

Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Cecília Elena Barberena de Vinatea

**Detecção e quantificação de poliovírus em ostras-
do-Pacífico (*Crassostrea gigas*) experimentalmente
inoculadas através de cultura celular e RT-PCR**

Florianópolis

2002

Cecília Elena Barberena de Vinatea

**Detecção e quantificação de poliovírus em ostras-
do-Pacífico (*Crassostrea gigas*) experimentalmente
inoculadas através de cultura celular e RT-PCR**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Célia Regina Monte Barardi

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis

2002

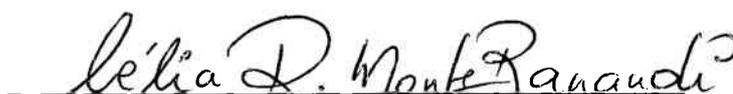
**“DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLIOVÍRUS EM
OSTRAS-DO-PACÍFICO (*CRASSOSTREA GIGAS*)
EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS ATRAVÉS DE
CULTURA CELULAR E RT-PCR”**

POR

CECÍLIA BARBERENA DE VINATEA

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

Comissão Examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. Célia Regina Monte Barardi
MIP/CCB/UFSC


Prof.^a. Dr.^a. Margherita Barraco
BEG/CCB/UFSC


Prof.^a. Dr.^a. Maria Risoleta Freire Marques
BQA/CCB/UFSC


Prof.^a. Dr.^a. Célia Regina Monte Barardi – MIP/CCB/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, Abril de 2002.

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

O trabalho recebeu apoio financeiro 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 e da CAPES através da concessão da bolsa de Mestrado.

Aos meus queridos pais Felipe e Elena com profunda gratidão.
Com amor a Luis, Lucía e Luis Paulo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Célia Regina Monte Barardi pela valiosa orientação, amizade e confiança em mim depositada.

À Profa. Cláudia Maria Oliveira Simões pela co-orientação e valiosas sugestões para a confecção desta dissertação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Edmundo Grisard e Mário Steindel pela ajuda oferecida ao longo da pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia Aplicada: Dóris, Carla, Juliane, Caroline, Thais, Wanessa, Ana Paula, Danielle, Cibele, Luciane, Roniele, Alessandra, Pedro, Alexandre e principalmente a Christiane pela amizade e agradável convívio.

Ao Luis pelo apoio durante estes dois anos.

Aos meus filhos Lucía e Luis Paulo, por terem compreendido os muitos momentos de ausência.

Aos meus pais e irmãos por todo o amor recebido e pela preocupação durante a elaboração deste trabalho.

À Ana Higginson pelo carinho e amizade.

À Deus por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
1.0 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Os moluscos bivalves	
1.1.1 Taxonomia e características da ostra <i>Crassostrea gigas</i>	01
1.1.2 Cultivo de moluscos em Santa Catarina.....	02
1.1.3 Contaminação do meio ambiente e qualidade sanitária dos moluscos bivalves e águas de cultivo.....	03
1.2 Os vírus entéricos.....	05
1.3 O vírus da poliomielite (poliovírus).....	06
1.4 Metodologias disponíveis para a detecção da contaminação viral em águas e moluscos.....	09
2.0 OBJETIVOS.....	13
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Materiais biológicos.....	14
3.1.1 Células.....	14
3.1.2 Vírus.....	14
3.1.3 Ostras.....	14
3.2 Metodologias para a cultura de células.....	14
3.2.1 Cultivo de células VERO.....	14
3.2.2 Preparação das soluções estoques de poliovírus.....	15
3.2.3 Determinação do título infeccioso viral.....	16
3.3 Inoculação artificial das ostras com poliovírus.....	17
3.3.1 Inoculação direta nos tecidos das ostras.....	17
3.3.2 Bioacumulação.....	18
3.4 Processamento das ostras para obtenção dos extratos tissulares.....	20
3.5 Avaliação da citotoxicidade dos extratos tissulares de ostras.....	22
3.6 Avaliação da recuperação viral dos extratos de ostras através do ensaio de formação de placas de lise	23
3.7 Extração do RNA viral a partir da solução estoque viral.....	27
3.7.1 Extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.....	27
3.8 Extração do RNA viral a partir dos extratos tissulares de ostras.....	28
3.9 Avaliação da técnica de extração de RNA viral para a remoção de inibidores da reação de RT-PCR.....	29
3.10 Ensaio de RT-PCR para o poliovírus.....	29
3.10.1 Protocolos de amplificação do poliovírus.....	30
3.10.2 Determinação da concentração ideal dos componentes do tampão e do pH para a reação de PCR.....	34
3.10.3 Determinação da sensibilidade de detecção da reação de RT-PCR.....	35
3.11 Visualização dos produtos de PCR.....	36

3.11	Reação de RT-PCR associada à cultura celular para a detecção do PV em ostras submetidas à bioacumulação.....	37
4.0	RESULTADOS.....	39
4.1	Cultivo e infecção das células VERO.....	39
4.2	Título infeccioso do poliovírus.....	39
4.3	Citotoxicidade dos extratos tissulares de ostras.....	41
4.4	Avaliação da recuperação viral dos extratos tissulares de ostra através do ensaio de formação de placas de lise.....	42
4.5	Avaliação da técnica de extração do RNA viral na remoção de inibidores da reação de RT-PCR.....	44
4.6	Reações de RT-PCR dos RNAs obtido da solução estoque viral de poliovírus e dos extratos tissulares de ostras.....	45
4.6.1	Definição dos iniciadores para a reação de transcrição reversa.....	45
4.6.2	Determinação das concentrações ideais dos componentes do tampão e do pH para a reação de PCR.....	47
4.6.3	Determinação do limite de sensibilidade da reação de RT-PCR.....	49
4.7	Ensaio de RT-PCR associado à cultura celular para detecção do PV em ostras submetidas à bioacumulação.....	53
5.0	DISCUSSÃO.....	56
6.0	CONCLUSÕES.....	67
7.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Inoculação artificial das ostras com poliovírus. (A) inoculação direta do poliovírus nos tecidos das ostras; (B) bioacumulação do poliovírus pelas ostras.
- Figura 2. Esquema ilustrativo do procedimento de preparação dos extratos tissulares de ostras. (A) limpeza e assepsia externa das valvas das ostras; (B) abertura das valvas com faca estéril; (C) transferência dos tecidos e fluidos para a garrafa estéril; (D) homogeneização dos tecidos das ostras; (E) centrifugação do homogeneizado de tecidos das ostras; (F) dispersão das partículas virais por ultra-som.
- Figura 3. Esquema da placa de 24 cavidades utilizada para a determinação da citotoxicidade de diferentes diluições dos extratos de ostras.
- Figura 4. Esquema da preparação dos extratos tissulares de ostras para o ensaio de recuperação viral. (A) Ostras inoculadas com $1,3 \times 10^5$ a 6×10^5 pfu de poliovírus na região gastrointestinal; (B) Controle positivo: extrato tissular de ostras inoculado com $5,8 \times 10^5$ pfu de poliovírus (extrato representando 100% de recuperação viral); (C) Ostras submetidas à bioacumulação, por inoculação da água dos aquários com poliovírus.
- Figura 5. Placa de 12 cavidades utilizada nos ensaios de formação de placas de lise.
- Figura 6. Esquema da placa de 12 cavidades utilizada no ensaio de RT-PCR associado à cultura celular para as bioacumulações. (A) Cavidades destinadas à quantificação do PV mediante o ensaio de formação de placas de lise; (B) Cavidades destinadas à detecção do PV mediante a reação de RT-PCR.
- Figura 7. Infecção de células VERO pelo poliovírus. (A) Células VERO intactas; (B): Células VERO infectadas com poliovírus.
- Figura 8. Determinação da eficiência da remoção de inibidores da reação de RT-PCR pela técnica de extração do RNA viral de diferentes amostras de extratos tissulares de ostras, inoculados com 5×10^6 pfu de poliovírus.
Linha 1: Padrão de peso molecular; Linhas 2, 3, 4 e 6 : RNA obtido de extratos tissulares de ostras; Linha 7 Controle positivo (RNA viral obtido da solução estoque de PV).
- Figura 9. Eficiência da reação de RT-PCR utilizando iniciador randômico e iniciador Polio-R na síntese do cDNA. Linhas 2 e 8: Padrão de peso molecular. Linha 3: Controle negativo Linha 6: RNA de PV amplificado com 50 pmoles de iniciador randômico. Linha 7: RNA de PV amplificado com 100 pmoles de iniciador Polio-R

Figura 10. Determinação das concentrações ideais dos componentes do tampão e do pH para a reação de PCR. Linha 1: RNA amplificado utilizando a mistura comercial PCR SuperMix®; Linha 2: Marcador de tamanho molecular; Linhas 3 a 14: RNA amplificado com os tampões 1 ao 12, respectivamente

Figura 11. Determinação do limite de sensibilidade de detecção do RNA do poliovírus por RT-PCR, utilizando a PCR SuperMix® e diferentes diluições do RNA do poliovírus da solução estoque viral e dos extratos tissulares de ostras. A: PCR SuperMix® com 1,65mM de MgCl₂. Linha 1- Padrão de peso molecular. Linha 2 e 3 - RNA do extrato de ostras na concentração de 18,4 ng. Linha 4 e 5 - RNA do extrato de ostra na concentração de 9,2ng e 4,6 ng. Linhas 7 e 8 - RNA da solução estoque de PV na concentração de 147,5 ng. B: PCR SuperMix® com 3,0mM de MgCl₂. Linha 1- Padrão de peso molecular. Linha 2 a 6- RNA da solução estoque de PV nas concentrações de 147,5ng, 73,7ng, 18,4ng, 9,2ng e 4,6ng respectivamente. Linhas 8 a 10 - RNA do extrato de ostras nas concentrações de 18,4ng, 9,2ng e 4,6 ng respectivamente.

Figura 12. Determinação do limite de sensibilidade de detecção de RNA do poliovírus por RT-PCR, utilizando os tampões 1, 2,5 e 9 e diferentes diluições do RNA do poliovírus isolado a partir dos extratos tissulares de ostras. Linha 1 - Padrão de peso molecular linhas 2 a 4 - RNA amplificado com o tampão 1 na concentração de 9,2ng, 4,6ng e 2,3ng de RNA, respectivamente; linhas 5 a 7 com tampão 2; linhas 8 a 11 com tampão 5 e linhas 11 a 13 com tampão 9.

Figura 13. Limite de sensibilidade de detecção do RNA do poliovírus isolado a partir dos extratos tissulares de ostras, utilizando os tampões 5 e 9. A: Tampão 5. Linha 1 - Padrão de peso molecular. Linhas 2 a 6 - Concentrações de RNA de 9,2; 1,1; 0,5; 0,2 e 0,1ng respectivamente. B: Tampão 9. Linha 1 - Padrão de peso molecular. Linha 2 - Controle negativo. Linhas 5 a 9 - Concentrações de RNA de 0,1; 0,2; 0,5; 1,1 e 9,2ng respectivamente.

