançam o máximo de infecção em 5 a 6 dias pós-infecção em condições ideais de crescimento *in vitro* (WHEELER et al, 1986).

Neste trabalho o HAV, cepa HM-175 foi adaptado ao cultivo celular durante os primeiros seis meses, através de várias passagens nas culturas de Frhk-4. Inicialmente o vírus não apresentava efeito citopático (ECP) visível ao microscópio óptico. O efeito citopático (ECP) pode ser definido como o dano celular resultante da infecção das células pelos vírus, sendo visualizado ao microscópio óptico através de alterações da morfologia celular, tais como arredondamento de células originalmente fibrosas, formação de vácuolos ou granulocidades celulares, entre outros (WHITE & FENNER, 1992).

A ausência de efeito citopático é característica do HAV, que tende a manter uma infecção persistente nas células *in vitro* (SCIPIONI et al., 2000). A infecção das células ocorreu através da inoculação do fluido viral conforme descrito em materiais e métodos, item 3.3 e as culturas foram mantidas por 10 a 12 dias, período em que começava a ser observada alguma alteração morfológica nas células. O longo período de incubação também causava envelhecimento celular, sendo necessário que as células fossem congeladas e descongeladas, e após centrifugadas como descrito em métodos e o fluido sobrenadante era coletado e utilizado para nova infecção em células jovens. Este procedimento foi repetido, por aproximadamente 10 passagens em culturas celulares até que o vírus HAV passasse a demonstrar após 3 dias, um efeito citopático característico, com granulação citoplasmática e formação de aglomerados de células e destruição completa do tapete após 5 a 6 dias de infecção, como pode ser visualizado na figura 6B.

CROMEANS et al. (1987) relataram o isolamento de um variante citopático de HAV que possui replicação rápida e máximo de produção viral em 2 dias, e que foi lítico para células Frhk-4, permitindo o desenvolvimento de uma análise de placa clássica realizada para HAV, como descrito por DUBBECO & VOGT (1954) para poliovírus, permitindo desta forma a titulação do HAV.

A técnica de imunofluorescência permite a detecção de diversos antígenos, possibilitando o diagnóstico de doenças virais, parasitárias, fúngicas e bacterianas (TORTORA et al, 1997). Nesta reação, um antígeno pode ser detectado através de sua ligação a um anticorpo conjugado a compostos fluorescentes (usualmente isotiocianato de fluoresceína - FITC).

A IFA indireta pode ser utilizada para detectar tanto a presença de antígenos quanto de um anticorpo específico no soro. Um antígeno conhecido é fixado à lâmina de microscópio e o soro é então adicionado. Se o anticorpo (específico contra o microorganismo) estiver presente, haverá reação com o antígeno, formando um complexo. Este complexo pode ser visualizado com a adição de um segundo anticorpo conjugado (anti-anticorpo), dirigido contra o primeiro anticorpo utilizado. Após incubação e lavagens da lâmina (para retirar o que não reagiu, o que não é específico), este é examinado no microscópio de epifluorescência (HARLOW e LANE, 1988).

No presente trabalho, a titulação pelo método de análise de placa foi realizada e pôde-se detectar a formação de focos de infecção característicos de efeito citopático da cepa HAV HM-175. Estes focos mostraram uma coloração mais intensa com o preto de naftaleno, com formação de aglomerados celulares que puderam ser detectados até a diluição 10^{-5} , permitindo a conclusão do título do fluido virai produzido de 10^5 pfu de HAV/ml.

O fluido infeccioso do HAV, produzido de acordo com o item 3.3, foi também titulado através do ensaio de imunofluorescência indireta (item 3.4.1), utilizando o anticorpo monoclonal Mab 8241. De acordo com este ensaio, o título viral foi de 1×10^5 ffu/ml (figura 7).

De maneira geral, na titulação do HAV utilizou-se como primeiro anticorpo, o anticorpo monoclonal comercial Mab 8241 (Chemicon International Inc.), e como segundo anticorpo o anti IgG de camundongo conjugado a FITC. Algumas lavagens foram feitas com solução bloqueadora (PBS +BSA + Tween 20) a fim de bloquear reações inespecíficas. O título do vírus foi fornecido pela contagem do número de células fluorescentes presentes na maior diluição em que as células infectadas ainda ocorreram. O ensaio de titulação para o HAV foi realizado com sucesso empregando imunofluorescência indireta. Fica claro pela figura 7 que o anticorpo monoclonal Mab 8241 apresenta alta especificidade, através da fluorescência citoplasmática das células infectadas pelo HAV, e provoca também coloração de fundo nas células não infectadas.

As células positivas infectadas apresentam fluorescência citoplasmática granular característica e núcleo não fluorescente, como foi previamente descrito por BINN et al. (1984) e DAEMER et al (1981). Como esperado observou-se também uma leve fluorescência de fundo (background), que auxiliou na contagem das células realmente fluorescentes.

A mais alta resistência à inativação por desinfetantes naturais e artificiais (BIZIAGOS et al., 1988) poderia explicar a difusão do HAV no meio ambiente e a possível contaminação da água e alimentos. A detecção de HAV em amostras ambientais e alimentos requer o desenvolvimento de métodos sensíveis e específicos. Para vários enterovírus, a cultura celular representa uma escolha seletiva quando o efeito citopático é evidente. No entanto, como já foi aqui comentado a sensibilidade deste método é inadequada para detectar baixos níveis de HAV nestas amostras (DIVIZIA et al., 1997).

No caso dos moluscos, as análises virológicas são ainda dificultadas devido à toxicidade dos concentrados teciduais em culturas celulares (TRAORE et al., 1998).

Mesmo cientes das dificuldades que poderiam ser enfrentadas, foram realizados os ensaios de citotoxicidade e citopatogenicidade dos extratos de ostras em culturas celulares, para comprovar a viabilidade das partículas virais presentes nos tecidos dos moluscos.

5.2- Estudos de citotoxicidade e citopatogenicidade dos extratos teciduais de ostras

Estes ensaios tiveram como objetivo observar a recuperação do HAV viável e infectante após a preparação dos extratos de ostras inoculadas antes do processo (O.S.) comparando-se com extratos controles (E.C.) infectados após o processo de preparação do extrato, no qual deve representar 100% de recuperação. Pretendeu-se observar a recuperação do vírus através das alterações morfológicas produzidas pelo HAV nas células Frhk-4 e visíveis ao microscópio óptico e comparar com o efeito puramente citotóxico do extrato negativo não semeado com HAV.

O ensaio de citotoxicidade dos extratos teve como objetivo observar a citotoxicidade dos extratos de ostras não semeadas com HAV, preparados a partir de ostras sadias (extrato negativo, item 3.12.2).

O ensaio de citopatogenicidade dos extratos de ostras infectados com HAV foi realizado com o objetivo de comparar os dois extratos de ostras positivos experimentalmente inoculados com HAV: O extrato E.C., que foi inoculado com 6×10^4 pfu de HAV no final do processo de preparação dos extratos e o extrato O.S. no qual foi realizada inoculação artificial das ostras com a mesma quantidade de vírus antes do processamento. Pretendeu-se desta forma verificar a recuperação viral após a preparação

dos extratos e evidenciar o título de vírus viável que foi obtido a partir dos extratos de ostras, que foram capazes de promover infecção das células.

Para os extratos negativos, a partir da diluição 1/32, em 72 horas de incubação começou a ser observado efeito citotóxico, que aumentou gradativamente a cada dia. Em 7 dias de incubação o tapete celular já se apresentava bastante danificado e estava completamente destruído em 10 dias de incubação.

Para o controle viral, realizado conforme item 3.18, apenas com fluido viral diluído em meio de cultura de infecção, a partir da diluição 1/32, igual aos extratos, o efeito citopático característico do HAV começou a ser observado após 5 dias de infecção, ou seja, no mesmo período em que os extratos negativos apresentavam citotoxicidade. Sendo assim não foi possível a observação do efeito citopático do vírus nos extratos semeados pois no quinto dia de incubação as células já estavam morrendo devido ao efeito citotóxico dos extratos. Desta forma, descartou-se a possibilidade de utilização de cultura celular para verificar a recuperação do HAV a partir dos extratos teciduais de ostras.

5.3- Extração do RNA de fluido de células infectadas e ensaios de RT-PCR

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar metodologias de detecção do HAV por RT-PCR em ostras experimentalmente inoculadas, visando aplicar estas metodologias para análise de ostras produzidas em Santa Catarina. Com o desenvolvimento do trabalho foram sendo introduzidas modificações nos protocolos iniciais para melhorar a sensibilidade e positividade da detecção por RT-PCR. Cada alteração realizada no protocolo de RT-PCR inicial (protocolo A, item 3.6.1.1), foi apresentada nos materiais e métodos como um novo protocolo, até chegar-se aos protocolos C e D (item 3.6.1.3), cujas reações de PCR foram realizadas com os reagentes Super Mix[®] (Gibco) e Platinum Super Mix[®] (Gibco) respectivamente. Utilizando-se estes protocolos para detecção de 44 controles positivos de extratos O.S, realizados para as amostras de campo, obtivemos sucesso em 93% dos controles, detectando o fragmento específico de HAV com apenas uma reação de PCR.

Trabalhos encontrados na literatura não observaram o produto específico utilizando apenas uma reação de amplificação para RNA viral obtido de extratos de ostras e utilizaram estratégias de hibridização com sondas moleculares específicas (SCHWAB et

al., 1995) ou nested - PCR para detecção do HAV (CROCI et al., 1999). Estes trabalhos no entanto, utilizaram PEG 8000, na preparação dos extratos teciduais de ostras que, segundo um estudo realizado TRAORE et al., (1998), mostrou-se menos eficiente do que o PEG 6000 na recuperação do HAV de extratos de ostras inoculadas.

Os trabalhos iniciais de padronização da técnica de RT-PCR foram realizados com RNA viral isolado de fluido de células Frhk-4 infectadas. Em seguida, a padronização das técnicas foi desenvolvida para amostras de RNA obtidas de extratos de ostras.

Para extração do RNA viral a partir de fluidos celulares, foram utilizadas duas técnicas de isolamento descritas no item 3.5.: a clássica, que emprega fenol-clorofórmio e o método que utiliza o reagente comercial Trizol[®] (GibcoBRL) que consiste de uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina.

O TRIZOL[®] é um reagente comercial pronto para o uso no isolamento de RNA total de amostras líquidas de origem humana, animal, vegetal, bacteriana e virai. Durante homogeneização da amostra ou lise, o reagente de Trizol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. Adição de clorofórmio seguida pela centrifugação, separa a solução em uma fase aquosa e uma fase orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Depois de transferir a fase aquosa, o RNA é recuperado pela precipitação com álcool isopropílico e subsequente precipitação com etanol.

Com o objetivo de impedir a contaminação por RNAses, foi indispensável o uso de luvas durante a realização de todos os procedimentos, bem como de materiais novos e autoclavados. O uso de ponteiras com barreira novas e estéreis garantiu que não houvesse "contaminação cruzada" de material genético evitando assim a ocorrência de resultados falso-positivos, e diminuiu o risco de contaminação por RNAses provenientes das pipetas. Os reagentes destinados às reações de RT e PCR foram mantidos a -20°C. Durante todo o procedimento, a mistura de PCR foi mantida permanentemente em gelo, assim como as amostras. As análises dos produtos das reações de PCR foram realizadas num terceiro ambiente físico distinto dos demais.