Figura 14. Reação de RT-PCR associada à cultura celular para a detecção de poliovírus em ostras submetidas a bioacumulação. A: Extratos de ostras na concentração de $5,1 \times 10^3$ PFU/mL (Linhas 2 a 5) e $2,0 \times 10^3$ PFU/mL (Linhas 8 a 12), obtidos da bioacumulação 1 e 2. Linha 1: Padrão de peso molecular; linhas 2 e 7: Controles negativos; linhas 3 e 9: Extratos de ostras. Linhas 4 e 1: Extrato de ostra com menos de uma hora de incubação; linhas 5 e 1: 24h de incubação; linhas 6 e 12: 48h de incubação. B: Extratos de ostras na concentração de $4,2 \times 10^2$ PFU/mL (Linhas 2 a 5) obtido da bioacumulação 3. Linha 1: Padrão de peso molecular; linha 2: Controle negativo; linha 3: Extratos de ostras; linha 4: Extrato de ostra com menos de uma hora de incubação; linha 5: 24h de incubação; linha 6: 48h de incubação.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Reagentes usados nas reações de RT e de PCR nos protocolos A, B, e C.
- Tabela 2. Diferenças básicas entre os protocolos A, B e C.
- Tabela 3. Composição dos tampões do kit Opti-Prime™.
- Tabela 4. Diluições do RNA de poliovírus, isolado da solução estoque viral e suas respectivas concentrações em 5µl de amostra.
- Tabela 5. Avaliação qualitativa da toxicidade em células VERO de diferentes diluições do extrato de ostras após 24, 48 e 72h de incubação.
- Tabela 6. Resultados da recuperação do poliovírus a partir dos extratos de ostras inoculadas diretamente, utilizando o ensaio de formação de placas de lise.
- Tabela 7. Resultados da recuperação do poliovírus a partir dos extratos de ostras submetidas à bioacumulação, utilizando o ensaio de formação de placas de lise.
- Tabela 8. Comparação da sensibilidade da reação de RT-PCR utilizando o iniciador randômico e o iniciador Polio-R, em diferentes amostras de ostras semeadas com poliovírus na concentração de $6,0 \times 10^6$ pfu/ml.
- Tabela 9. Detecção do poliovírus em ostras submetidas a bioacumulação através da análise direta dos extratos, pela reação de RT-PCR.
- Tabela 10. Detecção do poliovírus em ostras submetidas à bioacumulação através da técnica associada de RT-PCR à cultura celular.

RESUMO

A água é um veículo importante na transmissão de doenças. Os moluscos bivalves, pela sua capacidade de filtração de grandes volumes de água, podem ser facilmente contaminados por diversos patógenos de origem humana, dentre eles os vírus entéricos. Estes patógenos são causa de doenças importantes como hepatite A, gastroenterites, e até doenças graves como poliomielite e meningite asséptica. Apesar deste fato constituir um sério problema de saúde pública, as normas para a avaliação da qualidade sanitária dos moluscos baseiam-se no monitoramento de coliformes fecais das águas de cultivo e/ou dos próprios animais, mesmo havendo um consenso científico de que estes indicadores não refletem a ocorrência de vírus entéricos no ambiente marinho. O controle da qualidade sanitária dos moluscos, sobretudo no que se refere à contaminação viral, reveste-se de grande importância considerando que o Estado de Santa Catarina é o maior produtor de ostras cultivadas do Brasil. Este trabalho teve como objetivo a detecção e quantificação de poliovírus em ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) experimentalmente inoculadas, através de metodologias de cultura celular e da técnica de RT-PCR. Um conjunto de ostras recebeu doses diretas de poliovírus ou foram submetidas à bioacumulação. Posteriormente, foram processadas para a obtenção dos extratos tissulares extraíndo os vírus dos tecidos das ostras e concentrando-os pela técnica de adsorção-eluição-concentração. O RNA do poliovírus, isolado a partir dos extratos tissulares, foi detectado utilizando a reação de RT-PCR. A quantificação das partículas virais infectantes nos extratos tissulares foi realizada através do ensaio de formação de placas de lise, determinando a eficiência da recuperação viral. Estas técnicas, devidamente padronizadas, foram posteriormente utilizadas para a detecção de poliovírus nas ostras submetidas a bioacumulação mediante a associação da reação de RT-PCR à cultura celular. Os resultados obtidos mostraram que a técnica utilizada para a obtenção dos extratos tissulares permitiu uma taxa de recuperação viral de 23,8%. Houve também uma eficiente remoção dos inibidores da reação de RT-PCR, demonstrado pela semelhança na eficiência de detecção do poliovírus dos extratos controles comparado aos controles sem inibidores, uma vez que ambos mostraram um limite de detecção de 0,1ng de RNA. A reação de RT-PCR foi capaz de detectar até 3,0 pfu de poliovírus nas ostras submetidas a bioacumulação. A técnica que associou a reação de RT-PCR à cultura celular

mostrou-se mais eficiente na detecção de poliovírus em ostras, na ordem de 100% quando comparada à análise direta dos extratos pela reação de RT-PCR, que variou de 20 a 60%. Com base nestes resultados, foi possível concluir que a técnica de biacumulação seguida da reação de RT-PCR associada à cultura celular, permitiram a detecção eficiente de poliovírus nas ostras, e que as mesmas poderão ser empregadas para análise de contaminação viral em amostras de campo.

ABSTRACT

The water have consistently proven to be an effective vehicle for diseases transmission. Shellfish are readily contaminated with human pathogens present in water containing sewage due to the concentrating effect of filter feeding. These pathogens, such enteric viruses, will cause hepatitis A, gastroenteritis, poliomyelitis, aseptic meningitis and other diseases. The current sanitary quality of shellfish is normally based on the analysis of fecal bacterial indicators in shellfish or in growing waters. The scientific consensus is that these indicators do not reflect the occurrence of enteric viruses in the marine environment. The sanitary control of shellfish cultivated in Santa Catarina state is important because it is the bigger producer of cultivated oysters in Brazil. The main goal of the present work was to standardize the detection and quantification of poliovirus in oysters (*Crassostrea gigas*) experimentally inoculated, using cell culture methods and RT-PCR. Oysters were directly inoculated or allowed to bioaccumulate viruses by placing them in aquaria of seawater seeded with poliovirus. The tissue extract were obtained by an adsorption-elution-precipitation method. Oysters concentrates were assayed for infectivity by plaque assay (PFU) and had the viral RNA isolated and amplified by RT-PCR reaction. An integrated cell culture-PCR methodology involving inoculation of the concentrated samples onto cell monolayers followed by RT-PCR analysis of the cell culture supernatant was used. The results showed a virus recovery of 23.8% when PFU from tissue extract was used. Inhibitors of the RT-PCR reaction were efficiently removed, proved by an equal detection limit of 0.1ng of RNA either in oysters extracts and in controls without inhibitors. When bioaccumulation was used, RT-PCR was able to detect 3,0 pfu. The integrated cell culture-PCR technique was more sensitive than directed PCR and percentage of recovery was around 100%, when compared with direct analysis of oysters extracts by RT-PCR whose percentage of recovery had a range from 20 to 60%. In general we can conclude that the optimal method for poliovirus detection is the one where bioaccumulation followed by cell culture and RT-PCR was used. These techniques can be directly applied for the detection of environmental contaminated samples.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os moluscos bivalves

1.1.1 Taxonomia e características da ostra *Crassostrea gigas*

A espécie *Crassostrea gigas* (THUMBERG, 1795) conhecida 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 (AKABOSHI & SINQUE, 1983) e tem importância mundial visto ser adaptável ao cultivo planejado (AKABOSHI *et al.*, 1982; LEES, 2000).

Com exceção de algumas espécies, os moluscos bivalves, de maneira geral, são animais sésseis que se agrupam entre eles ou se fixam a superfícies submersas, encontrando-se em grande densidade em áreas produtivas. As espécies, como ostras e mexilhões, estão adaptadas para permanecer por algum período fora da água, fechando fortemente as valvas e retendo o ambiente úmido necessário à sobrevivência de seus tecidos.

Como a maioria dos bivalves, a espécie *Crassostrea gigas* é um organismo filtrador que se alimenta de partículas microscópicas depositadas ou em suspensão na água, bombeando-as através da cavidade do manto, passando pelas brânquias ciliadas, sendo que estas são pregueadas e funcionam como um filtro, classificando pequenas partículas orgânicas, algas microscópicas e outros microrganismos planctônicos. Essas partículas entram nas glândulas digestivas onde ocorre a seleção alimentar: as partículas alimentares nutritivas passam para o trato gastrointestinal e as partículas não selecionadas são rejeitadas através da abertura inalante, na forma de pseudofeces (MEGLITSCH & SCHRAM, 1991; LEVINTON, WARD, THOMPSON, 1996).

Devido ao hábito alimentar filtrante destes moluscos, também é possível que os mesmos absorvam e bioacumulem em seus tecidos, diversos patógenos humanos, tais como vírus entéricos, bactérias, protozoários, e helmintos (AHMED, 1992; NATIONAL ADVISORY COMMITTEE, 1992; JAYKUS, HEMARD, SOBSEY, 1994; ROMALDE *et al.*, 1994; LEES, 2000), além de contaminantes químicos, tais como traços de metais (arsênio, zinco, cobre e mercúrio), metais pesados (chumbo), compostos organoclorados e elementos

radioativos (ANDERSEN, MAAGE, JOHANNSEN, 1996; LEE, KRUSE, WASSERMAN, 1996; ST. JEAN *et al.*, 1999). Por esta razão, 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).

1.1.2 Cultivo de moluscos em Santa Catarina

Os moluscos têm desempenhado um importante papel na alimentação dos povos americanos desde os tempos mais remotos (WITHMAN & FLICK, 1995; LEES, 2000).

O litoral catarinense caracteriza-se por apresentar condições favoráveis ao cultivo de moluscos marinhos, como as águas mais frias, que variam de acordo com as exigências da espécie, além de facilidades geológicas caracterizadas pela vasta quantidade de baías que propiciam condições ideais de crescimento devido à grande quantidade de nutrientes ali presentes (NASCIMENTO, 1983; WINKLER *et al.*, 1998).

O cultivo de ostras e mexilhões tem apresentado um crescimento significativo no Estado a partir de 1990 (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1995), constituindo assim uma importante opção de trabalho, renda e fixação no local de origem das populações de pescadores artesanais, além de proporcionar uma dieta alimentar nutritiva, constituída por proteínas, sais minerais e vitaminas (MAGALHÃES, 1985; VINATEA, 2000).

As atividades de cultivo colocam o Estado de Santa Catarina como líder nacional na produção de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*Perna perna*), tendo sido responsável, no ano de 1998, pela produção de 314 e 7.720 toneladas, respectivamente (BOLL, ROCZANSKI, SILVEIRA, 1999). Na safra 1999/2000, somente o município de Florianópolis produziu 505.060 dúzias de ostras, sendo responsável por 83,3% do total de ostras produzidas no Estado (ROCZANSKI *et al.*, 2000).

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

O controle da qualidade sanitária dos produtos da maricultura no Estado de Santa Catarina se faz necessário, por ser esta uma atividade em crescimento e de importância econômica e social.

Algumas dificuldades enfrentadas, entre outras, é a poluição por despejo de esgotos clandestinos. Segundo nota do Diário Catarinense de 29 de junho de 1999, é possível detectar as saídas destes nas praias de Cacupé, Santo Antônio de Lisboa, Sambaqui e Barra de 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 pelos moradores.

A água, reconhecida como veículo potencial para a transmissão de inúmeras doenças, possibilita a contaminação dos moluscos com uma grande variedade de patógenos humanos. Esses são rapidamente contaminados devido à sua capacidade de filtrar grandes quantidades de água, em períodos relativamente curtos, concentrando estes patógenos nos seus tecidos em níveis maiores que o das águas que os circundam. Por esta razão, somente o exame microbiológico das águas de cultivo não prediz exatamente os níveis da contaminação por patógenos humanos nestes organismos. Desta forma, torna-se necessário o exame dos próprios moluscos, para determinar de maneira confiável a real possibilidade de contaminação dos mesmos (AHMED, 1992; NATURAL ADVISORY COMMITTEE, 1992; BOUCHRITI & GOYAL, 1993; JAYKUS *et al.*, 1994; WITHMAN & FLICK, 1995; CROMEANS, NAINAN, MARGOLIS, 1997; LEGGIT & JAYKUS, 2000).

As normas para a avaliação da qualidade sanitária dos frutos-do-mar cultivados baseiam-se no monitoramento dos níveis de coliformes fecais das águas de cultivo e/ou dos próprios animais (CONAMA, 1986; GAMA *et al.*, 1989; BOSCH, PINTO, ABAD, 1995; LE-GUYADER *et al.*, 2000).