Em todas as análises foram realizados também controles negativos e controles positivos das reações. Os controles positivos foram essenciais para mostrar que nenhuma RNase ou outro contaminante estava inibindo a reação de amplificação e fornecendo resultados falso-negativos. Os controles negativos foram realizados para mostrar que as amplificações não eram resultado de contaminações cruzadas (resultados falso-positivos) (ARNAL et al., 1999).

O RNA viral obtido a partir dos fluidos infecciosos foi quantificado espectrofotometricamente através da leitura da densidade ótica (D.O.) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm, simultaneamente. O valor da D.O. a 260 nm fornece a concentração de ácidos nucleicos da amostra, sendo definido que amostras de RNA com densidade ótica igual a 1 (1 unidade de absorvância) possuem concentração de RNA equivalente a 40 µg/mL (SAMBROOK et al, 1989). As impurezas protéicas são calculadas pela razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm, através da qual mede-se a taxa de pureza da amostra. Para amostras puras de RNA, o valor esperado seria próximo de 2,0, sendo que desvios dessa ordem correspondem à presença de impurezas na amostra (SAMBROOK et al, 1989). A razão encontrada nas dosagens realizadas foi de 1,5 para os dois métodos de extração, indicando um grau de pureza aceitável do material genético viral obtido.

Com a finalidade de verificar qual método de isolamento de RNA viral mostrou-se mais eficaz, as amostras de RNA foram analisadas juntamente com os ensaios de limite de sensibilidade de detecção do RNA e curva de concentrações de MgCl₂ nas reações de RT-PCR.

Sendo o genoma do HAV constituído por RNA em fita simples, fez-se necessário realizar a reação de transcrição reversa do RNA a DNA complementar (cDNA). Para esta reação é imprescindível a adição do inibidor de RNAses, visto a extrema sensibilidade do material genético de HAV à degradação por estas enzimas (LEES, 2000)

Neste trabalho, a reação de transcrição reversa do RNA foi realizada em condições salinas fornecidas pelo tampão comercial de reação da enzima MLV-RT (Gibco) cuja concentração de MgCl₂ foi de 3,0mM. Propusemo-nos então a definir a concentração ideal de MgCl₂ na reação de PCR.

A influência da concentração dos íons Mg²⁺ ocorre em diversas etapas da reação de PCR, tais como anelamento dos iniciadores, especificidade dos produtos, temperatura de dissociação das fitas, formação de dímeros de iniciadores, atividade e especificidade das enzimas, que requerem cátions divalentes. Altas concentrações desse íon podem promover ampliações inespecíficas, resultando numa baixa especificidade de reação, enquanto que pequenas concentrações podem resultar em pouca eficiência (SAMBROOK et al, 1989; PERSING, 1993; SIMMONDS, 1995).

Os resultados dos ensaios de padronização das concentrações ideais de MgCl₂ para amostras de RNA obtido de fluido viral, são mostrados nas figuras 9, para o protocolo A (tradicional), e 10 (A e B), para o protocolo B (Super Mix). Para o protocolo A,

as concentrações de 1,5; 2,5 e 3,0mM de $MgCl_2$ na reação de PCR foram as mais eficientes e apresentaram intensidades semelhantes no produto amplificado em primeira reação de PCR. O segundo PCR, realizado com as mesmas concentrações de $MgCl_2$, não melhorou a amplificação. Para o protocolo B, item 3.6.1.2, o melhor resultado de amplificação foi demonstrado com 2,5mM de $MgCl_2$, tanto em primeiro, quanto em segundo PCR. Alguns trabalhos realizados com HAV utilizam o nested RT-PCR, realizando a primeira reação de amplificação gênica e ainda uma segunda reação de nested PCR, com um segundo par de iniciadores mais internos (GRAFF et al., 1993; BARARDI et al., 1999; CROCI et al., 1999). Estes trabalhos, no entanto não conseguiram observar produtos de amplificação em primeiro PCR para amostras de moluscos e o nested PCR foi utilizado para aumentar a sensibilidade da detecção.

ATMAR et al. (1995) obteve sensibilidade para detecção de HAV por RT-PCR de 100 pfu. Em seu trabalho e também no estudo realizado por CROCI et al., 1999, toda a mistura de reação de cDNA foi acrescentada à mistura de 1ºPCR, o que provavelmente manteve os inibidores contidos na reação de transcrição reversa, provenientes do RNA de extratos teciduais de moluscos (SCHWAB et al., 1995).

No presente trabalho, não foi necessário realizar um nested PCR porque os produtos de amplificação puderam ser observados em primeiro PCR, com limites de sensibilidade eficientes (5,0 pfu para os extratos O.S e E.C, com o protocolo C).

A curva de concentrações ideais de $MgCl_2$ também foi realizada para extratos de ostras e pela figura 11 observamos que apenas a concentração de 3,0mM de $MgCl_2$ na reação de PCR apresentou um produto de amplificação de intensidade tão forte quanto o controle de RNA de fluido viral. A amplificação utilizando a concentração de 2,5mM de $MgCl_2$ foi tão fraca que não pode ser visualizada na fotografia e para as outras concentrações de 1,5 e 2,0mM não foi observado produto de PCR.

Esta diferença em relação à amplificação do RNA de fluido que amplificou com todas as concentrações de $MgCl_2$ embora com diferentes intensidades, ocorreu possivelmente porque a reação RT-PCR ficou limitada pela presença de inibidores tais como várias proteínas, carboidratos, e outros compostos orgânicos presentes na carne das ostras utilizadas. Estes inibidores podem ter funcionado como quelantes de íons magnésio, cofatores essenciais requeridos pelas polimerases sendo que alguns solutos também podem ter sido tóxicos para as polimerases (SCHWAB., 1995).

Após ter sido definida a concentração ideal de $MgCl_2$, para os protocolos de RT-PCR A (tradicional) e B (PCR Super Mix[®]), que utilizaram RNA viral obtido através das

duas diferentes técnicas de isolamento: extração com fenol-clorofórmio e extração com Trizol[®], estes protocolos foram comparados através dos ensaios de limite de sensibilidade, item 3.6.4. Cada protocolo foi realizado contendo a concentração ideal de MgCl₂ pré-definida e ambos foram testados com o par de iniciadores HAV-CL e HAV-CR.

O protocolo A, é o protocolo tradicional, em que a mistura de reação de PCR é preparada no laboratório o que demanda um certo tempo e os extremos cuidados já mencionados para a preparação da reação de RT-PCR. O protocolo B é realizado com a mistura de reação comercial PCR Super Mix[®] que já contém todos os componentes necessários à reação de PCR, inclusive a enzima *Taq polimerase*, precisando apenas adicionar os iniciadores específicos, o cDNA produzido na reação de transcrição reversa e acertar a concentração ideal de MgCl₂. Assim esta mistura economiza tempo, abrevia a manipulação de reagentes, diminuindo o risco de contaminação durante o preparo e evita desperdício de reagentes como a enzima *Taq polimerase*, viabilizando a realização de um número maior de amostras, sem ser mais cara.

O limite mínimo de sensibilidade para detecção de RNA de HAV, na reação de RT-PCR utilizando tanto o Protocolo A, como o protocolo B foi de 19,5ffu de HAV. Os resultados destes ensaios são apresentados nas figuras 14 e 15, mostrando que ambos os protocolos foram igualmente efetivos e mostraram idêntica sensibilidade. Novamente o segundo PCR não apresentou melhora da amplificação, ao contrário, os produtos de amplificação foram mais fracos e o limite de detecção foi igual ao primeiro PCR (figura 15B). Através deste ensaio ficou claro que não era necessário realizar uma segunda reação de amplificação gênica para RNA de HAV extraído de fluido viral, pois não ocorreu melhora da amplificação, pelo menos com a estratégia aqui empregada.

Assim, já que a mesma sensibilidade foi observada para os dois métodos, a mistura de reação PCR Super Mix[®] foi adotada para os ensaios seguintes de RT-PCR.

O HAV possui genoma bastante conservado, sendo que as diferentes cepas do vírus no mundo inteiro correspondem a um único sorotipo. Estudos realizados por GOSWAMI et al. (1993 e 1996) e ROBERTSON et al. (1992) demonstraram que diferentes cepas de HAV humano possuem homologia marcante de sequência gênica excedendo a 92%. Por esta razão, é extremamente difícil prever sequências nucleotídicas divergentes entre diferentes cepas de HAV isoladas do meio ambiente. Desta forma um grande número de iniciadores gênicos para PCR tem sido propostos diretamente para detecção específica do mesmo sorotipo (LEES, 2000; BIRKENMEYER & MUSHAHWAR, 1994).

Na etapa seguinte do trabalho, foi testado um outro par de iniciadores que posteriormente poderiam ser utilizados em um método multiplex de detecção simultânea para HAV, RV e PV, utilizando um mesmo programa de amplificação. Foi realizado o protocolo C de RT-PCR para detecção de HAV, que também utiliza o reagente PCR Super Mix[®] e difere do protocolo B por utilizar um par diferente de iniciadores (HAV-R e HAV-L) (SCHWAB et al., 1991, 1995; TSAI et al., 1994; CHUNG et al., 1996), descritos no item 3.6. Foram realizados ensaios para estes iniciadores a fim de definir a concentração ideal dos mesmos a ser utilizada nas reações de PCR. A reação de amplificação foi realizada na presença de 2,5mM de MgCl₂, concentração ideal encontrada no ensaio anterior utilizando a mistura de reação PCR Super Mix[®], e RNA extraído com Trizol[®].

A concentração ideal de iniciadores para a reação de RT-PCR, é uma importante variável a ser determinada pois, quando presentes em concentrações excessivas, eles podem favorecer anelamentos inespecíficos e ainda interagir entre si, formando os "dímeros", que competem pela amplificação do produto desejado, resultando numa baixa eficiência de reação (SAMBROOK et al., 1989; INNIS & GELFAND, 1990; PERSING, 1993; SIMMONDS, 1995).

O resultado do ensaio da curva de iniciadores para RNA de fluido viral, é mostrado na figura 12, onde observa-se que, para as concentrações de 100, 75 e 50 pmoles, aparece uma mancha abaixo do produto amplificado que provavelmente corresponde a excesso de iniciadores que não foram utilizados na amplificação. Utilizando-se as concentrações de 40 e 30 pmoles, o produto amplificado apresentou forte intensidade e a mancha referente ao excesso de iniciadores não é visualizada. A concentração limite foi 20 pmoles, que ainda apresentou amplificação, porém bem fraca. A concentração de 30 pmoles ficou então definida como a ideal para as reações de RT-PCR com os iniciadores HAV-R e HAV-L, para RNA de fluido.