No Brasil, a partir de 1995, o Instituto do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA) delegou aos aquicultores o controle sanitário dos moluscos cultivados, bem como das águas na área de influência do empreendimento. Em face da ausência de uma 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; SUPLICY, 1998).

Existem sérias críticas sobre a utilização deste parâmetro único, baseadas no fato de que, amostras de água ou frutos-do-mar, contendo níveis aceitáveis de coliformes fecais podem estar contaminadas por vírus. Vários relatos demonstraram que surtos de distúrbios gastrointestinais tiveram origem na ingestão de frutos-do-mar, mesmo quando sua qualidade bacteriológica havia sido atestada (GERBA *et al.*, 1980; SOBSEY, DAVIS, RULLMAN, 1987; KANAMOTO *et al.*, 1993; ROSE & SOBSEY, 1993; RIPPEY, 1994; REYNOLDS, GERBA, PEPPER, 1997; PINA *et al.*, 1998; LEES, 2000; LEGEAY *et al.*, 2000).

BOHER & SCHWARTZBROD (1993) demonstraram que a cinética de liberação de bactérias, principalmente coliformes fecais nos processos de depuração, é mais rápida do que a dos vírus. BOSCH *et al.* (1995) relataram que, segundo as condições experimentais utilizadas, períodos maiores do que 36h de depuração são necessários para a total eliminação de patógenos virais. Estes fatos parecem explicar o motivo pelo qual, ostras com qualidade sanitária atestada através da determinação dos níveis de coliformes totais, podem ser responsáveis pela transmissão de doenças virais.

Muitas epidemias de origem alimentar, relacionadas ao consumo de moluscos têm sido relatadas pelos órgãos responsáveis pela saúde pública de vários países (ATMAR *et al.*, 1993; CHRISTENSEN *et al.*, 1998; PINA *et al.*, 1998; SCIPIONE, DAUBE, THIRY, 2000).

A transmissão de doenças relacionadas ao consumo de moluscos contaminados foi reconhecida, pela primeira vez, em 1956, através de um grande surto de hepatite A, associado ao consumo de mariscos. Desde então, evidências epidemiológicas, vinculadas à transmissão de doenças virais, continuam a aumentar, todas elas relacionadas ao consumo de muitas espécies de moluscos bivalves contaminados inclusive a espécie *Crassostrea gigas* (GILL *et al.*, 1983; METCALF, MELNICK, ESTES, 1995; LEGEAY *et al.*, 2000; LEES, 2000). Estudos epidemiológicos indicam que o maior risco de contaminação recai no consumo de bivalves crus, como aconteceu em Shangai, China, no ano de 1988, com cerca de 300.000 casos de hepatite A, sendo esta a maior epidemia até então documentada (GERBA, 1988; BOHER & SCHWARTZBROD, 1993; LEES, 2000). No ano de 1994,

foram relatados 1.000 casos de hepatite A na Itália, dos quais 62% estavam relacionados ao consumo de moluscos (CROCI *et al.*, 2000). Na Noruega e na Dinamarca, durante os anos de 1996 e 1997, foram também relatados 656 casos de pessoas infectadas pelo vírus tipo Norwalk (NLV), por terem consumido ostras certificadas de acordo com os padrões europeus de análise bacteriológica (CHRISTENSEN *et al.*, 1998).

Devido a isto tem-se reconhecido que as regras em uso são aparentemente incapazes de garantir proteção ao consumidor ou de prevenir surtos, motivando uma crescente preocupação, não somente dos órgãos encarregados da saúde pública, mas também das indústrias alimentícias, incluindo a maricultura (JAYKUS, DE LEON, SOBSEY, 1993; METCALF *et al.*, 1995; LEES, 2000; SCIPIONI *et al.*, 2000).

1.2 Os vírus entéricos

Os vírus entéricos encontram-se distribuídos em todas as partes do mundo e são causadores de muitas doenças que afetam o ser humano, tais como gastroenterites, meningites, paralisias, miocardites, hepatites infecciosas, etc. Estes vírus são transmitidos pela via feco-oral. Posteriormente à ingestão pelo homem, os vírus entéricos replicam-se no trato gastrointestinal e são excretados nas fezes em grandes quantidades (10^6 a 10^{10} partículas virais por grama) pelos indivíduos infectados e podem, quase sempre, ser detectados em efluentes de esgotos domésticos (ROTBART, 1991; MUIR *et al.* 1998; PINA *et al.* 1998; ARNAL *et al.*, 1999; SOULE *et al.*, 2000). No meio ambiente, estes vírus são capazes de se agregar rapidamente às partículas sólidas, protegendo-se desta forma dos fatores inativadores do ambiente, o que favorece sua sobrevivência. Estes vírus possuem uma certa resistência aos agentes físico-químicos de desnaturação, podendo sobreviver de 2 a 130 dias na água do mar. Este período é maior do que o encontrado para coliformes fecais em ambientes similares (TRABELSI *et al.*, 1995; NICAND, TEYSSOU, BUISSON, 1998).

Entre os vírus entéricos mais importantes, transmitidos pelos moluscos e outros alimentos ao homem, encontram-se os calicivírus, astrovírus, rotavírus, adenovírus, enterovírus e os vírus das hepatites A e E (LEES, 2000; SCIPIONI *et al.*, 2000).

A Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental descreve o grupo dos vírus entéricos como sendo o mais significativo, confiável e eficiente modelo a ser usado para monitoramento ambiental (PUIG *et al.*, 1994; BOSCH *et al.*, 1996).

1.3 O vírus da poliomielite (poliovírus)

A família Picornaviridae é uma das maiores e mais importantes famílias dos vírus entéricos, e inclui o gênero *Enterovirus*. Estes vírus possuem genoma de RNA fita simples não segmentada. O vírion mede aproximadamente 27nm de diâmetro, é geralmente arredondado e não envelopado. Neste gênero estão descritos 66 diferentes sorotipos, responsáveis por infecções em humanos, incluindo os poliovírus, cocksackievírus A e B, echovírus e, mais recentemente, os enterovírus sorotipos 68 ao 71 (LEES, 2000). O local normal de replicação destes vírus é o trato intestinal, onde a infecção é com frequência leve ou assintomática. Por esta razão, este grupo não tem sido considerado importante em comparação à outros. No entanto, em muitos casos, os vírus podem atingir outros órgãos provocando doenças sérias e às vezes fatais. Os enterovírus estão comumente relacionados à casos de doenças crônicas como miocardite, síndrome da fadiga crônica, diabete mellitus dependente de insulina, ou outras mais graves como meningite asséptica e conjuntivite hemorrágica, entre outras. Também podem provocar alguns sintomas agudos envolvendo o sistema nervoso central, pâncreas, músculo esquelético, pele e mucosas (MUIR *et al.*, 1998).

Cabe ressaltar que, embora os enterovírus se repliquem no trato intestinal e sejam transmitidos pela via feco-oral, estes não produzem os sintomas típicos de gastroenterite, como vômitos e diarreia, mas são excretados em grande número nas fezes pelos indivíduos infectados.

Devido à sua prevalência e a facilidade de crescimento em células em cultura, os enterovírus têm uma longa história de uso como marcadores de poluição ambiental. Muitos trabalhos relatam o isolamento destes vírus em esgotos, águas poluídas e em moluscos bivalves, (JAYKUS *et al.*, 1994; LEES, 2000; LE GUYADER *et al.*, 2000; HONG BAEK *et al.*, 2000).

Ao gênero *Enterovirus* pertence o vírus da poliomielite, também conhecido como poliovírus. Os estudos com esse vírus começaram em 1908, mas somente muitos anos depois ele foi incluído no grupo dos vírus entéricos (ROMERO & ROTBART, 1993).

Os poliovírus são vírus não envelopados, com um capsídeo icosaédrico que circunda o material genômico constituído de uma fita simples de RNA (~7500 pb) cuja extremidade 5' apresenta-se ligada à proteína codificadora viral (VPG), e na extremidade 3' encontra-se uma cauda poliadenilada. Uma região não codificadora (~750 pb) na extremidade 5' precede a região codificadora de uma proteína simples, a poliproteína. As proteínas estruturais (VP 1-4), que formam o capsídeo da partícula viral, são codificadas antes das proteínas não-estruturais (P2 A-C; P3 A-D), envolvidas na replicação do genoma viral (MINOR, 1999; FRIEDRICH, 2001)

O poliovírus é classificado sorologicamente em três sorotipos, designados pelos números 1, 2 e 3, baseados na natureza antigênica do capsídeo. A infecção causada pelo poliovírus é um exemplo de doença com alta taxa de infecção assintomática, mas podem ocorrer também desde sintomas leves, semelhantes aos de uma gripe, até sintomas graves evoluindo para meningite e paralisia. A transmissão da infecção é por via feco-oral. O vírus multiplica-se na faringe e no intestino delgado, espalha-se pelos linfonodos até a corrente sanguínea, ocorrendo viremia e dissemina-se pelo corpo; em alguns casos, o sistema nervoso central é envolvido. Neste caso os neurônios do sistema nervoso central são seletivamente destruídos, enquanto os neurônios sensoriais ficam intactos. Os sintomas incluem a paralisia dos membros inferiores, mais do que dos superiores e geralmente, um lado é mais afetado do que o outro. O período de incubação é de 1 a 2 semanas ou entre três dias a um mês (WHITE & FENNER, 1995; MINOR, 1999).

Antes da introdução das vacinas Salk e Sabin, o vírus encontrava-se amplamente disseminado nas populações humanas. A vacina oral de poliovírus (OPV) consiste das cepas selvagens dos três sorotipos, atenuadas pela passagem seriada dos vírus em células de macaco *in vitro* e *in vivo*. Estas cepas perdem sua neurovirulência, mas não sua capacidade de replicação no intestino delgado, induzindo uma proteção tipo-específica contra poliovírus neurovirulentos. Apesar das muitas vantagens do uso da OPV, estudos têm demonstrado alguns problemas a serem avaliados antes de se declarar a erradicação do vírus e o cessamento das vacinações. Uma das desvantagens da OPV é que esta provoca,

embora raramente, a doença chamada de poliomielite parálitica associada à vacina (VAAP) (SOULE *et al.*, 2000; FRIEDRICH, 2000). Isto foi explicado em função do isolamento de vírus de amostras de fezes ou do sistema nervoso central de pacientes vacinados que haviam sofrido modificações genômicas com suspeitas de que estas mutações tivessem contribuído no incremento da neurovirulência. No entanto, modificações similares do genoma viral foram encontradas também em pessoas vacinadas saudáveis. Estes fatos revelam que a resposta imunológica do hospedeiro ainda está envolvida no estabelecimento ou não da doença associada à vacinação (FRIEDRICH, 1998 e 2000). Da mesma forma, a análise molecular de poliovírus derivados da OPV, isolados de amostras ambientais, revelaram modificações por mutações e recombinações (MUSCILLO *et al.*, 1997; DIVIZIA *et al.*, 1999) . Diversos estudos indicam que é importante considerar a possibilidade de infecções persistentes em pacientes imunodeprimidos e, a excreção de poliovírus derivados de OPV por longos períodos, que poderiam ser transmitidos à populações não imunizadas (GRABOW *et al.*, 1999; KIMMAN, KOOPMANS, VAN DER AVORT, 1999; FRIEDRICH, 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem como meta erradicar totalmente a poliomielite em 2003, mas pelos problemas acima citados, a sobrevivência no ambiente, tanto do poliovírus tipo selvagem como das cepas vacinais, que possam ser fonte de infecção para os humanos no futuro, devem ser alvo da vigilância ambiental constante como sugerido pela própria OMS (SHIEH, BARIC, SOBSEY, 1997; MINOR, 1999; DIVIZIA *et al.*, 1999; FRIEDRICH, 2000). A OMS recomenda ainda que as pesquisas devam ser direcionadas para melhorar as metodologias de detecção de poliovírus no ambiente (GRABOW *et al.*, 1999).

Nos estudos epidemiológicos das enteroviroses, o poliovírus é o melhor exemplo estudado (MELNICK, 1996 a, b). A escolha do poliovírus como indicador de contaminação ambiental ocorre devido à sua prevalência no meio ambiente, decorrente do fato de que este vírus faz parte do esquema mundial de vacinação humana (GOYAL & GERBA, 1983; KRIKELIS *et al.*, 1985; PINA *et al.*, 1998).

As cepas de poliovírus usadas para a padronização do monitoramento ambiental são vacinais e, por isso, não há risco de contaminação humana na sua manipulação em laboratórios. Os poliovírus também apresentam a vantagem de se replicar com facilidade e

rapidamente em cultura celular, produzindo efeito citopático característico. Várias linhagens celulares são permissivas à infecção desse vírus, como por exemplo, células VERO, BGM e BGMK (KOEPCKA *et al.*, 1993; TANI *et al.*, 1995; CHEZZI, 1996; JAYKUS *et al.*, 1993), dentre outras.

1.4 Metodologias disponíveis para a detecção da contaminação viral em águas e moluscos.

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

Geralmente, os vírus no ambiente se encontram em pequenas quantidades ou muito dispersos e não podem ser detectados se as amostras de água ou de frutos-do-mar não forem previamente processadas para que estes vírus sejam concentrados. Moluscos contaminados no ambiente com vírus entéricos podem conter de 0,2 a 224 partículas infecciosas em cada 100 gramas de carne. (WILLIAMS & SHAY FOUT, 1992 SHIEH *et al.*, 1999; LEGEAY *et al.*, 2000; SCIPIONE *et al.*, 2000).

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 contaminados, com o objetivo de aumentar a eficácia da recuperação viral e da detecção de quantidades virais mínimas além de minimizar o efeito citotóxico e eliminar os inibidores das reações de amplificação gênica (LEWIS & METCALF, 1988; BOUHRITI & GOYAL, 1993; SHIEH *et al.*, 1999; ARNAL *et al.*, 1999; BARARDI *et al.*, 1999; LEGEAY *et al.*, 2000; SANTOS, 2000; SANTOS *et al.*, 2001).

A maioria destes métodos utilizam a semeadura artificial dos tecidos de moluscos com quantidades conhecidas de vírus, seguida de processos de concentração e de detecção viral. Três formas de infecção artificial já foram descritas: a primeira baseia-se na inoculação de vírus num homogeneizado de tecido dos moluscos, a segunda consiste na inoculação direta de vírus nos tecidos dos moluscos (SOBSEY, WALLIS,

MELNICK, 1975; METCALF, MOULTON, ECKERSON, 1980, LEWIS & METCALF, 1988, BARARDI, *et al.*, 1999; SHIEH *et al.*, 1999; SANTOS 2001) e a terceira mimetiza o ambiente natural desses animais, deixando-os em aquários com água de mar semeada com quantidades conhecidas de vírus (VAUGHN *et al.*, 1979; LANDRY, VAUGHN, VICALE, 1980; COOK & ELLENDER, 1986; ATMAR *et al.*, 1993; CROMEANS *et al.*, 1997; ARNAL *et al.*, 1999; LEGEAY *et al.*, 2000).

Os métodos de extração viral a partir de tecidos dos moluscos, chamados também de métodos de concentração, envolvem uma combinação de etapas consecutivas a fim de eluir os vírus, separando-os dos tecidos dos moluscos e concentrando-os em volumes suficientemente pequenos, passíveis de serem processados para a identificação viral (LEWIS & METCALF, 1988; BOUCHRITI & GOYAL, 1993; JACKUS *et al.*, 1996; HENSHILWOOD *et al.*, 1998; PINA *et al.*, 1998; SHIEH *et al.*, 1999). De maneira geral, os pesquisadores afirmam que o método ideal deve ser rápido, simples e permitir uma recuperação viral alta e eficiente para várias espécies de organismos. De qualquer forma, uma revisão das metodologias existentes demonstrou que nenhuma delas é igualmente efetiva para produtos marinhos de diferentes lugares geográficos, sugerindo que os ensaios devam ser previamente padronizados em condições laboratoriais, antes de serem aplicados para amostras de campo (BOUCHRITI & GOYAL, 1993; LEES, 2000; SCIPIONE *et al.*, 2000).

A quantificação das partículas virais, através do ensaio de formação de placas de lise, é um método bastante utilizado para os vírus que se replicam *in vitro* (SMITH *et al.*, 1979; CROMEANS *et al.*, 1997; SHIEH *et al.*, 1999). Essa metodologia oferece uma quantificação precisa da infectividade viral, porque permite contar o número de partículas virais infectantes visualizadas como áreas claras, não coradas, em uma camada celular imortalizada (BURLINSON, CHAMBERS, WIEDBRAUK, 1992; KINCHINGTON, KANGRO, JEFFRIES, 1995; MELNICK, 1996b). Experimentos que utilizam a semeadura artificial da água ou dos frutos-do-mar, para posterior detecção por métodos moleculares, utilizam esta técnica para determinar a porcentagem de recuperação das partículas virais ao longo dos processos de extração e concentração (GAJARDO *et al.*, 1995).

O procedimento padrão proposto para isolamento e cultivo de enterovírus humanos, provenientes de águas ou frutos-do-mar, inclui cultura celular. No entanto, isto não é

aplicável para a detecção de vírus de difícil adaptação em cultura, como o vírus da hepatite A e o vírus Norwalk (ZHOU *et al.*, 1991; CROMEANS *et al.*, 1997; HENSHILWOOD *et al.*, 1998; LEES, 2000). A cultura celular apresenta dificuldades como a de distinguir entre vários tipos de vírus, longos períodos de tempo requeridos para adaptação ao cultivo *in vitro*, alto custo e baixa sensibilidade de detecção (MOORE & MARGOLIN, 1993; REYNOLDS, GERBA, PEPPER, 1996; CROMEANS *et al.*, 1997; REYNOLDS *et al.*, 1997; DIVIZIA *et al.*, 1998; ABBAZADEGAN, STEWART, LÉ CHEVALIER, 1999). A cultura celular permanece ainda como técnica primária para ensaios de recuperação viral a partir de águas ou dos tecidos de moluscos, envolvendo a quantificação da citopatogenicidade viral, através do ensaio de formação de placas de lise (pfu), da contagem do número de partículas virais capazes de infectar 50% das células (TCID₅₀), ou da utilização da técnica de imunofluorescência (WILLIAMS & SHAY FOUT, 1992; DAHLING, 1993; CROMEANS *et al.*, 1997; REYNOLDS *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2002).

A amplificação gênica pela reação de PCR permite a detecção de pequenas quantidades de seqüências de DNA ou RNA, usualmente encontradas em amostras ambientais. Ela tornou-se imprescindível para a detecção de vírus contaminantes destas amostras e rotineiramente difíceis de identificar, como o vírus da hepatite A, vírus Norwalk e rotavírus (GREEN & LEWIS, 1999; LEES, 2000).

A desvantagem é que, pela aplicação dessa técnica, não se pode distinguir se a amplificação das seqüências gênicas virais provém de partículas infecciosas ou não, o que provoca dúvidas quanto ao valor do resultado positivo para o monitoramento ambiental, quando utilizado como parâmetro único (ABBASZADEGAN *et al.*, 1993; LEES, HENSHILWOOD, DORÉ, 1994; MA, GERBA, PEPPER, 1995; REYNOLDS *et al.*, 1996; PINA *et al.*, 1998; REYNOLDS *et al.*, 2001).

Outra limitação é a presença freqüente de inibidores nas amostras. A carne dos moluscos representa uma matriz muito complexa quimicamente, contendo muitos compostos que podem interferir na eficiência do PCR, como os carboidratos (particularmente glicogênio) (HURTZ *et al.*, 1997; SHIE *et al.*, 1999; ARNAL *et al.*, 1999). Solutos orgânicos e inorgânicos podem também 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 seqüestram os íons magnésio e se ligam aos nucleotídeos requeridos pelas enzimas da reação de PCR (ABBASZADEGAN *et al.*, 1993; SCHWAB, LEON, SOBSEY, 1996; WILSON, 1997; SHIEH *et al.*, 1999).

Apesar dessas desvantagens, o PCR é um método atraente para a rotina de monitoramento de vírus entéricos humanos presentes nos frutos-do-mar, já que, uma vez padronizado, é mais rápido, simples e menos dispendioso do que os métodos de cultura celular (ABBASZADEGAN *et al.*, 1993; STRAUB *et al.*, 1994; CHEZZI, 1996; GANTZER, 1997; ARNAL *et al.*, 1999; GREEN & LEWIS, 1999; REYNOLDS *et al.* 2001).

Em vista dos problemas apresentados por ambas as técnicas, numerosos pesquisadores vêm desenvolvendo metodologias alternativas que possam melhorar a eficácia da análise de contaminantes virais nas amostras ambientais. A associação da reação de RT-PCR à cultura celular tem surgido como forma de integrar as vantagens de cada técnica, e tentar contornar os principais problemas de ambas.

Como foi mencionado anteriormente, a presença de inibidores na reação de PCR, constitui um dos maiores problemas enfrentados pela técnica; além disso esta reação se limita a análise de pequenos volumes de amostra. Os volumes típicos utilizados na reação de PCR são na ordem dos microlitros, mesmo que a amostra analisada, em princípio, seja grande (50g) o volume final da amostra, após concentração, geralmente está na ordem dos mililitros. Estas desvantagens podem provocar, muitas vezes, resultados falso-negativos. Pela associação das duas técnicas, a probabilidade destes resultados acontecerem é minimizada, como observado por REYNOLDS *et al.*, 1996, 1997 e 2001; BLACKMER *et al.*, 2000; SEUNH-HOON & SANG-JONG, 2002).

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- Contribuir para o desenvolvimento da maricultura no estado de Santa Catarina, no que se refere ao monitoramento da qualidade sanitária das ostras produzidas em cultivo, a fim de possibilitar a certificação do produto e, assim garantir a sua comercialização sem riscos para a saúde pública.
- Padronizar metodologias que possam ser aplicadas rotineiramente na avaliação da qualidade microbiológica de ostras cultivadas, nas condições de trabalho disponíveis no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, usando o poliovírus do tipo 2 e a ostra-do-pacífico (*Crassostrea gigas*) como modelo.

Objetivos específicos:

- Avaliar a eficiência da técnica de extração e de concentração viral, a partir de ostras experimentalmente inoculadas com poliovírus, por inoculação viral direta e pela técnica de bioacumulação, através da determinação da taxa de recuperação de poliovírus viáveis, utilizando o ensaio de formação de placas de lise.
- Avaliar a eficiência da técnica de extração e purificação de RNA isolados a partir de extratos tissulares de ostras, através da remoção de inibidores da reação de RT-PCR.
- Aplicar a técnica de RT-PCR e avaliar a sensibilidade da mesma na detecção de poliovírus em ostras experimentalmente inoculadas, de forma direta e pela técnica de bioacumulação.
- Propor uma metodologia que associe a técnica de RT-PCR às de cultura celular para detecção de poliovírus em ostras submetidas a bioacumulação experimental, visando sua aplicação no monitoramento da contaminação ambiental das ostras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais biológicos

3.1.1 Células

Foram utilizadas células VERO (ATCC: CCL81) originárias de fibroblastos de rins do macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*). Estas células são permissivas à infecção *in vitro* pelo vírus da poliomielite, apresentando efeito citopático de fácil observação ao microscópio óptico (HU & HSIUNG, 1989).

3.1.2 Vírus

O vírus utilizado foi o poliovírus (PV) sorotipo 2 vacinal (Polio-2, Instituto Adolfo Lutz, SP).

3.1.3 Ostras

Foram utilizadas ostras da espécie *Crassostrea gigas* provenientes de cultivos realizados na praia de Sambaqui, situada na baía norte da Ilha de Santa Catarina, município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina.