O passo seguinte foi realizar os ensaios de limite de sensibilidade para o protocolo C que pode ser visualizado na figura 16A, mostrando um limite de detecção de 3,5 pfu de HAV. Os protocolos de RT-PCR, que utilizam o reagente PCR Super Mix[®] (protocolos B e C, itens 3.6.1.2 e 3.6.1.3), utilizando os dois diferentes pares de iniciadores específicos para HAV descritos no item 3.7 e seus respectivos programas de amplificação, apresentaram portanto diferentes limites de sensibilidade, e este resultado sugeriu que o protocolo C foi mais sensível do que o protocolo B. Ficou então definido o uso dos iniciadores HAV-R e HAV-L para os ensaios seguintes de RT-PCR.

A reação de PCR foi testada também com a mistura comercial de reação "Platinum Super Mix[®]" (Gibco BRL), protocolo D, conforme as especificações do fabricante a fim de testar sua eficiência com relação a Super Mix[®]. Esta mistura de reação difere da "Super Mix[®]" por conter a enzima *Taq Polimerase* ligada a um anticorpo monoclonal bloqueando seu sítio de reação. Este anticorpo desliga-se da enzima à temperatura de 80°C ou mais, tomando a reação mais específica e mais eficiente, segundo dados do fabricante (Gibco BRL).

Os resultados podem ser visualizados na figura 16A (protocolo C) e 16B (protocolo D). Em ambos os protocolos, uma única reação de PCR foi realizada, e o limite de detecção encontrado para ambos foi 3,5 pfu de HAV. A diferença observada foi que a partir do título viral de 78 pfu de HAV, na reação com Platinum Super Mix[®] os produtos de amplificação apresentaram melhor visualização.

Através destes ensaios ficou concluída a padronização de RT-PCR para detecção de RNA de HAV extraído de fluido viral, ficando definido o uso do segundo par de iniciadores nos protocolos C e D, a concentração ideal de 2,5mM de MgCl₂ na reação assim como a concentração ideal de 30 pmoles para os iniciadores HAV-R e HAV-L. Assim os protocolos C ou D foram utilizados nos ensaios de padronização para detecção de RNA obtido a partir dos extratos de ostras.

As mesmas condições de RT-PCR padronizadas para HAV, realizado segundo o protocolo C, específico, utilizando transcrição reversa do RNA viral, seguida da reação de amplificação gênica utilizando o reagente PCR Super Mix[®], foram aplicadas para detecção de Poliovírus (PV) e Rotavírus (RV) sendo ainda realizado um Protocolo Triplex para amplificação simultânea de HAV, RV e PV. Estes ensaios tiveram como objetivo desenvolver um método rápido, eficiente e mais econômico para a detecção simultânea de três vírus clinicamente importantes transmitidos via água ou moluscos e fazer a comparação entre as metodologias de RT-PCR multiplex X RT-PCR específico para a detecção viral em ostras. A RT-PCR multiplex já foi aplicada para detecção viral em águas de oceano e esgotos por TSAI et al (1994), e sugerida para alimentos por ROSENFELD e JAYKUS (1999). Foi também utilizada para detecção de adenovírus e enterovírus em amostras de água por CHO et al. (2000).

Na figura 21 observa-se três produtos distintos de amplificação, representando HAV (192pb), RV (278pb) e PV (394pb), mostrando que os protocolos de RT-PCR específicos e o protocolo triplex n°1 foram eficientes para a detecção dos três vírus, de forma individual (linhas 3, 4 e 5) e simultânea (linhas 6, 7 e 8).

Para o protocolo triplex, o melhor resultado de amplificação foi observado utilizando 8µl de cDNA na reação de PCR.

5.4- Ensaios de RT-PCR para detecção de RNA obtido dos extratos tissulares de ostras

O primeiro passo a ser realizado quando a finalidade é a detecção de vírus em moluscos é a preparação de um extrato (homogeneizado) a partir dos tecidos do animal, que deve resultar em boa recuperação viral.

Os vírus podem ser efetivamente extraídos e concentrados da carne de ostras pelo uso de um procedimento de concentração viral por precipitação com polietilenoglicol (PEG) associado a um procedimento de extração, como foi demonstrado por LEWIS & METCALF (1988).

Neste trabalho, as amostras semeadas com os vírus foram processadas por um método de adsorção-eluição-precipitação viral (JAYKUS & DIX, 1998; BARARDI et al, 1999) visando extrair as partículas virais da carne do molusco e concentrar a amostra num pequeno volume. A eluição alcalina direta em tampão glicina (pH 9 a 10) é rápida e comumente utilizada por vários pesquisadores (CROMEANS et al., 1997; SHIEH et al., 1999). O uso de triptose fosfato para eluição viral de tecidos de ostras foi adotado por ser um eluente simples capaz de alcançar um bom índice na recuperação de HAV (LEWIS & METCALF, 1988). Neste caso, os vírus podem ser separados dos sólidos presentes nos extratos tissulares dos moluscos quando as concentrações salinas e o pH são controlados (SOBSEY et al., 1978).

A precipitação com PEG foi utilizada por ser um método efetivo de concentração que aumenta a probabilidade de detectar vírus humanos patogênicos em amostras ambientais. Entre as vantagens apresentadas estão incluídas a facilidade de precipitação a pH neutro e alta concentração iônica, bem como a ausência de outros materiais orgânicos. PEG é um polímero sintético quimicamente inerte, não tóxico, solúvel em água que é utilizado para precipitar proteínas. Dois mecanismos buscam comprovar este efeito. O primeiro mecanismo compara a ação do PEG a de um "solvente inerte" que estericamente retira proteínas de um segundo solvente, e efetivamente aumenta a sua concentração até que a sua solubilidade é excedida e a precipitação ocorre. A dinâmica deste processo é semelhante ao *salting out*, e a formação do precipitado pode ser afetada por alguns fatores, como tamanho da proteína, concentração, carga, e força iônica inicial

do soluto. O segundo mecanismo enfatiza a importância da carga da proteína. Neste caso, a carga superficial da proteína produz um desfavorável efeito termodinâmico no PEG solubilizado. Serão mais facilmente precipitadas as proteínas hidrofóbicas ou altamente carregadas (LEWIS & METCALF, 1988).

O PEG promove a precipitação dos vírus e é um ponto chave na preparação dos extratos, pois disso depende a eficiência do método de recuperação viral.

No início os experimentos de preparação de extratos de ostras inoculadas com HAV (OS) e extratos controles EC foram realizados utilizando-se PEG 8000 (SHWAB et al., 1995), que era o polímero disponível no laboratório. No entanto, quando realizada detecção por RT-PCR, protocolo C (Super Mix), o produto específico para HAV era fracamente amplificado e apenas a primeira diluição do RNA viral do extrato O.S., correspondendo a 50 pfu de HAV, era visualizada (Figura 8A). Este reagente foi utilizado também para preparação de extratos de ostras inoculadas com RV e PV, separadamente e os produtos de amplificação para RV (900 ffu) e PV (300 pfu) são também visualizados na Figura 17A. SANTOS (2000) encontrou um limite de sensibilidade para RV de 0,15pfu utilizando PEG 8000.

O resultado de amplificação fraca para HAV, detectando no mínimo 50pfu de HAV, se repetiu por vários experimentos no extrato O.S, enquanto que para o extrato E.C, controle que representou 100% de recuperação viral, o limite mínimo de detecção foi de 5,0pfu utilizando também detecção pelo protocolo C de RT-PCR (Figura 18A), o que representava recuperação de HAV de apenas 10% quando PEG 8000 foi utilizado na preparação dos extratos.

Um trabalho de recuperação viral realizado por TRAORE et al. (1998), utilizando diferentes métodos de concentração e extração viral a partir de moluscos, mostrou que a recuperação de HAV utilizando tampão glicina em pH alcalino e PEG 6000 foi muito mais eficiente do que utilizando PEG 8000, sendo que foi encontrado recuperação viral de 67% e 33% respectivamente para cada polímero. Para poliovírus esta recuperação foi de 79% e 92% respectivamente. LEWIS & METCALF (1988) utilizaram PEG 6000 na preparação de extratos teciduais de ostras semeadas com HAV e rotavírus SA11 e obtiveram recuperação de 97% para ambos os vírus.

Foram realizados então experimentos utilizando-se PEG 6000 na preparação dos extratos e o produto de amplificação para HAV foi muito mais intenso, com limite de mínimo de detecção no extrato O.S de 5,0 pfu, utilizando o protocolo C de amplificação (Figura 19A). Os limites de sensibilidade, que serão discutidos mais adiante, para os

extratos E.C. e O.S (Figuras 18 e 19) mostraram que a recuperação do HAV, utilizando PEG 6000 na preparação dos extratos e RT-PCR, para o protocolo D (Platinum Super Mix[®]), foi de 75,7%, semelhante a recuperação encontrada por TRAORE et al (1998). Quando a detecção foi realizada através do protocolo C de RT-PCR, o limite de sensibilidade para ambos os extratos foi de 5,0pfu, o que correspondeu a 100% de recuperação viral. Na figura 8B observa-se que os produtos amplificados específicos para HAV (50pfu), RV (900ffu) e PV (300pfu), apresentaram boa intensidade para visualização. Com estes experimentos ficou definido o uso de PEG 6000 para preparação dos extratos de ostras.

Os protocolos de extração de ácidos nucléicos visam principalmente a remoção de inibidores da reação de RT-PCR. Quando um método de extração deve ser escolhido, dois parâmetros tem que ser considerados: a recuperação do material viral e a eliminação ou inativação de substâncias inibidoras (ARNAL et al., 1999).

Os métodos de extração de ácidos nucléicos a partir de tecidos de moluscos consistem basicamente em dois tipos: métodos onde não ocorre a concentração viral, nos quais a extração viral é feita diretamente a partir dos tecidos do molusco com éter etílico, clorofórmio ou Freon, e métodos que envolvem concentração viral prévia. Este último consta de etapas consecutivas onde os vírus são isolados dos tecidos do molusco e, posteriormente, concentrados num pequeno volume (BOUCHRITI and GOYAL, 1993).

O procedimento final de extração do RNA total é indispensável para a detecção dos vírus presentes em amostras experimentais com uma remoção efetiva de inibidores e concentração extensiva do volume final.

O método de extração de RNA de extratos de ostras estabelecido neste trabalho foi o que utiliza fenol-clorofórmio, seguindo a purificação com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (SHIEH et al., 1999; ARNAL et al., 1999). Através de processos químicos baseados no efeito do detergente catiônico brometo de cetiltrimetilamônio têm sido possível a eliminação de polissacarídeos presentes nos tecidos dos moluscos (ZHOU et al., 1991; JIANG et al., 1992; STRAUB et al., 1994). Nesta metodologia, o emprego prévio do Freon 113 (triclorotrifluoroetano, Aldrich), tem importante papel em remover substâncias inibidoras, como lipídios (SCHWAB et al., 1999), além de agente clarificante. O CTAB em alta concentração de sais, em conjunto com a extração fenol-clorofórmio ajuda a obter RNA relativamente puro na fase aquosa, e também reduz significativamente a quantidade de inibidores presentes, permitindo a detecção de pequenas quantidades de ácido nucléico viral, com índices de 92% de sucesso na detecção (ARNAL et al., 1999).