3.2 Metodologias para a cultura de células

3.2.1 Cultivo de células VERO

As células foram cultivadas em garrafas descartáveis de 25 e 75 cm², em meio completo 199 (Sigma). Para o preparo deste meio foram dissolvidos 9,9 g do reagente em pó e 2,2 g de bicarbonato de sódio (Sigma), em 1L de água Milli-Q. O meio foi filtrado através de membrana Millipore estéril (0,22µm), e estocado a 4°C. O meio assim

reconstituído foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL) para crescimento das células, 5% para manutenção de subculturas e 1% para propagação viral. A fim de prevenir contaminação bacteriana e fúngica, foi adicionada 1% de uma solução de penicilina-100µg/ml, estreptomicina-100µg/ml e anfotericina B-0,25µg/ml (Gibco BRL).

As subculturas (passagens sucessivas para manutenção da viabilidade celular) foram produzidas a partir de células que haviam atingido confluência. O meio de cultura das garrafas foi removido e o tapete celular lavado 3X com tampão salina fosfato estéril (PBS: NaCl 150mM; KH₂PO₄ 1,5mM; Na₂HPO₄ 20mM; KCL 27mM; pH 7,2). Em seguida, as células foram tratadas enzimaticamente pela adição de 0,5ml ou 1,0ml (garrafas de 25 e 75cm², respectivamente) de tripsina (1:250 Sigma) na forma de solução a 0,05% (NaCl 0,8%; KCl 0,04%; Dextrose 0,1%; NaHCO₃ 0,058%; EDTA 0,02% e vermelho de fenol 0,045%). Após desagregação do tapete, as células foram ressuspensas em meio de cultura e distribuídas em novas garrafas, as quais foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. As observações microscópicas foram feitas diariamente para verificar a formação da monocamada celular, descartar contaminações ou esgotamento de nutrientes e determinar, o momento adequado para uma nova subcultura.

3.2.2 Preparação das suspensões estoques de poliovírus

Células VERO foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 75 cm² até atingirem confluência. O meio de crescimento foi retirado e as células lavadas 3X com PBS. Em seguida, a monocamada celular foi inoculada com 1,0ml de uma suspensão estoque do vírus da poliometelite (não quantificado) e incubadas durante 60min a 37°C para permitir a adsorção das partículas virais às células. Após este período, o inóculo viral foi removido e as células suplementadas com meio 199 contendo 1% de soro fetal bovino, sendo incubadas sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera de CO₂ já mencionadas.

A observação microscópica das células foi realizada a cada ciclo de replicação (8, 16 ou 24h), verificando o efeito citopático característico de células infectadas. Quando ocorreu a destruição total do tapete celular, o frasco de cultura foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C, por 3X consecutivas, para completar a lise celular e provocar a

liberação total dos vírions. O conteúdo foi posteriormente centrifugado a 1000Xg, durante 20min a 4°C, para eliminar os restos celulares. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado em tubos estéreis e estocado a - 80°C. Neste trabalho, o sobrenadante assim obtido foi chamado de solução estoque de PV.

3.2.3 Determinação do título infeccioso viral

O título infeccioso de uma suspensão viral corresponde ao número de partículas virais, por unidade de volume, capazes de infectar células permissivas. O título infeccioso do estoque viral produzido neste trabalho foi determinado através do método de contagem de placas de lise (pfu), descrito por BURLINSON *et al.* (1992) e KINGCHINGTON *et al.* (1995).

Células VERO, na densidade aproximada de 2×10^5 células/ml, foram cultivadas em placas de 24 cavidades com meio 199 suplementado com 5% de SFB, até atingirem confluência (aproximadamente 24h). A suspensão viral foi diluída de forma seriada (razão geométrica 1:10) em meio 199 sem SFB e com antibióticos/antifúngico. O meio foi aspirado e 500µl das diferentes diluições foram adicionadas a cada cavidade (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 60min e a cada 15min foram suavemente agitadas para uma melhor distribuição da amostra. Após esse período, o inóculo foi removido e adicionou-se 1,0ml da seguinte solução: meio 199 2X + solução aquosa a 1,5% de carboximetilcelulose na proporção 1:1. As placas foram então incubadas por 24h, com 5% de CO₂ a 37°C. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 500µl do corante preto de naftaleno (Sigma) preparado da seguinte forma: 0,1g do corante foram diluídos em 100ml de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v), pH 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel de filtro e estocada a 4°C. As células foram incubadas com o corante durante 30min à temperatura ambiente, sob agitação. Após este período, o corante foi aspirado e as mesmas deixadas para secar ao ambiente.

Para calcular o título infeccioso viral foram escolhidas as diluições que apresentavam um número discreto de focos de infecção, caracterizados por áreas claras de

lise celular, chamadas de placas. Estas foram contadas com ajuda de microscópio estereoscópico.

Segundo BURLINSON *et al.* (1992), o título infeccioso é expresso através do número de unidades formadoras de placas/ml (pfu/ml) e, portanto, de partículas virais, já que, teoricamente, cada placa é iniciada pela infecção de um único vírus. O título viral foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de placas} \times \text{recíproca de diluição} \times \text{recíproca do volume em ml}$$

3.3 Inoculação artificial das ostras com poliovírus

3.3.1 Inoculação direta nos tecidos das ostras

Com a finalidade de padronizar uma metodologia sensível para a detecção de PV em ostras, foi realizada a inoculação direta do vírus nas ostras seguindo a metodologia descrita por CROMEANS *et al.* (1997); BARARDI *et al.* (1999) e SANTOS *et al.* (2001).

As valvas das ostras foram lavadas e escovadas cuidadosamente com água potável, desinfetadas com uma solução aquosa de álcool etílico comercial 70% (v/v) e secas ao ar durante 30min. Posteriormente, as valvas foram abertas com o auxílio de uma faca previamente autoclavada, e os tecidos e fluidos das ostras foram coletados em tubos de 50ml estéreis.

Cada duas ostras (aproximadamente 12 a 20g de tecido vivo de cada uma) foram consideradas como uma amostra. Com o auxílio de ponteiros de micropipetas, as ostras foram inoculadas com a solução estoque de poliovírus (10^5 a 6×10^6 pfu de PV) em três lugares distintos da região gastrointestinal (Figura 1A). Para permitir a adsorção dos vírus aos tecidos das ostras, as mesmas foram deixadas à temperatura ambiente durante 30min. Após este tempo, as ostras estavam em condições de serem processadas para extração dos vírus dos seus tecidos, pelo método de eluição e precipitação.

3.3.2 Bioacumulação

A capacidade das ostras de bioacumularem partículas em suspensão durante o processo de filtração permitiu inocular de forma indireta as ostras com PV, ou seja semeando a água do mar com quantidades conhecidas do vírus.

Em um aquário de vidro com tampa, foram colocados 20L de água do mar filtrada (cartucho de algodão de 5 μm) e algas unicelulares da espécie *Tetraselmis tetrahele* na concentração aproximada de 6×10^4 células/ml, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC. Esta mistura foi homogeneizada mediante aeração durante todo o ensaio. A água do mar, assim preparada, foi semeada com a suspensão estoque do PV e deixada por 15min para permitir que as partículas virais se aderissem às microalgas. Após este tempo, uma dúzia de ostras de aproximadamente 20g de peso vivo, previamente lavadas e escovadas abundantemente com água potável, foram colocadas no aquário e deixadas durante 20h para que ocorresse a bioacumulação das partículas virais pelas ostras. Foram realizados ao todo quatro ensaios, denominados a partir de agora de bioacumulação 1, 2, 3 e 4, nos quais somente variaram as concentrações do PV inoculados. Foram assim semeados 100, 50, 10 e 1ml da suspensão viral na água do mar (5×10^4 ; $2,5 \times 10^4$; 5×10^3 ; 5×10^2 pfu/ml de água do mar, respectivamente) (Figura 1B).

Controles negativos também foram realizados para cada ensaio de bioacumulação, os quais consistiram de duas ostras colocadas em recipientes com tampa e submetidas às mesmas condições descritas acima, mas sem adição da suspensão viral. Estes recipientes foram colocados em ambiente distinto do aquário teste para evitar possíveis contaminações por aerossolização.

Após as 20h de bioacumulação, as ostras (controles e experimentais) foram retiradas dos aquários, lavadas com água potável e com uma solução aquosa de álcool etílico comercial 70%. Após 30min para secagem das conchas, as ostras foram abertas e os tecidos e fluidos das mesmas foram coletados em tubos e estocados a -80°C até seu processamento.



Figura 1: Inoculação artificial das ostras com poliovírus.
(A) inoculação direta do poliovírus nos tecidos das ostras;
(B) bioacumulação do poliovírus pelas ostras.

3.4 Processamento das ostras para obtenção dos extratos tissulares

Este processo tem a finalidade de liberar os vírus adsorvidos nos tecidos das ostras e, posteriormente, concentrá-los em pequenos volumes. O produto final obtido após o processamento é chamado neste trabalho de “extrato tissular de ostras”.

A preparação dos extratos tissulares foi realizada conforme LEWIS & METCALF (1988); BARARDI *et al.* (1999) e SANTOS *et al.* (2001), com modificações. Os tecidos de duas ostras (aproximadamente 20g cada uma) foram transferidos para uma garrafa estéril tipo Schott de 250ml de capacidade, contendo 100ml de uma solução gelada de meio triptose fosfato (TPB) a 10% (v/v), preparado em solução aquosa de glicina 0,05M, pH 9, triturados e homogeneizados com o triturador Ultra-Turrax T25 Basic, IKA®, durante 30seg a 24.000rpm. A suspensão resultante foi agitada a 250rpm por 30min a 4°C, e centrifugada a 10.000Xg por 30min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido em garrafa estéril idêntica à anterior, o pH ajustado para 7,5 e acrescido de uma solução de polietilenoglicol (Sigma), (PEG 8000 50% p/v preparado em TPB 10%) na concentração final de 8%. A mistura foi agitada por 16h a 4°C e novamente centrifugada a 10.000Xg durante 20min a 4°C. 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 8000 foram dispersas por ultra-som no aparelho Sonic Dismembrator, Modelo 60, (Fisher Scientific®), em duas etapas de 30seg cada uma, com intervalo de 30seg entre elas. Após reajuste do pH para 7,5 os extratos foram considerados prontos para serem utilizados nos ensaios envolvendo cultivo de células e isolamento do RNA viral para a reação de RT-PCR. Neste ponto, os extratos tissulares foram estocados a -80°C, até sua utilização.

Para as ostras que passaram pelo processo de bioacumulação, o tratamento iniciou-se pela homogeneização das 12 ostras utilizadas em cada bioacumulação. Em seguida, foram retiradas 5 alíquotas de 20g cada uma do homogeneizado (5 x 20g = 100g, aproximadamente 50% do peso total das 12 ostras), colocadas em garrafas estéreis e processadas como descrito acima.

Ostras que não foram semeadas com PV, também foram igualmente processadas a fim de serem utilizadas como controles nos ensaios de citotoxicidade, para referência nos

referência nos ensaios de recuperação viral em células e para a avaliação da remoção de inibidores da reação de RT-PCR. Estes extratos foram denominados de “extratos negativos”. Ilustrações da preparação desses extratos podem ser visualizados na figura 2.

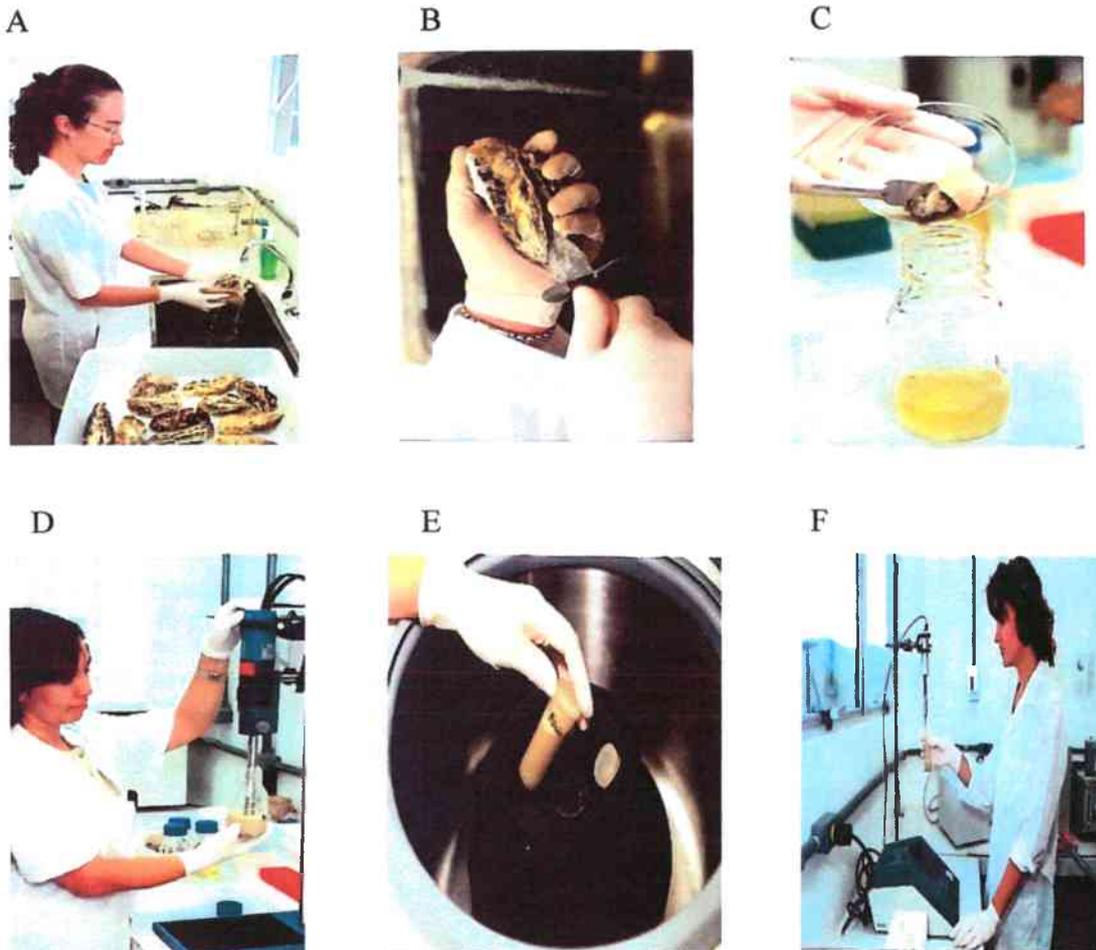


Figura 2. Esquema ilustrativo do procedimento de preparação dos extratos tissulares de ostras. (A) limpeza e assepsia externa das valvas das ostras; (B) abertura das valvas com faca estéril; (C) transferência dos tecidos e fluidos para a garrafa estéril; (D) homogeneização dos tecidos das ostras; (E) centrifugação do homogeneizado de tecidos das ostras; (E) dispersão das partículas virais por ultra-som.

3.5 Avaliação da citotoxicidade dos extratos tissulares de ostras

Este ensaio teve como objetivo estabelecer a diluição na qual o extrato tissular de ostras não mais apresentava toxicidade para as células VERO. Esta diluição serviu como referência para os ensaios de cultivo de células *in vitro*, assim como para os de recuperação viral e de RT-PCR associado à cultura celular. Foram também utilizados extratos de ostras negativos a fim de que as alterações observadas nas células fossem exclusivamente devido ao efeito dos componentes tissulares das ostras.

Células VERO, na densidade aproximada de 2×10^5 células/ml, foram cultivadas em placas de 24 cavidades em meio 199 com adição de 5% de SFB. Foram preparadas diluições seriadas de um extrato negativo em meio de cultura adicionado de 1% da solução de antibióticos/antifúngico, desde a proporção 1:2 até 1:1024 (razão geométrica 1:2).

O meio de cada cavidade foi retirado e foram inoculados 500µl das diferentes diluições do extrato negativo (duas réplicas para cada diluição) (Figura 3) e as placas foram incubadas por 60min a 37°C. Em seguida, o conteúdo das cavidades foi retirado por aspiração e adicionou-se 1mL de meio 199 com 2% de SFB. As placas foram incubadas em estufa a 37°C sob atmosfera de CO₂ durante 24, 48 e 72h. Ao final de cada período, as placas foram observadas ao microscópio invertido, com a finalidade de identificar possíveis alterações do aspecto do tapete celular, provocadas pelas diluições testadas, comparando-as com os controles celulares negativos (somente células e meio 199 com 2% de SFB). Após cada período, a integridade das células foi confirmada adicionando-se em cada cavidade 500µl do corante preto de naftaleno, na concentração descrita no item 3.2.3.

3

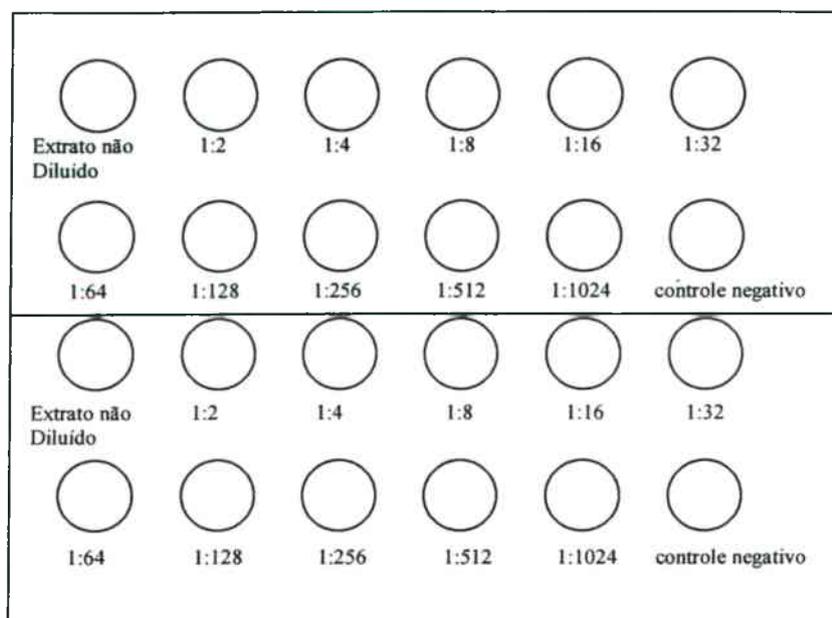


Figura 3. Esquema da placa de 24 cavidades utilizada para a determinação da citotoxicidade de diferentes diluições dos extratos de ostras.

3.6 Avaliação da recuperação viral dos extratos de ostras através do ensaio de formação de placas de lise

Este ensaio teve a finalidade de quantificar o número de partículas virais infectantes e, com isso, determinar os níveis de recuperação de poliovírus viáveis após o processamento das ostras para avaliar a eficiência da técnica de extração das partículas virais dos tecidos de ostras e de concentração das mesmas. O cálculo da chamada “porcentagem de recuperação” ou “eficiência de recuperação” foi realizado pela comparação do número total de partículas virais viáveis, recuperadas em um volume final, com o valor inicialmente inoculado nos tecidos das ostras.

Foram utilizadas ostras inoculadas com PV, diretamente na região gastrointestinal, como descrito no item 3.3.1, permitindo assim conhecer a quantidade de vírus que havia sido inoculada nos tecidos das ostras. As ostras foram inoculadas com $1,3 \times 10^5$ a 6×10^5 pfu/ml de poliovírus e, posteriormente, submetidas aos processos de extração e

concentração das partículas virais utilizando TPB como eluente e PEG 8000 para precipitação das partículas virais, obtendo assim os extratos tissulares, conforme descrito no item 3.4.

Também foi avaliada a recuperação dos vírus adsorvidos pelas ostras que foram submetidas ao processo de bioacumulação. Os extratos tissulares das mesmas foram obtidos pelos mesmos métodos de extração e de concentração, conforme mencionado acima.

Os controles positivos deste ensaio consistiram em ostras não inoculadas, que foram submetidas aos mesmos processos de extração e de concentração, mas somente o produto final obtido (extrato tissular de ostras) foi inoculado com PV na concentração de $5,8 \times 10^5$ pfu. Estas amostras estariam indicando 100% de recuperação viral, já que não houve perda de vírus durante o processo. O esquema deste ensaio encontra-se na Figura 4.

O tapete celular confluyente de placas de 12 cavidades foi inoculado com 500 μ l dos extratos de ostras diluídos (diluições de 1:256, 1:512 e 1:1024) em meio 199 sem SFB e 1% da solução de antibióticos/antifúngico. As placas foram incubadas por 60min, o inóculo foi retirado e foram acrescentados 2,0ml da solução de meio 199 2X + solução aquosa a 1,5% de carboximetilcelulose na proporção 1:1. As células foram incubadas durante 48h a 37°C e 5% CO₂. Ao final deste período, as células foram coradas com a solução de preto de naftaleno durante 30min (Figura 5). Após eliminação do corante, as células foram deixadas para secar ao ambiente e, finalmente, foi realizada a leitura e o cálculo das unidades formadoras de placas (pfu), para cada diluição testada.

Os valores das concentrações virais (pfu/ml) inoculados nas ostras (variável independente) foram confrontados com aqueles obtidos na detecção (variável dependente) por meio de uma análise de regressão linear ($y = a+bx$, $P < 0,005$), usando-se para isto o programa Statgraph 7,0. Igualmente, para estimar o valor de recuperação viral no ensaio de bioacumulação com a menor concentração testada (5×10^2 pfu/ml) foi utilizada esta análise de regressão.

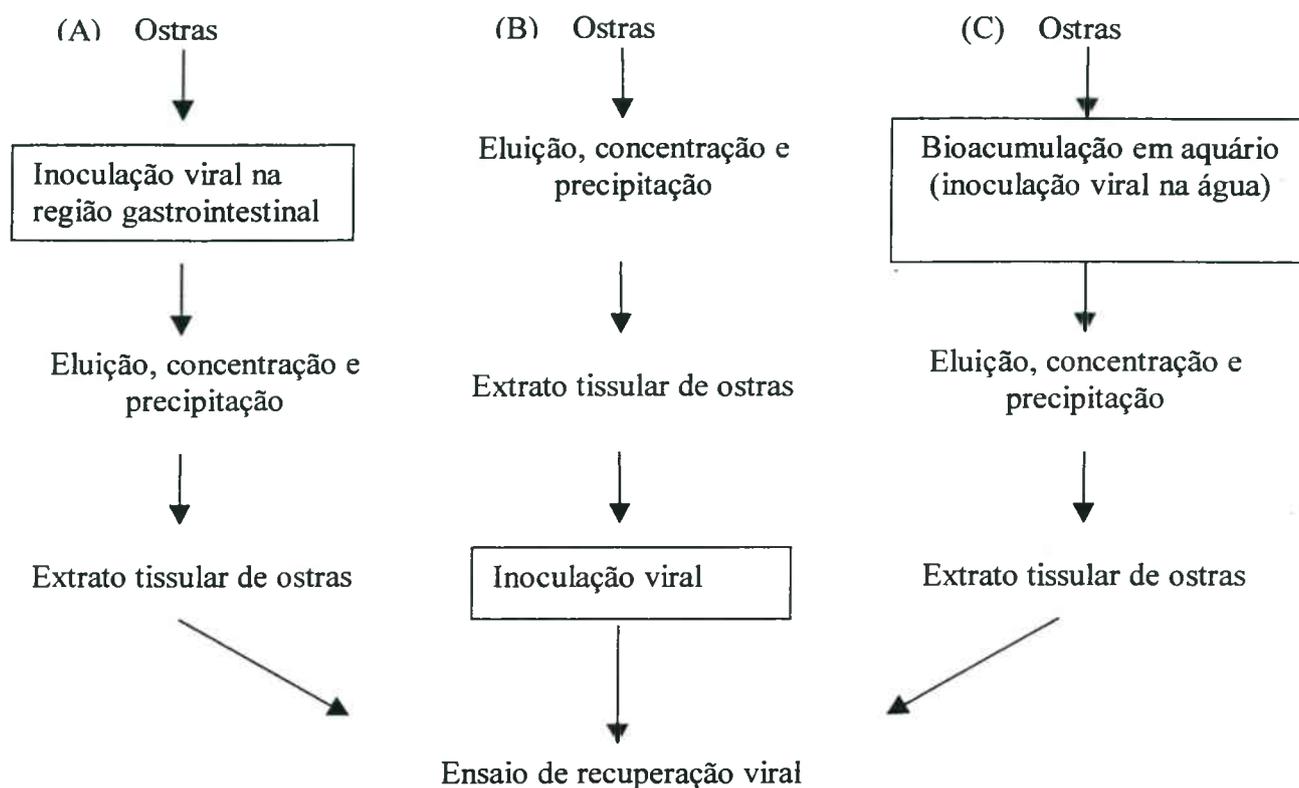


Figura 4. Esquema da preparação dos extratos tissulares de ostras para o ensaio de recuperação viral. (A) Ostras inoculadas com $1,3 \times 10^5$ a 6×10^5 pfu de poliovírus na região gastrointestinal; (B) Controle positivo: extrato tissular de ostras inoculado com $5,8 \times 10^5$ pfu de poliovírus (extrato representando 100% de recuperação viral); (C) Ostras submetidas à bioacumulação, por inoculação da água dos aquários com poliovírus.