O método de extração utilizado para os extratos de ostras isola RNA total presente na amostra, não sendo vírus-específico e portanto, ao final do procedimento é obtido RNA das células da ostra e de qualquer vírus de RNA presente na amostra, assim o mesmo RNA total pode ser utilizado para detecção de várias cepas virais de genoma RNA (LE GUYADER et al., 2000). Este dado contudo não interfere na reação de PCR, visto a sua especificidade.

A composição bioquímica dos tecidos dos moluscos varia em diferentes ambientes e estações do ano. Um estudo realizado por LEES et al. (1994) mostrou que os níveis de inibidores de PCR em ostras coletadas de águas poluídas diferem dos níveis de ostras que foram depuradas.

A remoção de inibidores da amplificação por PCR é o principal fator afetando o sucesso da aplicação da reação de RT-PCR para moluscos, sendo que a remoção inadequada dos inibidores pode conduzir a reações falso-negativas. O uso de padrões internos de RNA viral foram propostos (ATMAR et al., 1995; NAIRN et al., 1995; ARNAL et al., 1998) e estes deveriam ajudar na interpretação dos resultados. Padrões internos podem ainda ser úteis também para outro aspecto problemático do PCR, que é a falta de quantificação, através do desenvolvimento de um PCR competitivo. Contudo, tais padrões não estão ainda prontamente disponíveis para todos os vírus entéricos e cepas de interesse (LEES, 2000).

Através da figura 11 ficou comprovado que a concentração de 3,0mM é a ideal para a realização das reações de RT-PCR para amplificação de RNA HAV de extratos de ostras, já que o produto amplificado possui intensidade idêntica ao controle positivo.

Dada a divergência de resultados ideais de $MgCl_2$ para os RNAs extraídos de fluidos infecciosos e extratos de ostras, o ensaio da curva de iniciadores HAV-R e HAV-L também foi realizado conforme descrito no item 3.14.2, utilizando o protocolo C, PCR Super Mix[®] (item 3.6.1.3), para a definição da concentração ideal dos mesmos para detecção do HAV extraído de extratos controles (EC).

Através destes experimentos ficou definida a concentração de 50 pmoles como ideal, pois não foi observada banda de excesso de iniciadores, e não apareceram as bandas inespecíficas, observadas nas concentrações de 40 e 30pmoles. Este resultado diferiu do resultado encontrado para RNA de fluido, em que não apareceram bandas inespecíficas e que apresentou amplificação fraca até 20 pmoles, provavelmente porque o RNA extraído de fluido é muito mais puro e não apresenta substâncias interferentes encontradas no RNA dos extratos teciduais de ostras, já comentadas anteriormente.

Através dos ensaios de limites de sensibilidade foi determinada a maior diluição em que ainda ocorre a visualização dos produtos de PCR, e para estes ensaios foram efetuadas diluições seriadas dos RNAs obtidos dos extratos de ostras, conforme descrito no item 3.14.3.

Estes ensaios foram realizados tanto para extratos controles EC (Figura 18), quanto para extratos OS (Figura 19), conforme descrito nos itens 3.14.3.1 e 3.14.3.2 respectivamente e tiveram como objetivo avaliar a sensibilidade do ensaio de amplificação gênica para detecção do HAV a partir de ostras inoculadas experimentalmente (extrato O.S.), e comparar com a detecção e recuperação de HAV no extrato controle E.C.

O extrato controle EC, semeado no final do procedimento de preparação do extrato correspondeu a um controle de 100% de recuperação viral.

O extrato OS correspondeu ao extrato de ostras experimentalmente inoculadas antes do procedimento de preparação do extrato (item 3.12.1), sendo que foi utilizada a mesma quantidade de vírus do extrato EC. Os ensaios de limite de sensibilidade realizado para ambos os extratos, permitem avaliar a perda viral durante o procedimento de preparação destes e definir o limite de sensibilidade da reação de RT-PCR para detecção viral. Para ambos os extratos foram utilizados os dois protocolos de amplificação C e D (item 3.6.1.3).

Os resultados obtidos para diluições do RNA de extratos controles E.C. são visualizados na figura 18. Utilizando o protocolo C de RT-PCR (figura 18 A), a banda de 192pb específica para HAV foi observada até o título 5,0 pfu de HAV, sendo este o limite de sensibilidade. Podem ser observadas também bandas inespecíficas nas linhas correspondentes aos títulos virais de 12,5; 6,25 e 5,0 pfu de HAV.

Utilizando o protocolo D, Platinum Super Mix, o limite de sensibilidade foi de 2,5 pfu HAV, até onde foi observada a banda específica (Figura 18B). As bandas inespecíficas também apareceram neste ensaio, nas linhas correspondentes a 5,0; 3,3 e 2,5 pfu de HAV. Estas bandas inespecíficas apareceram também em controles negativos de ostras, demonstrando que elas não correspondem a amplificação de alguma outra sequência do HAV, e sugerindo que os iniciadores provavelmente se anelam em alguma sequência do próprio ácido nucléico dos tecidos das ostras. O produto de amplificação de 192 pb mostrou-se específico para as amostras inoculadas com HAV pois nunca foi observado nos controles negativos. Assim as amostras e diluições que apresentaram a banda de 192pb foram consideradas positivas para HAV.

O aparecimento de bandas inespecíficas também foi observado no trabalho realizado por TSAI et al. (1994). GREENING, WOODFIELD & LEWIS (1999) obtiveram inúmeras bandas inespecíficas na detecção de enterovírus por RT-PCR e confirmaram a natureza do produto específico de amplificação através de hibridização em ELISA quimioluminescente.

O resultado do ensaio de limite de sensibilidade para RNA obtido de extratos de ostras semeadas (OS) pode ser visualizado na figura 19.

Utilizando o protocolo C, Super Mix, (Fig. 19A), o limite de sensibilidade foi de 5pfu de HAV. Neste ensaio não apareceram bandas inespecíficas. Avaliando-se a recuperação viral em relação ao extrato E.C., que apresentou o mesmo limite de sensibilidade com o mesmo protocolo C, a recuperação foi de 100%.

No entanto, quando foi realizado o protocolo D (figura 19B), o limite de sensibilidade para o extrato OS foi de 3,3pfu de HAV e comparando-se com o extrato EC, este apresentou limite de sensibilidade de 2,5pfu HAV com o mesmo protocolo D, representando uma recuperação viral de 75,7%.

Com os mesmos objetivos já definidos para os RNAs isolados de fluidos infecciosos de HAV, foram realizados RT-PCRs específicos e triplex para detecção de RNA HAV, RV e PV obtidos a partir de extratos controles (EC) e extratos de ostras semeadas (OS).

Os resultados apresentados nas figuras 22 e 23 demonstraram a impossibilidade de detecção simultânea dos três vírus quando os extratos de ostras foram utilizados, ao contrário dos dados obtidos com os RNAs isolados a partir de fluidos infecciosos virais.

Em OS, o produto de PCR foi somente observado quando o cDNA foi realizado separadamente com o iniciador específico HAVC-R para HAV, iniciadores randômicos + END 9 para RV e iniciadores randômicos para PV e PCRs específicos.

Estes resultados podem ser provavelmente atribuídos à menor concentração de RNA viral que pode ter sido parcialmente perdido durante a preparação dos extratos SHIEH et al; (1999) e TRAORE et al, (1998) descreveram dificuldades no isolamento e identificação etiológica do agente viral em surtos envolvendo moluscos, devido à recuperação ineficiente durante o processamento, baixo nível de contaminação e alta concentração de inibidores da reação de PCR em tecidos de ostras.

Apesar do método multiplex não ter sido eficiente para detectar os três vírus ao mesmo tempo em amostras de ostras, este estudo mostrou que exatamente a mesma metodologia de RT-PCR pode ser aplicada com sucesso para detecção de cada vírus utilizando-se os iniciadores específicos, sendo que trabalhos anteriores utilizavam duas reações de PCR (BARARDI et al, 1999; CROCI, L., 1999). No RT-PCR específico aqui descrito, é necessária a realização de apenas uma reação de PCR para visualização do produto de amplificação, sendo que o mesmo programa de RT-PCR pode ser utilizado para os três vírus, com redução de tempo e custos, facilitando a aplicação desta metodologia para análise de rotina das ostras que são produzidas para consumo e comercialização.

5.5- Amostras de campo

Os métodos moleculares de detecção por RT-PCR específico para HAV padronizados neste trabalho, foram aplicados para acessar a contaminação viral em quatro locais de cultivo de ostras da grande Florianópolis por um período de um ano.

As amostras de campo foram analisadas pela técnica de RT-PCR específico para HAV, através dos protocolos C (Super Mix) ou D (Platinum Super Mix), devidamente padronizada neste trabalho para detecção de HAV em RNA total obtido a partir dos extratos teciduais de ostras.

BOUCHRITI & GOYAL (1993) afirmam que um método ideal deve ser rápido, simples e que permita uma recuperação viral alta e eficiente. Os autores também destacam que uma revisão das metodologias existentes demonstrou que nenhuma delas é igualmente efetiva para produtos marinhos de diferentes lugares geográficos, sugerindo que os ensaios devem ser previamente realizados em condições laboratoriais, antes de serem aplicados para amostras de campo. O tipo de inibidores enzimáticos pode diferir com a espécie do molusco, potencialmente restringindo o uso de alguns métodos para uma única espécie.

Durante as análises, foram realizados controles negativos e para cada mês e local de coleta foi realizado um controle positivo de HAV, utilizando-se uma das amostras coletadas a qual foi semeada com o vírus. Este procedimento é importante porque o tipo e concentração de inibidores enzimáticos pode diferir de acordo com a estação do ano e

localização geográfica em que foi realizada a coleta (HURST et al., 1997). Ao todo foram realizados 44 controles positivos, que apresentaram sucesso em 93% das análises.

Ao todo foram analisadas 132 amostras de campo, supostamente negativas a menos que estivessem contaminadas com o vírus no ambiente. No sítio 2 foram encontradas amostras positivas para HAV durante três meses: 3 amostras em abril, 2 amostras em junho e 1 em setembro de 1999, no mesmo local de cultivo. Para este local foram analisadas 27 amostras e destas 6 foram positivas, correspondendo a 22% do total. Nestes meses, as temperaturas são mais amenas em abril e setembro e mais frias em junho, o que favorece a estabilidade do vírus por causa das baixas temperaturas. Sendo que a contaminação por HAV de amostras ambientais é mais comumente observada nos meses mais frios (MBITHI et al., 1986). Nesta época do ano as ostras também estão mais saudáveis e permissivas à infecção. Além disso, este local apresenta a característica de mar com águas calmas, paradas e saneamento básico deficiente na região.

Este resultado demonstrou que através dos métodos moleculares e RT-PCR específico para HAV, devidamente padronizados neste trabalho é possível detectar a contaminação viral nas amostras de campo de ostras *Crassostrea gigas*. Desta forma, o trabalho atingiu plenamente seu objetivo, demonstrando que os métodos moleculares padronizados para HAV podem ser aplicados para análise das ostras produzidas em Santa Catarina.

6- CONCLUSÕES

✓ O fluido infeccioso do HAV produzido neste trabalho apresentou-se com alto efeito citopático em células Frhk-4, sendo titulado com sucesso pelas técnicas de titulação por imunofluorescência e análise de formação de placas apresentando título viral de 10^5 pfu/ ml ou 10^5 ffu/ ml.

✓ Os métodos moleculares para detecção do HAV por RT-PCR, utilizando reagentes Super Mix ou Platinum Super Mix (protocolos C ou D) foram devidamente padronizados para detecção do vírus em ostras da espécie *Crassostrea gigas*.

✓ Neste trabalho foi necessário a realização de apenas uma reação de PCR para visualização dos produtos de amplificação na análise por eletroforese, para RNA viral isolado tanto de fluido de células infectadas quanto de extratos tissulares de ostras

✓ Os limites de sensibilidade, utilizando os protocolos C e D respectivamente foram:

- RNA extraído de fluido viral: 3,5 pfu de HAV para ambos os protocolos.
- RNA de extrato controle EC, inoculado com HAV no final do processo de preparação do extrato: 5,0 e 2,5 pfu de HAV
- RNA de extrato O.S, ostra inoculada no início do processo antes da preparação do extrato: 5,0 e 3,3 pfu de HAV

✓ Comparando-se os resultados experimentais obtidos para os protocolos C e D, o protocolo D apresentou-se mais sensível com diferença em relação ao protocolo C de uma diluição.

✓ A recuperação viral para HAV, utilizando PEG 6000 na preparação dos extratos foi de 100% quando a detecção foi realizada através do protocolo C, Super Mix e foi de 75,7% quando a detecção foi realizada através do protocolo D, Platinum Super Mix.

✓ O Protocolo RT-PCR triplex para RNA isolado de fluido viral foi eficiente na detecção simultânea dos três vírus: foram detectados três produtos de amplificação distintos representando HAV (192 pb), RV (278 pb) e PV (394 pb).

✓ Para ostras semeadas e extratos controles: o método combinado não foi eficiente para detectar os três vírus simultaneamente.

✓ O RT-PCR específico desenvolvido neste estudo apresentou algumas vantagens que incluem: é necessária realização de apenas uma reação de PCR para visualização do produto de amplificação e pode-se utilizar um programa único de RT-PCR para HAV, RV e PV.

✓ A técnica de RT-PCR específico desenvolvida neste trabalho e devidamente padronizada para detecção de HAV em ostras experimentalmente inoculadas, foi aplicada, através dos protocolos C e D, para análise das amostras de campo de ostras *Crassostrea gigas* coletadas em quatro locais de cultivo da grande Florianópolis.

✓ Num único local, sítio 2, foram detectadas 6 amostras positivas para HAV, correspondendo a 22% das amostras analisadas para este sítio, o que indica uma alta contaminação viral.

✓ Este trabalho atingiu plenamente seus objetivos e demonstrou através dos controles positivos de ostras experimentalmente inoculadas que as metodologias moleculares e RT-PCR específico para detecção de HAV em ostras da espécie *Crassostrea gigas* podem ser aplicadas com sucesso na análise de amostras de campo.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. Immunity in Defense and Disease in: Cellular and Molecular Immunology, 4.ed., W.B. Saunders Company, Pennsylvania, Estados Unidos, 2000
- ABBASZADEGAN, M.; STEWART, P.; LECHEVALLIER, M.; YATES, M.; GERBA, C. Occurrence of enteroviruses in groundwater and correlation with water quality parameters. Water Quality Technology Conference, New Orleans, La. American Water Works Association, Washington, D.C.
- AHMED, F. E. Review: Assessing and managing risk due to consumption of seafood contaminated with microorganisms, parasites, and natural toxins in the US. *Intern J of Food Sci. and Tech.* **27**:243-260, 1992.
- AKABOSHI, S. & SINQUE, C. Cultivo experimental de *Crassostrea gigas* (Thunberg,1795) na região estuarina lagunar de Cananéia. , São Paulo, *Bol. Inst. Pesca*, **10**:1-8, 1983.
- AKABOSHI, S.; PEREIRA, O.M.; JABIBAGN, O.; YAMANAKA, N. Fecundação e crescimento larval de ostra *Crassostrea gigas* em laboratório - Cananéia, São Paulo. *Bol. Inst. Pesca*, **9**:45-50, 1982.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation. Microbiological examination of water. In: **Standart Methods for the examination of water and wastewater.** Washington, DC, 1995. p.827-1038.
- ANDERSEN, V.; MAAGE, A.; JOHANNESSEN, P.L. Heavy metals in blue mussels (*Mytilus edulis*) in the bergen harbor area, Western Norway. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **57**:589-596,1996.
- ANDRÉ, F.; HEPBURN, A.; D'HONDT, E. Inactivated candidate vaccines for hepatitis A. *Prog. Med. Virol.*, **37**:72-95, 1990.
- ANG., L.H. Na outbreake of viral gastroenterites associed with eating raw oysters. *Comm. Dis. Pub. Health*, **1**:38-40, 1998.
- ANON. Council Decision of 29th April 1999 on reference laboratories for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluses (1999/313/BC). *Off. J. Eur. Comm.*, 1999a.

- ANON. Council directive of 15th 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. Comm.**, 1991a.
- ANON. National shellfish sanitation program, Manual of Operations. 1993 Revision. USA Department of health and human services, Public Health Services, Food and Drug Administration. 1993b.
- ANON. Outbreaks of gastroenteritis in England and Wales associated with shellfish: 1996 and 1997. **Comm. Dis. Report.**, 8:21-24, 1998.
- ANON. WILCOX, J. R. v Great Lakes Council. Federal Court of Australia. FCA 177:1-110, 1999b.
- APAIRE-MARCHAIS, V.; ROBERTSON, B.H.; AUBINEAU-FERRE, V.; LE ROUX, M.G.; LEVEQUE, F.; SCHWARTZBROD, L. BILLAUDEL, S. Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61:3977-3980, 1995.
- ARAUJO, S.C.; PEREIRA, A. Aspectos de Comercialização. Em: FERREIRA, J. F., Cultivo de Ostras, Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, LCMM, 1996.
- ARMIGLIATO, M.; BORTOLOTTI, F.; BERTAGGIA, A.; et al. Epidemiology of hepatitis A in northern Italy a seven-year survey. **Infectin**, 14:283-285, 1986.
- ARNAL, C.; FERRE-AUBINEAU, V.; BESSE, B.; MIGNOTTE, B.; SCHWARTZBROD, L.; BILLAUDEL, S. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. **J. of Virol. Meth.**, 77:17-26, 1999.
- ARNAL, C.; FERRE-AUBINEAU, V.; MIGNOTTE, B.; IMBERT-MARCILLE, B.M.; BILLAUDEL, S. Quantification of Hepatitis A virus in shellfish by competitive reverse transcription-PCR with coextraction of standard RNA- **Appl. and Env. Microb.**, 65(1): 322-326, 1999.
- ATMAR, R.L., METCALF, T. G., NEILL, F.H. and ESTES, M.K. Detection of enteric viruses in oysters by using polymerase chain reaction. **Appl. Environm. Microbiol** 59:631-635, 1993.
- ATMAR, R.L.; NEILL, F.H.; ROMALDE, J.L. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61:3014-3018, 1995.

- BARARDI, C. R. M.; YIP, H.; EMSLIE, K. R.; VESEY, G.; SHANKER, S.R. and WILLIAMS, K. L. Flow Cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. *Int. J. Food Microbiol.*, **49**:9-18, 1999.
- BEARD, M.R.; LEMON, S.M. Hepatitis A virus. In: GRANOFF, A.; WEBSTER, R.G. (Eds), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press: San Diego, 1999, 631-639.
- BINN, L.N.; LEMON, S.M.; MARCHWICKI, R.H.; REDFIELD, R.R.; GATES, N.L.; BANCROFT, W.H. Primary isolation and serial passage of hepatitis A virus strains in primate cell cultures. *J. of clin.Microbiol.*, **20**(1):28-33, 1984.
- BIRKENMEYER, L.G.; MUSHAHWAR, I.K. Detection of hepatitis A, B and D virus by the polimerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* **49**:101-112, 1994
- BISHOP, R.F. Natural history of human rotavirus infection. *Arch. Virol.*, **12**(suppl.):119-128, 1996.
- BITTON, G. – Introduction to Environmental Virology. New York, John Wiley & Sons, 1980.
- BIZIAGOS,E.; PASSAGOT, J.; CRANCE, J.M. and DELOINCE, R. Long-term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**: 2705-2710, 1988.
- BOSCH, A., ABAD, F.X., GAJARDO, R.; PINTÓ, R.M. Should shellfish be purified before public consumption? *The Lancet*, **344**:1024-1025, 1994.
- BOSCH, A.; GAJARDO, R.; DIEZ, J.M.; PINTO,R.M. Non isotopic automatable molecular procedures for the detection of enteroviroses. *Mol. Cell. Probes.*, **10**:81-89, 1996.
- BOSTOCK, A.D.; MEPHAM, P.; PHILIPS, S. Hepatitis A infection associated with the consumption of mussels. *J. Infect.*, **1**:171-177, 1979.
- BOUCHRITI, N.; GOYAL, S. M. – Methods for the concentration and detection of human enteric viruses in shellfish: a review. *Microbiologica*, **16**: 105-113, 1993.
- Brazilian Mariculture Linkage Program, Apostila BMLP. Brasil, 2000.
- BROGNOLI, F. Atlântico sul ganha mercado. In: *Diario Catarinense*, 12/11/2000. p.20.
- BROGNOLI, F.F; TEIXEIRA, A.L. Técnicas de manejo e cultivo. Em: FERREIRA, J. F., *Cultivo de Ostras, Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, LCMM*, 1996.

- BURLESON, F.G; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. – Virology: a laboratory Manual. San Diego, Academic Press, 1992. 250p.
- CAUL, E.O. Viral gastroenteritis – small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. The epidemiological perspective. *J. Clin. Pathol.*, **49**:959-964, 1996b.
- Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 1999;**48**(No. RR-12):1-14.
- CHALMERS, J.W.; MCMILLAN, J.H. Na outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. *Epidemiol. Infect.*, **115**:163-167, 1995.
- CHAPMAN, N.M.; TRACY S.; GAUNTT, C.J.; FORTMUELLER, V. Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **28**:843-850, 1990.
- CHO, H.B., LEE, S.H., CHO, J.C., KIM,S.J. Detection of adenovirus and enterovirus in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. *Can. J. Microbiology.* **46**:417-424, 2000.
- CHRISTENSEN. B.F.; LEES, D.; WOOD, K.H.; BJERGSKOV, T.; GREEN, J. Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 1996/97. *J. Shellfish res.*, **17**:1633-1635, 1998.
- CHUNG,H.; JAYKUS, L.; SOBSEY, M. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. *Appl. and Env. Microbil.*, **62**(10):3772-3778, 1996.
- CONATY, S.B.; BIRD, P.; BELL, G., KRAA, E. GROHMANN, G., MCANULTY JM. Hepatitis A in New South Wales, Australia, from consumption of oysters: the first reported outbreak. *Epidemiol. Infect.* **124**(1):121-130, 2000.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente- Resolução CONAMA N°20 de 18/06/86- Ministério do Desenvolvimento urbano e Meio Ambiente, 1986.
- CRAUN, F.G. () Statistic of waterborne outbreaks in the U.S.A.(1920-1980). In **Waterborne diseases in the United States** CRAUN, F.G. ed. 1986 CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. p.73-159.
- CROCI, I.; CICCOCCHI, M. ; DE MEDICI, D.; DIPASQUALI, S.; FIORE, A.; MELE, A.; TOTI, L. Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels, *J. Appl. Microb.*, **87**(6):884-888, 1999.