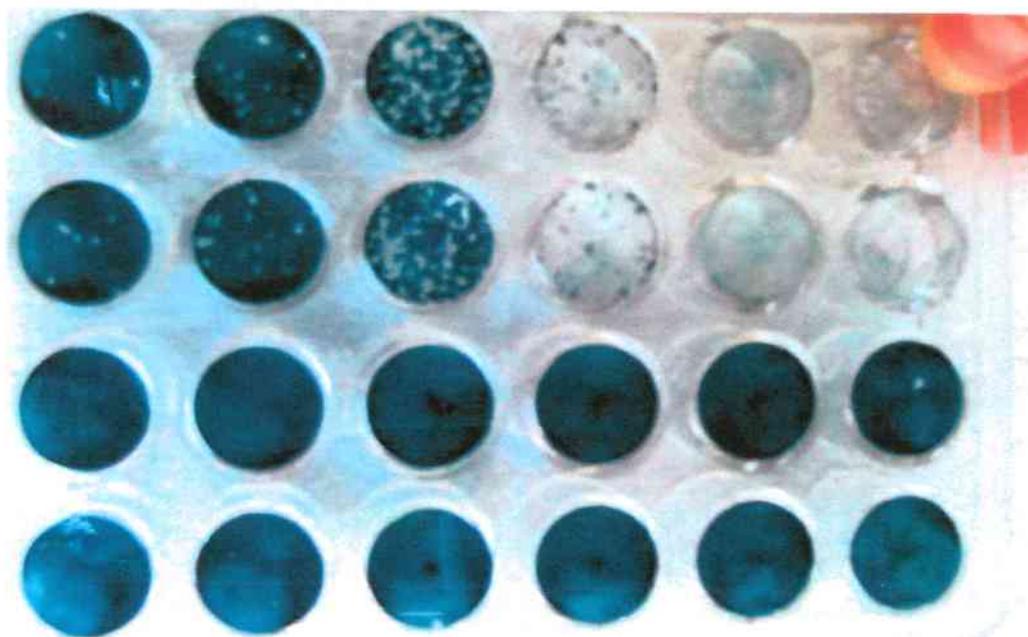


Figura 5: Placa de 24 cavidades utilizada nos ensaios de formação de placas de lise

3.7 Extração do RNA viral a partir da solução estoque viral

3.7.1 Extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (PCI)

A extração do RNA do PV a partir da solução estoque foi realizada segundo metodologia proposta por SAMBROOK & RUSSELL (2001), com algumas modificações.

Alíquotas de 500µl da solução estoque viral foram distribuídas em microtubos, contendo o mesmo volume de Freon® 113 (triclorotrifluoroetano, Aldrich). Os tubos foram agitados vigorosamente por 30seg em agitador tipo Vortex e, em seguida, foram transferidos para um agitador orbital (Elmeco modelo RP-50) por 5min a 4°C para uma melhor homogeneização do conteúdo e, finalmente, centrifugados a 12.000Xg por 10min a 4°C. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro microtubo e acrescida de uma solução aquosa a 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), na concentração final de 1%, sendo que esta mistura foi incubada em banho-maria a 37°C durante 30min. Ao final deste período, foram realizadas três extrações consecutivas com solventes orgânicos: a primeira foi feita com 500µl de fenol equilibrado pH 7,4-7,7 (Gibco), a segunda com o mesmo volume da mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção 25:24:1, e a última com igual volume da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção 24:1. Em cada uma delas, o conteúdo do tubo foi misturado vigorosamente por 30seg em agitador tipo Vortex e depois em agitador orbital, por 5min a 4°C, e, finalmente, centrifugado por 10min a 12.000Xg a 4°C. Após cada centrifugação, a fase aquosa resultante era transferida para outro microtubo para depois ser adicionado o solvente seguinte. Após a terceira extração, a fase aquosa foi acrescida de acetato de sódio 3M pH 5,3, na concentração final de 0,3 M e três volumes de etanol absoluto (Merck) gelado (-20°C). O tubo foi colocado durante uma noite a -80°C para a precipitação dos ácidos nucleicos. Nesta etapa o RNA em etanol pode ser estocado por longos períodos. Quando requerido, o tubo foi retirado do freezer e centrifugado a 12.000Xg durante 20min a 4°C, a fase aquosa desprezada e o sedimento contendo RNA lavado com três volumes (1,5ml) de etanol 70% gelado (-20°C). O tubo foi agitado levemente por inversão e novamente centrifugado a 12.000Xg durante 20min a 4°C. O etanol foi retirado e o sedimento foi seco ao ar deixando o tubo invertido sobre papel absorvente durante 10min. Finalmente, o

mesmo foi ressuspenso em 50 μ l de água tratada com dietilpirocarbonato® (DEPC) (Gibco). O RNA assim dissolvido foi estocado a -20°C.

Para avaliar o grau de pureza em relação à contaminação por proteínas e quantificar o RNA obtido, as amostras foram dosadas por espectrofotometria no UV (260/280nm,) conforme descrito por SAMBROOK & RUSSEL (2001).

3.8 Extração do RNA viral a partir dos extratos tissulares de ostras

A metodologia para o isolamento do RNA dos extratos tissulares de ostras foi adaptada daquelas descritas por ATMAR *et al.* (1993); LEES *et al.* (1994); BARARDI *et al.* (1999) e SANTOS *et al.* (2001), com algumas modificações.

Aliquotas de 500 μ l dos extratos tissulares de ostras foram distribuídas em microtubos e clarificadas pela adição de um volume igual de freon® 113, agitando os microtubos vigorosamente por 30seg em agitador tipo Vortex, depois durante 5min a 4°C em agitador orbital (Elmeco modelo RP-50) e centrifugados a 12.000Xg por 10min a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram transferidos para outros microtubos aos quais adicionou-se o tampão para a enzima proteinase K com a seguinte composição: Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 5mM; SDS 0,5% (p/v) e a enzima proteinase K (Gibco BRL), na concentração de 400 μ g/ml. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 30min. Após este período, foi acrescentado brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, Sigma) na concentração final de 1,3% e NaCl 0,4M (Sigma) e os microtubos foram novamente incubados durante 30min a 56°C. Após este período, realizou-se o procedimento de extração dos ácidos nucléicos com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e de precipitação com etanol, conforme descrito no item 3.7.1. Neste caso, o RNA foi dissolvido em 500 μ l de água Milli-Q autoclavada.

3.9 Avaliação da técnica de extração de RNA viral para a remoção de inibidores da reação de RT-PCR.

Para este ensaio foram utilizadas ostras não inoculadas, que foram submetidas ao mesmo processo de extração e concentração, e somente o produto final obtido (extrato tissular de ostras) foi inoculado com PV na concentração de 5×10^6 pfu. Estes extratos foram então processados para a extração dos ácidos nucleicos, mediante a técnica descrita no item anterior. O RNA do PV assim extraído foi diluído em 500µl de água Milli-Q autoclavada e depois amplificado através da reação de RT-PCR, utilizando o Protocolo C descrito adiante no item 3.10.1.3. O controle positivo deste ensaio foi o RNA extraído da solução estoque de PV (sobrenadante de células infectadas com PV) na mesma concentração (5×10^6 pfu. Este controle serviu como referência de uma amostra sem inibidores da reação de RT-PCR.

3.10 Ensaio de RT-PCR para o poliovírus

Durante a padronização da metodologia de RT-PCR para a detecção do PV foram introduzidas algumas modificações no protocolo inicialmente descrito por COELHO (2001). Os ensaios foram primeiramente realizados com os controles virais (PV obtido da infecção de células; neste trabalho chamado de solução estoque viral) e, em seguida, foram realizados para a detecção do PV em ostras experimentalmente inoculadas.

Foram utilizados ambientes físicos diferentes para cada etapa, reservando-se para o preparo da mistura das reações de transcrição reversa (RT) e de PCR, um ambiente livre de contaminantes, como ribonucleases e outros materiais biológicos, que pudessem causar interferência nas análises. Todos os reagentes de RT-PCR foram preparados, manipulados e aliquotados num fluxo laminar. A adição do RNA ou cDNA ocorreu em outro ambiente físico e a análise dos produtos de PCR foi processada em um terceiro ambiente, distinto dos demais. Todos os materiais, tais como tubos para PCR, ponteiras, microtubos e ponteiras com barreira, eram novos e foram autoclavados antes de serem utilizados. Os reagentes destinados às reações de RT-PCR foram estocados a -20°C e durante o procedimento foram mantidos permanentemente em gelo. A manipulação dos reagentes durante todos os

procedimentos foi realizada com luvas. Em todas as reações realizaram-se controles negativos e positivos das reações.

3.10.1 Protocolos de amplificação do poliovírus

3.10.1.1 Protocolo A (COELHO, 2001)

A principal característica deste protocolo é o uso de uma mistura comercial: PCR SuperMix[®] (Gibco BRL).

A mistura para a reação de transcrição reversa (RT) foi realizada no fluxo laminar, da seguinte maneira: 12,5 µl de água tratada com DEPC foram colocados em um tubo para PCR, e adicionou-se o tampão da enzima M-MLV RT (Gibco BRL) na seguinte concentração: Tris HCl 25mM; KCl 37,5mM; MgCl₂ 1,5mM; pH 8,3. Em seguida, acrescentou-se 0,5mM de cada um dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatados ATP, TTP, GTP e CTP; 50 pmoles do iniciador randômico (Gibco BRL); 0,01mM de DTT (Ditiotreitol); 5U do inibidor de ribonucleases e 40U da enzima RT M-MLV (Gibco BRL). No ambiente destinado ao trabalho com ácidos nucleicos, foram colocados 5µL de RNA viral em um tubo, que foi desnaturado a 95°C por 5min, no termociclador (PTC-200, MJ RESEARCH). O tubo foi rapidamente transferido para o gelo por 2min; após este tempo, foi centrifugado brevemente para coletar a amostra no fundo do tubo e foram adicionados 25µl da mistura de reação descrita acima. A reação de transcrição reversa, na qual o segmento de RNA foi transcrito à seqüência de DNA complementar (cDNA), foi realizada a 37°C por 90min.

A reação de PCR foi realizada conforme especificações do fabricante, apenas com variação na concentração de MgCl₂. A mistura PCR SuperMix[®] é constituída por: Tris HCl 22mM, pH 8,4; KCl 55mM; MgCl₂ 1,65mM; deoxinucleotídeos trifosfatados 220µM de cada um e 22U/ml de Taq DNA Polimerase recombinante.