- CROCI, L.; CONSENTINO, A.M.; DE MEDICI, D.; FIORI, A.; MORETTI, P.; TOTI, L. Isolation of HAV in mussels meeting acceptable bacteriological standards. In Proceedings of 4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications, 7-12 June 1998. Vol II, pp. 797-801. Berlin, Germany, 1998.
- CROCI, L.; DE MEDICI D.; MORACE, G.; FIORE, A.; SCALFARO, C.; BENEDEUCE, F.; TOTI, L. Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. *Int. J. of Food Microbiol.*, **48**:67-71, 1999.
- CROMEANS, T. L., NAINAN O. V. and MARGOLIS H. S. Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2460-2463, 1997.
- CROMEANS, T., SOBSEY, M. D. AND FIELDS, H. A. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* **22**:45-56., 1987.
- DAEMER, R.J.; FEINSTONE, S.M.; GUST, I.D.; PURCELL, R.D. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey kidney cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect. Immun.*, **32**:388-393, 1981.
- DE CHASTONAY, J.; SIEGL, G. Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology* **157**:268-275, 1987.
- DE FILIPPIS, P.; DIVIZIA, M.; MELE, A.; ADAMO, B.; PANA, A. Detection of hepatitis A virus in the stool of healthy people from endemic area. *European Journal Epidemiology*, **3**(2):172-175, 1987.
- DE SERRES, G.; CROMEANS, T.L.; LEVESQUE, B.; BRASSARD, N.; BARTHE, C.; DIONNE, M.; PRUD'HOMME, H.; PARADIS, D.; SHAPIRO, C.N.; NAINAN, O.V.; MARGOLIS, H.S. Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *J. of Inf. Dis.*, **179**:37-43, 1999.
- DENG, M. Y.; DAY, S. P.; CLIVER, D. O. – Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**:1927-1933, 1994.
- DESENCLOS, J.-C.A.; KLONTZ, K.C.; WILDER, M.H.; NAINAN, O.V.; MARGOLIS, H.S.; GUNN, R.A. A multistate outbreak of hepatitis A caused by the consumption of raw oysters. *Am. J. Public Health*, **81**:1268-1272, 1991.
- DIÁRIO CATARINENSE: Atlântico Sul ganha mercado, p. 20, 12/11/2000.

- DIVIZIA, M., GABRIELI, R., DONIA, D., RUSCIO, V., DEGENER, A. M. AND PANA, A. Concomitant Poliovirus Infection During an Outbreak of Hepatitis A. *J Infection*. **39**:227-230, 1999.
- DIVIZIA, M., RUSCIO, V., DEGENER, A. M. AND PANA, A. Hepatitis A Virus detection in wastewater by PCR and hybridization. *Microbiologica*, **21**:161-167, 1998.
- DIVIZIA, M.; RUGGERI, F.; HENTSCHEL, J.; FLEHMIG, B.; PANA, A. and PEREZ-BERCOFF, R. Preliminary characterization of a fast-growing strain of human hepatitis A virus. *Microbiologica*, **9**:269-273, 1986.
- DORE, I. Shellfish: a guide to oyster, mussels, scallops, clams and similar products for the commercial use. New York, Van Nostrand Reinhold, 1991. 240p.
- DORE, W.J.; HENSHILWOOD, K.; LEES, D.N. – Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol*, **66**:1280-1285, 2000.
- DORE, W.J.; HENSHILWOOD, K.; LEES, D.N. – The development of management strategies for control of virological quality in oysters. *Water Sci. Technol.*, **38**:29-35, 1998.
- DOWELL, S.F.; GROVES, C.; KIRKLAND, K.B.; et al. A multistate outbreak of oyster-associated gastroenteritis-implications for interstate tracing of contaminated shellfish. *J. Infect. Dis.*, **171**:1497-1503, 1995.
- DUBOIS, E.; LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; KOPECKA, H.; CORMIER, M.; POMMEPUY, M. Molecular epidemiological survey of rotavirus in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**:1794-1800, 1997.
- DUFOUR, A.P.; ERICKSEN, T.H.; BALLENTINE, R.K.; CABELLI, V.J.; GOLDBERG, FOX, W.E.. Bacteriological Ambient Water quality criteria for marine and fresh recreational waters. Ambient water quality criteria for bacteria. EPA44075-84-002. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 1986
- DULBECCO, R.; VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Experim. Med.*, **99**:167-182, 1954.
- EATON, A.D., CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A. E. Standard Methods; 19.ed. APHA- American Public Health Association, Washington, DC, Estados Unidos, 1995.

- EPAGRI, *Biologia e Cultivo de Mexilhões*, 2^ªed., Epagri, 2000.
- EPAGRI, *Manual de Cultivo do Mexilhão Perna perna*, 1994.
- ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.N.; HOWLEY, R.M.; CHAMOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; SATRAUS, S.E., ed. *Fields Virology*. 3 ed. Philadelphia, Lippincott, 1996. p.1625-1655.
- ESTES, M.K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.*, **53**, 410-449, 1989.
- FANKHAUSER, R.L.; NOEL, J.S.; MONROE, S.S.; ANDO T.; GLASS, R.I. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. infect. Dis.*, **178**:1571-1578, 1998.
- FLEHMIG, B. Hepatitis A virus in cell culture. II. Growth characteristics of hepatitis A virus in Frhk-4/R cells. *Med. Microbiol. Immunol.* **170**:73-81, 1981.
- FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. - Viral Pathogenesis. In: 595 - 627. *Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis, and control*. Washington, DC, ASM PRESS, 2000.
- FRESHNEY, R.I. Introduction: principles of sterile technique and cell propagation. In: _____, ed. *Animal cell culture: a practical approach*. Washington DC, IRL Press, 1986, p. 1-20.
- GAJARDO, R.; BOURICHRITI, N.; PINTÓ, R.M.; BOSCH, A. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. *Appl. Environm. Microbiol.* **61**:3460-3462, 1995.
- GANTZER, C.; DUBOIS, E.; CRANCE, J.M.; BILLAUDEL, S.; KOPECKA, H.; SCHWARTZBROD, L.; POMMEPUY, M.; LE GUYADER, F. Devenir des virus entériques en mer et influence des facteurs environnementaux. *Oceanologica Acta*, **21**(6):983-992, 1998.
- GDALEVICH, M.; GROTO, I.; MANDEL, Y.; MIMOUNI, D.; SHEMER, J.; ASHKENAZI, I. - Hepatitis A antibody prevalence among young adults in Israel - the decline continues. *Epidemiol. Infect.*, **121**:477-479, 1998.
- GERBA, C. P.; GOYAL, S. M. - Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: a review. *J. Food Prot.*, **41**:743-754, 1978.
- GOLDBERG, E.D.; KOIDE, M.; HODGE, M.; FLEGAL, A.R.; MARTIN, J. U.S. mussel watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuar. Coast. Shelf. S.*, **16**:69-93, 1983.

- GOSWAMI, B.B.; BURKHARDT III, W.; CEBULA, T.A. Identification of genetic variants of hepatitis A virus. *J. Virol. Meth.*, 65:95-103, 1997.
- GOSWAMI, B.B.; KOCH, W.H.; CEBULA, T.A. Detection of hepatitis A virus in *Mercenaria mercenaria* by coupled reverse transcription and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:2765-2770, 1993.
- GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K. CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. clin. Microbiol.*, 28:276-282, 1990.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. ESTES, M. K. Identification of Norwalk virus in artificially seeded shellfish and selected foods. *J. Virol. Meth.* 48:177-187, 1994.
- GOYAL, S. M. – Viral Pollution of the marine environment. *Crit. Rev. Environ. Control*, 14:1-32, 1984.
- GRABOW, W.; GAUSS-MULLER, V.; PROZESKY, O.W.; DEINHARDT F. Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 619-624, 1983.
- GRAFF, J.; TICEHURST, J.; FLEHMIG, B. Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3165-3170, 1993.
- GRAHAM, D.Y.; JIANG, X.; TANAKA, T.; OPEKUN, A.R.; MADORE, H.P.; ESTES, M.K. Norwalk virus infection of volunteers: new insights based on improved assays. *J. Infect. Dis.*, 170:34-43, 1994.
- GREEN, D. H. and LEWIS, G. D. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription PCR and cell culture. *Wat. Res.*, 33:(5)1195-1200, 1999.
- GREENING, G.E.; WOODFIELD, L.; LEWIS, G.D. RT-PCR and chemiluminescent ELISA for detection of enteroviruses. *J. of Virol. Meth.*, 82:157-166, 1999.
- GRIFFIN, D.W.; GIBSON III, C. J.; LIPPE, E.L.; RILEY, K.; PAUL III, J.H.; ROSE, J. B.-Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcriptase PCR and of Microbial Indicators by Standart Methods in the Canals of the Florida Keys – *App and Environ Microbio*, 65(9):4118-4125, 1999.

- GRINDE, B., JONASSEN, T. Ø., USHIJIMA, H. Sensitive detection of group A rotaviruses by immunomagnetic separation and reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* **55**:327-338, 1995.
- HARLOW, E. & LANE, D. Monoclonal antibodies. In: ____ *Antibodies: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, p139-243.
- HENSHILWOOD, K.; GREEN, J.; LEES, D.N. – Monitoring the marine environment for small round structured viruses (SRSVs): a new approach to combating the transmission of these viruses by moluscan shellfish. *Water Sci. Technol.*, **38**:51-56, 1998.
- HILL, W.E.; KEASLER, S.P.; TRUCKSESS, M.W., FENG, P.; KAYSNE, C.A.; LAMPEL, K.A. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oyster. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 707-711, 1991.
- HOLLINGER, F.B.; TICEHURST, J.R. Hepatitis A virus. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, third edition. Lippincott Raven Press: Philadelphia, 1996, 735-782.
- HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McINERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WALTER, M. V. *Manual de Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology. Washington, DC, ASM Press 1997. p.168-175; 203-212.
- HUTIN, Y.J.; POOL, V.; CRAMER, H.E.; NAINAN, O.V.; WETH, J.; WILLIAMS, I.T.; GOLDSTEIN, S.T.; GENSHEIMER, K.F.; BELL, B.P.; SHAPIRO, C.N.; ALTER, M.J.; MARGOLIS, H.S. A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. National hepatitis A investigation team. *N. Engl. J. Med.*, **340**:595-602, 1999.
- IJZERMAN, M.M.; DAHLING, D.R.; SHAY FONT, G. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* **63**:145-153, 1997.
- IMAI, T. *Aquaculture in shallow seas: progress in shallow sea culture*. Part. II. Rotterdam, Balkema, 1982. p. 115-260.
- INNIS, B.L.; SNITBHAN, R.; KUNASOL, P; et al. Protection against hepatitis A by na inactivated vaccine. *JAMA*, **271**:1328-1334, 1994.
- JANSEN, R.W.; NEWBOLD, J.E.; LEMON, S.M. Complete nucleotide sequence of a cell culture-adapted variant of hepatitis A virus: comparison with wild-type virus with restricted capacity for in vitro replication. *Virology*, **163**:299-307, 1988.

- JANSEN, R.W.; SIEGL, G.; LEMON, S.M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**:2867-2871, 1990.
- JAYKUS, L.; HEMARD, M. T.; SOBSEY, M. D. Human enteric pathogenic viruses. In: HACKNEY, C. R.; PIERSON, M. D.(ed.) – *Environmental Indicators and Shellfish Safety*. New York, Chapman and Hall, 1994. p.92-153.
- JAYKUS, L.A.; DE LEON, R.; SOBSEY, M.D. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligonucleotide hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(6):2074-2080, 1996.
- JAYKUS, L.A.; DE LEON, R.; SOBSEY, M.D. Application of RT-PCR for the detection of enteric viruses in oysters. *Water Sci. Technol.*, **27**:49-53, 1993.
- JIANG, X., WANG, J., GRAHAM, D. Y. and ESTES, M. K. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2529-2534, 1992.
- JIANG, X.; GRAHAM, D.Y.; WANG, K.; ESTES, M.K. Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science*, **250**:1580-1583, 1990.
- JOSÉ, Viviam Feres, *Bivalves e a segurança do consumidor*, 1996. (Dissertação de Mestrado- Pós-Graduação em Ciência Ambiental- USP- São Paulo).
- JOTHIKUMAR, N.; DEAN, O.; MARIAM, T.W. Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **64**(2):504-508, 1998.
- KAPIKIAN, A.Z. & CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In FIELDS, B.N.; KNIPE, D.N.; HOWLEY, R.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; SATRAUS, S.E., ed. *Fields Virology*. 3 ed. Philadelphia, Lippincott, 1996. p.1657-1708.
- KOFF, R. S. – Seroepidemiology of Hepatitis A in the United States. *J. Infect. Dis.*, **171**:19-23, 1995.
- KOHN, M.A.; FARLEY, T.A.; ANDO, T.; CURTIS, M.; WILSON, S.A.; JIN, Q.; MONROE, S.S.; BARON, R.C.; MCFARLAND, L.M.; GLASS, R.I. An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. Implications for maintaining safe oyster beds. *JAMA*, **273**:466-471, 1995.
- KOOF, R.F.; SEAR, H.S. Internal temperature of steamed clams. *Med. Intell.*, **273**:737-739, 1967.

- KOPECKA, H., DUBROU, S., PREVOT, J., MARSHALL, J., and LOPES-PILA, J. M. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction and hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:489-522, 1993.
- LE GUYADER, F.; APAIRE-MARCHAIS, V.; BRILLET, J.; BILLAUDEL, S. 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.*, **59**(11):3963-3968, 1993.
- LE GUYADER, F.; DUBOIS, E.; MENARD, D.; POMMEPUY, M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(10): 3665-3671, 1994.
- LE GUYADER, F.; ESTES, M.K.; HARDY, M.E.; NEILL, F.H.; GREEN, J.; BROWN, D.; ATMAR, R.L. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch. Virol.*, **141**:2225-2235, 1996.
- LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, L.; DUBOIS, E.; POMMEPUY, M. - Three-Year study to assess human enteric viruses in shellfish – *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(8):3241-3248, 2000.
- LE GUYADER, F.; MIOSSEC, L.; HAUGARREAU, L.; DUBOIS, E.; KOPECKA, H., POMMEPUY, M. – RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21-month period. *Water Sci. Technol.*, **38**:45-50, 1998.
- LEE, J. V.; DAWSON, S. R.; WARD, S.; SURMAN, S.B.; NEAL, K. R. – Bacteriophages are a better indicator of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by a lowland river. *Water Sci. Technol.*, **35**:165-170, 1997.
- LEE, K.M.; KRUSE, H.; WASSERMANN, O. The pattern of organochlorines in mussels *Mytilus edulis* L. from the South West Baltic Sea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**:68-76, 1996.
- LEES, D. – Viruses and bivalve shellfish- *Intern. J. of Food Microb.* **59**:81-116, 2000.
- LEES, D.N.; HENSHILWOOD, K.; DORE, W.J. Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as model. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**:2999-3005, 1994.

- LEGEAY, O.; CAUDRELIER, Y.; CORDEVANT, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LANGE, M. Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. *J. of Virol. Meth.*, **90**:1-14, 2000.
- LEMON, S.; MURPHY, P.C.; SHIELDS, P.A.; PING, L.H.; FEINSTONE, S.M.; CROMEANS, T.; JANSEN, R.W. Antigenic and genetic variation in cytopathic hepatitis A virus variants arising during persistent infection: Evidence for genetic recombination. *J. Virol.*, **65**:2056-2065.
- LESS, D.N.; HENSHILWOOD, K.; GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W.G. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(12):4418-4424, 1995.
- LEWIS, G.D.; METCALF, T.G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1983-1988, 1988.
- LI, J.W.; WANG, X.W.; RUI, Q.Y.; SONG, N.; ZHANG, F.G.; OU, Y.C.; CHAO, F.H. A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *J. Virol. Meth.*, **74**:99-108, 1998.
- LUCENA, F.; LASOBRAS, J.; MCINTOSH, D.; FORCADELL, M.; JOFRE, J. – Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**:2272-2277, 1994.
- MAGALHÃES, A. R. M. Teor de proteínas do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (mollusca: bivalvia), em função do ciclo sexual. São Paulo: 1985. (Tese – Mestrado – Universidade de São Paulo).
- MBITHI, J. N.; SPRINGTHORPE, S.; SATTAR, S. A. Effect of relative Humidity and Air temperature on Survival of Hepatitis A virus on Environmental samples, *Applied and Env. Microbil.*, **57**(5): 1394-1399, 1991. Dentro: Sattar, 1986.
- MCDONNELL, S.; KIRKLAND, K.B.; HLADY, W.G.; ARISTEGUIETA, C.; HOPKINS, R.S.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I. Failure of cooking to prevent shellfish-associated viral gastroenteritis. *Arch. Intern. Med.*, **157**:111-116, 1997.

- MEDEIROS, R.P.; POLETTE, M.; VIZINHO, S.C.- Caracterização sócio-econômica e cultural das comunidades pesqueiras artesanais do litoral centro-norte. Itajaí,. 40 p. 1996 (não publicado).
- MELE, A.; STAZI, M. A.; CORONA, R. – Decline of incidence of A B and non-A non-B hepatitis in Italy results of four years surveillance 1985-88. *Ital. J. Gastroenterol.*, **22**:274-280, 1990.
- MELE, A.; STROFFOLINI, T.; PALUMBO, F.; GALLO, G.; RAGNI, P.; BALOCCHINI, E.; TOSTI, M.E.; CORONA, R.; MARZOLINI, A.; MOIRAGHI, A. Incidence of and risk factors for hepatitis A in Italy: public health indications from a 10 year surveillance. *J. of Hepatology*, **26**:743-747, 1997.
- MELNICK, J. L.; GERBA, C. P. – The ecology of enteroviruses in natural waters. *Crit. Rev. Environ. Control*, **10**:65, 1980.
- MELNICK, J.L. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: FIELDS, B.N. *Virology*. 3.ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996. p.655-712
- METCALF, T.G.; JIANG,X.; ESTES, M.K.; MELNICK, J.L. Nucleic acid probes and molecular hybridization for detection of viruses in environmental samples. *Prog. Med. Virol.* **35**:186-214, 1988.
- METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. Environmental Virology: From Detection of Virus in sewage and Water by Isolation to Identification by Molecular Biology – A Trip of Over 50 Years. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:461-487, 1995.
- MINOR, P. D. Picornaviridae. In: FRANKI, R. I. B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L.; BROWN, F. (Eds.) – Classification and Nomenclature of Viruses: the fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna, Springer Verlag, 1991. p.320.
- MINOR, P.D. Polioviruses. In: GRANOFF, A.; WEBSTER, R.G. (Eds), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Academic Press: San Diego, 1999, 1326-1330.
- MIOSSEC, L.; LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; COMPS, M.A.; POMMEPUY, M. Possible relationship between a winter epidemic of acute gastroenteritis in France and viral contamination of shellfish. *J. Shellfish Res.*, **17**:1661-1664, 1998.

- MONCEYRON, C.; GRINDE, B. Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. *J. Virol. Meth.*, **46**:157-166, 1994.
- MUJIKI, M.; GIRONE, R.; LUCENA, F. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. *J. of Virol. Meth.*, **89**:109-118, 2000.
- MUSCILLO, M.; LA ROSA, G.; CARDUCCI, A.; CANTIANI, L.; MARIANELLI, C. Molecular analysis of poliovirus 3 isolated from aerosol generated by a wastewater treatment plant. *Wat. Res.*, **31**:3125-3131, 1997.
- NAIRN, C.; GALBRAITH, D.N.; CLEMENTS, G.B. Comparison of Coxsackie B neutralisation and enteroviral PCR in chronic fatigue patients. *J. Med. Virol.*, **46**:310-313, 1995.
- NASCIMENTO, I. A. - Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. *Ciência e Cultura* 7 (35): 871-876, 1983.
- NATIONAL ADVISORY COMMITTEE – Microbial criteria for raw molluscan shellfish. *J. Food Protect.*, **55**:463-480, 1992.
- NICAND, E.; TEYSSOU, R.; BUISSON, Y. Le risque fécal virale en 1998. *Virologie*, **2**:103-116, 1998.
- O ESTADO: Risco de poluição preocupa os maricultores da capital, p.9, 29/06/1999.
- PEARSE, V., PEARSE J., BUCHSBAUM, M., BUCHSBAUM, R. Living Invertebrates. The Boxwood Press. California, 1987
- PEBODY, R.G.; LEINO, T.; RUUTU, P.; KINNUNEN, L.; DAVIDKIN, I.; NOHYNEK, H.; LEINIKKI, P. Foodborne outbreaks of hepatitis A in a low endemic country: an emerging problem? *Epidemiol. Infect.*, **120**:55-59, 1998.
- PERSING, D.H. – Target selection and optimization of amplification reactions. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C. WHITE, T. J., ed. – Diagnostic molecular microbiology: principles and applications, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993. p.88-104.
- POLI, C.R. Cultivo de ostras. Em: FERREIRA, J. F., Apostila : Cultivo de Ostras, Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, LCMM, 1996.
- PROVOST, P.J.; HILLEMANN, M.R. An inactivated hepatitis A virus vaccine prepared from infected marmoset liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **159**:201-203, 1978.

- PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G.; GIRONES, R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**(8):2963-2970, 1994.
- REYNOLDS, K.S., GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. Rapid PCR-based monitoring of infectious enteroviruses in drinking water. *Wat. Sci. Tech.* **35**:423-427, 1997.
- ROBERTSON, B.H.; JANSEN, R.W.; KHANNA, B.; TOTSUKA, A.; NAINAN, O.V.; SIEGL, G. WIDELL, A.; MARGOLIS, H.S. ISOMURA, S.; ITO, K.; ISHIZO, T.; MORITSUGO, Y.; LEMON, S.M. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.*, **73**(1365-1377), 1992.
- ROZANSKI, M.; COSTA, S.W.; BOLL, M.G.; OLIVEIRA NETO, F.M. Evolution of Aquaculture production in Santa Catarina State – Brazil, Simpósio de Aquicultura 2000, CD room Aqua 2000.
- ROMALDE, J. L., ESTES, M. K., SZUCS, G., ATMAR, R. L., WOODLEY, C. M., METCALF, T. G. *In situ* detection of HAV in cell cultures and shellfish tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(6):1921-1926, 1994.
- ROOS, R. (1956). Hepatitis epidemic conveyed by oysters. *Svenska Lakartidningen.* **53**:989-1003.
- ROSE, J.B. & SOBSEY, M.D. Quantitative risk assessment for viral contamination of shellfish and coastal waters. *J. Food Protect.*, **56**(12):1043-1050, 1993.
- ROSENFELD S.I. & JAYKUS L.A. A multiplex transcription polymerase chain reaction method for detection of foodborne viruses. *Journal of Food Protection.* **62**(10):1210-1214, 1999.
- ROSS, B.C.; ANDERSON, D.A.; GUST, I. D. Hepatitis A virus and hepatitis A infection. *Advances in Virus Research*, **39**:209-245, 1991.
- RUPPERT, E.E. & BARNES, R.D. Moluscos. In: _____ - Zoologia dos invertebrados. 6.ed. São Paulo, ROCA, 1996. p. 353-484.
- SALAMINA, G.; D'ARGENIO, P. – Shellfish consumption and awareness of risk of acquiring hepatitis A among Neapolitan families – Italy, 1997. *Eurosurveillance*, **3**:97-98, 1998.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E. F. and MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition- Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1 Section 6: 6.39-6.44.*

- SANTOS, C.S. **Padronização de Métodos Moleculares e de cultura celular para detecção de rotavírus em ostras experimentalmente inoculadas.** Florianópolis, 2000. (Tese – Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina).
- SATO, M.I.Z.; MONTEIRO, C.K.; STOPPE, N.C.; SANCHEZ, P.S. Shellfish and marine water microbiological quality. *J. Environ. Tox. And Water Qual.* 7:95-105, 1992.
- SCHWAB, K. J. ; NEILL, F.H.; FANKHAUSER, R.L.; DANIELS, N.A; MONROE, S.S.; BERGMIRE-SWEAT, D.A.; ESTES, M. ; ATMAR, R.; Development of Methods to detect "Norwalk-Like Viruses"(NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: Application to a food-borne NLV outbreak; *Am. Society for Microb.* 66(1), 213-218, 2000.
- SCHWAB, K. J., DE LEON R. and SOBSEY. M. D. Concentration and purification of beef extracts mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse-transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:531-537, 1995.
- SCHWAB, K. J.; DE LEON, R.; BARIC, R. S.; SOBSEY. M. D. Detection of rotaviruses, enteroviruses and hepatitis A virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction, p. 475-491. In: *Advances in water analysis and treatment. Proceedings of the Water Quality Technology Conference, Orlando, Fla. American Water Works Association Denver.* 1991
- SCIPIONI, A., DAUBE, G.; THIRY, E.; La contamination de l'eau et des aliments par les virus pathogènes pour l'homme- *Ann. Méd. Vét.*, 144:207-221, 2000.
- SHAW, R.; GREENBERG H. Rotaviruses. in: GRANOFF, A.; WEBSTER, R.G. (Eds), *Encyclopedia of Virology*, second edition. Adademic Press: San Diego, 1999, 1576-1592.
- SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. Viral hepatitis. In: _____ ed. *Diseases of the liver and biliary system.* Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993. p.260-293.
- SHIEH, Y. S. C.; CALCI, K. R.; BARIC, R. S. A Method To Detect Low Levels of Enteric Viruses in Contaminated Oysters. *Appl. Environm. Microbiol.* 65:4709-4714, 1999.
- SHIM, W.J.; OH, J.R.; KAHNG, S.H.; SHIM, J.H.; LEE, S.H. Accumulation of tributyl-and triphenylin compounds in pacific oyster *Crassostrea gigas*, from the

- Chinhae Bay System, Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**:41-47, 1998.
- SHOUVAL, D.; ASHUR, Y.; ADLER, R.; et al. Single and booster dose response to na inactivated hepatitis A vaccine: comparison with immune serum globulin prophylaxis. *Vaccine*, **11**(Suppl.1):S9-14, 1993.
- SIEGL, G.; LEMON, S.M. Recent advances in hepatitis A vaccine development. *Virus Res.*, **17**:75-92, 1990.
- SILVA, F.C. Cultivo. Em: : FERREIRA, J. F., Cultivo de Ostras, Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, LCMM, 1996.
- SILVEIRA Jr, N. Enfermidades. Em: FERREIRA, J. F., Cultivo de Ostras, Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, LCMM, 1996.
- SIMMONDS, P. – Polymerase chain reaction. In: DESSELBERGER, U., ed – **Medical Virology: a praticai approach**, Oxford, 1995, p. 107-145.
- SJÖGREN, N.H.; TANNO, H.; FAY, O.; et al. Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. *Ann Intern. Med.*, **106**:221-226, 1987.
- SMAAL, A.C. & WIDDOWS, J. The scope for growth of bivalves as na integrated response parameter in biological monitoring. In: KRAMER, K.J.M., ed., **Biomonitoring of coastal and Estuarine Pollution**. Boca Raton FL, CRC Press, 1994. p. 247-267.
- SMITH, E.M.; ESTES, M.K.; GRAHAM, D.Y.; GERBA, C.P. A plaque assay for the simian rotavirus SA11. *J. Gen. Virol.* **43**:513-519, 1979.
- SOBSEY, M. D. Detection of viruses in shellfish. In: GERBA, C. P.; GOYAL, S. M. (ed.) *Methods in Environmental Virology*. New York, Marcel Dekker, 1982. p.243-259.
- SOBSEY, M. D. Methods for recovering viruses from shellfish, seawater and sediments. In: BERG, G.(ed.) – *Methods for Recovering Viruses from the Environment*. Boca Raton, CRC Press, 1987. p. 77-108.
- SOBSEY, M. D.; CARRICK, R. J.; JENSEN, H. R. – Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**:121-130, 1978.
- SOBSEY, M.D. Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Water. Sci. Tech.* **21**:179-195, 1989.

- ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S.C.; PELLETIER, É.; ST-LOUIS, R. Butyltin concentrations in sediments and blue mussels (*Mytilus edulis*) of the southern gulf of St. Lawrence, Canada. *Environ Technol.*, 20:181-189, 1999.
- STRADER, D.B.; SEEFF, L.B. New hepatitis A vaccines and their role in prevention. *Drugs*, 51(3):359-366, 1996.
- STRAUB, T.M.; PEPPER, J. L. ABBASZADEGAN, M.; GERBA, C.P. – A method to detect enteroviruses in sewage sludge-amended soil using the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3): 1014-1017, 1994.
- SUÑÉN, E., and SOBSEY, M. D. Recovery and detection of enterovirus, hepatitis A virus and Norwalk virus in hardshell clams (*Mercenaria mercenaria*) by RT-PCR Methods. *J. Viral. Meth.* 77:179-187, 1999.
- SUPLICY, **Ensaio sobre depuração do mexilhão *Perna perna***. 1998, (Tese de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina).
- SYOLLE, A.; SPERNER, B. Viral infections transmitted by food of animal origin: the present situation in the European Union. *Arch. Virol. Suppl.*, 13:219-228, 1997.
- TORTORA, G. J. et al. Microbiology: in a introduction. 6 th ed. Cap. 18. **Practical Application of Immunology**, 1997 pg. 485-503.
- TRAORE, O.; ARNAL, C.; MIGNOTTE, B.; MAUL, A.; LAVERAN, H.; BILLAUDEL, S. and SCHWARTZBROD, L. Reverse Transcriptase PCR Detection of Astrovirus, Hepatitis A virus, and Poliovirus in Experimentally Contaminated Mussels: Comparison of Several Extraction and Concentration Methods. *Appl. Environm. Microbiol.* 64:3118-3122, 1998.
- TSAI, Y., TRAN, B.; SANGERMANO, L. R. and PALMER, C. J. Detection of Poliovirus, Hepatitis A Virus, and Rotavirus from Sewage and Ocean Water by Triplex Reverse Transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2400-2407, 1994.
- TSAI, Y.; TRAN, B. and PALMER, C. J. Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:363-519, 1995.
- VALLBRACHT, A; HOFFMANN, L.; WURSTER, K. J.; FLEHMIG, B. Persistent infection of human fibroblasts by hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.* 65: 609-615, 1984.
- VAN DAMME, P.; BELL, B. Hepatitis A: how to match prevention strategies to changing epidemiology. *Vaccine*, 19(9-10):999-1002, 2000.

- VESEY, G.; NARAI, J.; ASHBOLT, N.; WILLIAMS, K.; VEAL, D. Detection of specific microorganisms in environmental samples using flow cytometry. **Meth. Cell. Biol.**, **42**:489-522, Academic Press Inc., New York, 1994.
- WARD, J. E. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing and fate. **Invertebrate Biology**, **115** (3): 218-231, 1996.
- WERZBERGER, A.; MENSCH, B.; KUTER, B.; et al. A controlled trial of a formalin-inactivated hepatitis A vaccine in healthy children. **N. Engl. J. Med.**, **327**:453-457, 1992.
- WEST, P.A.; COLEMAN, M.R. A tentative national reference procedure for the isolation and enumeration of *Escherichia coli* from bivalve molluscan shellfish by most probable number method. **J. Appl. Bacteriol.**, **61**:505-516, 1986.
- WEST, P.A.; WOOD, P.C.; JACOB, M. Control of food poisoning risks associated with shellfish. **J. of the R. S. of Hea.** 15-21, 1985.
- WHITE, D.O.; FENNER, F.J. Picornaviridae. In: _____ - Medical Virology, fourth Edition, Sydney, Academic Press, 1995. p.385-404.
- WHITE, D.O.; FENNER, F.J. Reoviridae. In: _____ - Medical Virology, fourth Edition, Sydney, Academic Press, 1995. p.524-528.
- WIDDOWS, J. & DONKIN, P. Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: GOSLING, E., ed. – **The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture**. Elsevier, Amsterdam, 1992. p. 383-424.
- WILLIAMS, F.P.; FOUT, G.S. Contamination of shellfish by stool-borne viruses: methods of detection. **Environ. Sci. Technol.** **26**:689-696, 1992.
- WILSON, J.L. inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**(10):3741-3752).
- WITTMAN, R. J. & FLICK, G. J. Microbial contamination of shellfish: prevalence, risk to human health, and control strategies. **Annu. Rev. Public Health**, **16**:123-140, 1995.
- ZHOU, W.Z.; ESTES, M.K.; JIANG, X.; METCALF, T. Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus nucleic acids in shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57**:2963-2968, 1991.