Para a reação de amplificação foram utilizados 45µl desta mistura de reação, cuja concentração de MgCl₂ foi acertada para 3mM, adicionando-se 3µl de MgCl₂ 25mM. Após, acrescentou-se os dois iniciadores específicos para PV: Polio-R e Polio-L, na concentração de 100 pmoles cada um e, finalmente, foram adicionados 3µl do cDNA obtido na reação

anterior. A reação de amplificação foi iniciada com uma etapa inicial de desnaturação por 2min a 95°C, e o seguinte programa: 40 ciclos de 95°C por 1min; 55°C por 1min e 72°C por 1min, finalmente um último passo de extensão por 7min a 72°C. As especificações dos reagentes usados nas reações de RT e de PCR encontram-se detalhados na Tabela 1.

A seqüência dos iniciadores definidos por YU-LI *et al.* (1994) e que foram utilizados neste trabalho foi a seguinte:

•Polio-R: 5'-ACGGACACCCAAAGTA-3' e •Polio-L: 5'-AGCACTTCTGTTTCCC-3'.

O peso molecular do produto de PCR de PV, gerado por estes iniciadores, e de 394 pares de bases.

3.10.1.2 Protocolo B.

A única modificação realizada neste protocolo, em relação ao primeiro, foi a utilização do iniciador específico Polio-R na reação de transcrição reversa, ao invés do iniciador randômico. A reação de PCR foi realizada utilizando a mistura de PCR Super Mix[®] e o programa de ciclos e temperaturas foi o mesmo descrito no protocolo A.

3.10.1.3 Protocolo C.

A reação de transcrição reversa foi realizada como descrito no protocolo B. Na reação de PCR, o tampão na concentração final de 1X contendo Tris-HCl 10mM pH 9,2; KCl 25mM; MgCl₂ 1,5mM foi colocado em um tubo. Em seguida, foram acrescentados os quatro deoxinucleotídeos, na concentração de 200µM cada um, 100pmoles de cada um dos iniciadores Polio-R e Polio-L e 2,5U da enzima Taq-Polimerase (Gibco BRL). Todos estes reagentes foram diluídos em água Milli-Q autoclavada para um volume final de reação de 55µl. Finalmente, foram adicionados 3µl do cDNA obtido na reação de RT. As condições de amplificação foram as mesmas descritas no protocolo A. O resumo das principais diferenças entre os protocolos A, B e C encontra-se na Tabela 2.

Tabela 1: Reagentes usados nas reações de RT e de PCR nos protocolos A, B, e C.

Protocolo A:

Reação de RT		Reação de PCR	
Reagente	Concentração	Reagente	Concentração
Tampão M-MLV-RT 5X	1X	PCR SuperMix®	1X
DNTP 10mM	0,5mM	Polio-R 31pmoles/ μ l	100pmoles
DTT 0,1mM	0,01mM	Polio-L 45pmole/ μ l	100pmoles
Iniciador randômico	50pmoles	MgCl ₂ 25mM	3,0mM
Inibidor de RNase 10U/ μ l	5U		
RT-MLV 200U/ μ l	40U		
Água DEPC	qsp 25 μ l		

Protocolo B:

Reação de RT		Reação de PCR	
Reagente	Concentração	Reagente	Concentração
Tampão M-MLV-RT 5X	1X	PCR SuperMix®	1X
DNTP 10mM	0,5mM	Polio-R 31pmoles/ μ l	100pmoles
DTT 0,1mM	0,01mM	Polio-L 45pmole/ μ l	100pmoles
Polio-L 31pmoles/ μ l	100pmoles	MgCl ₂ 25mM	3,0mM
Inibidor de RNase 10U/ μ l	5U		
RT-MLV 200U/ μ l	40U		
Água DEPC	qsp 25 μ l		

(...)

(...) Continuação da Tabela 1

Protocolo C

Reação de RT		Reação de PCR	
Reagente	Concentração	Reagente	Concentração
Tampão M-MLV-RT 5X	1X	Tampão 10X	1X
DNTP 10mM	0,5mM	Polio-R 31pmoles/ μ l	100pmoles
DTT 0,1mM	0,01mM	Polio-L 45pmole/ μ l	100pmoles
Polio-L 31pmoles	100pmoles	dNTP 10mM	200 μ M
Inibidor de RNase 10U/ μ l	5U	Taq-Polimerase 5U/ μ l	2,5U
RT-MLV 200U/ μ l	40U	Água milli-Q	qsp 52 μ l
Água DEPC	qsp 25 μ l		

Tabela 2. Diferenças básicas entre os protocolos A, B e C

Reação	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C
RT	Iniciador Randômico	Iniciador Polio-R	Iniciador Polio-R
PCR	PCR SuperMix [®]	PCR SuperMix [®]	PCR tradicional

3.10.2 Determinação da concentração ideal dos componentes do tampão e do pH para a reação de PCR

A definição das concentrações salinas ideais da reação de PCR foi realizada utilizando o kit Opti-Prime™ (Stratagene Cloning Systems). Este kit consiste de tampões, que apresentam três diferentes valores de pHs (pH 8,3; 8,8 e 9,2), duas concentrações de MgCl₂ (15mM e 35mM) e duas concentrações de KCl (25mM e 75mM). Cada pH é combinado com as diferentes concentrações de MgCl₂ e KCl perfazendo um total de doze concentrações salinas distintas nos tampões. A Tabela 3 mostra a composição de cada um destes tampões.

O RNA, utilizado para este ensaio, foi extraído de 500µl de um extrato tissular de ostras inoculado com 2,5x10⁶pfu de poliovírus. A concentração estimada do RNA viral, após a extração, foi de 29,5µg/ml. Esta estimativa baseou-se nos dados obtidos da extração do RNA viral da solução estoque viral com a mesma concentração em pfu do PV. O cDNA foi sintetizado mediante a reação de transcrição reversa (RT) descrita no protocolo B (item 3.10.1.2). Foram colocados 42,5µl de água Milli-Q autoclavada em cada um dos 12 tubos; em seguida, foi adicionado um tampão diferente para cada tubo, acrescentando-se ainda a mistura dos dNTPS na concentração de 200mM de cada deoxinucleotídeo; 100pmoles de cada um dos iniciadores específicos Polio-R e Polio-L, 2,5U da enzima Taq-Polimerase (Gibco BRL) e 3µl de cDNA. Os tubos foram colocados no termociclador e foi utilizado o programa de amplificação descrito no protocolo A.

Após a amplificação, foram escolhidos os tampões 1, 2, 5 e 9, para serem avaliados quanto à sua sensibilidade de detecção.

Tabela 3. Composição dos tampões do kit Opti-Prime™.

Tampões	Tris-HCl pH 8,3 (mM)	Tris-HCl pH 8,8 (mM)	Tris-HCl pH 9,2 (mM)	MgCl ₂ (mM)	KCl (mM)
1	100	-	-	15	250
2	100	-	-	15	750
3	100	-	-	35	250
4	100	-	-	35	750
5	-	100	-	15	250
6	-	100	-	15	750
7	-	100	-	35	750
8	-	100	-	35	250
9	-	-	100	15	750
10	-	-	100	15	250
11	-	-	100	35	750
12	-	-	100	35	250

3.10.3 Determinação da sensibilidade de detecção da reação de RT-PCR

Este ensaio teve como objetivo determinar a sensibilidade da reação de RT-PCR para a detecção do PV e definir, finalmente, o protocolo a ser utilizado nos ensaios subsequentes. Para isto, foram comparados os tampões 1, 2, 5 e 9 do kit Opti-Prime™ e a mistura PCR SuperMix®.

O RNA utilizado para este ensaio foi o mesmo utilizado no ensaio anterior (item 3.10.2). Foram realizadas diluições seriadas do RNA em água DEPC, nas diluições de 1:2 até 1:1024 (fator de diluição 1:2). As concentrações do RNA correspondente a cada uma destas diluições estão mostradas na Tabela 4.

As diferentes diluições do RNA foram transcritas à cDNA, mediante a reação de transcrição reversa, utilizando o iniciador específico Polio-R, conforme descrito no protocolo B.

Para a reação de PCR, utilizando a PCR SuperMix®, foram usadas duas concentrações de MgCl₂ (1,65 mM e 3,0 mM) e a reação foi realizada conforme descrito no protocolo A. Com os tampões 1, 2, 5, e 9, a reação foi realizada seguindo o protocolo C.

Tabela 4. Diluições do RNA do poliovírus, isolado da solução estoque viral e suas respectivas concentrações em 5µl de amostra.

RNA viral	Concentração do RNA do PV (ng/5µl)
RNA puro	147,5
1:2	73,7
1:4	36,8
1:8	18,4
1:16	9,2
1:32	4,6
1:64	2,3
1:128	1,1
1:256	0,5
1:512	0,2
1:1024	0,1

3.11 Visualização dos produtos de PCR

A análise dos produtos de amplificação das reações de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,5% preparado em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) ou eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (PAGE) (Sigma) a 10% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Oito microlitros de cada amostra amplificada foram misturados com 2 μ l do tampão de aplicação 6X (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30% p/v em água Milli-Q) e aplicados em uma cavidade do gel. A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem constante de 100V, em tampão Tris-Borato-EDTA 1X (Tris-HCl 0,09M; ácido bórico 0,09M; EDTA 0,002M). Como marcador de peso molecular, foram utilizados 300ng do 100pb DNA ladder (Gibco BRL). Após a corrida, os géis foram corados com uma solução aquosa de brometo de etídeo (Sigma) na concentração de 1 μ g/ml, e os produtos foram visualizados através da exposição à luz ultravioleta no transiluminador Pharmacia Biotech® e fotografados para documentação com câmera Polaroid ou pelo sistema digital de foto documentação Kodak.

3.12 Reação de RT-PCR associada à cultura celular para a detecção do PV em ostras submetidas à bioacumulação

Neste ensaio foram utilizados os extratos tissulares de ostras obtidos a partir de ostras que foram submetidas à bioacumulação com poliovírus. Estes extratos foram analisados de três formas: na primeira foi através de cultura celular, que permitiu quantificar o número de partículas virais infectantes recuperadas dos tecidos das ostras; na segunda os extratos foram diretamente analisados para a detecção do PV mediante a reação de PCR e, na terceira, os extratos foram acrescentados às células e incubados por até 72h e os sobrenadantes celulares foram analisados através da reação de PCR.

Os extratos tissulares de ostras de cada bioacumulação (5 réplicas de cada uma) foram diluídos 32X (diluição não citotóxica) em meio de cultura 199 adicionado de 1% da solução de antibióticos/antifúngico. Células VERO foram cultivadas em placas de cultura de 12 cavidades com 500 μ l dos extratos diluídos e incubadas, por 60min a 37°C. Ao final deste período, o inóculo foi retirado de cada cavidade e cada placa recebeu dois tratamentos. Metade foi utilizada para quantificar o número de partículas virais, que foram bioacumuladas e recuperadas dos tecidos das ostras; para isto foi utilizada a metodologia descrita no ensaio de formação de placas de lise (item 3.2.3). As cavidades restantes foram destinadas para a detecção do PV, através da reação de PCR. Para isto, após a retirada do inóculo, as células foram adicionadas de 2mL de meio 199 suplementado com 1% de SFB e

1% da solução de antibióticos/antifúngico, conforme descrito acima. As placas foram incubadas a 37°C por até 48h para as bioacumulações 1, 2 e 3 e por até 72h para a bioacumulação 4 (Figura 6).

A cada 24h, o meio de cultura de cada cavidade foi coletado em microtubos e com o auxílio de uma ponteira, as células ainda aderidas na superfície da placa, foram raspadas e colocadas no meio. Os microtubos foram congelados e degelados 3X consecutivas e centrifugados por 20min a 350Xg. Os restos celulares precipitados no fundo do tubo foram eliminados e o sobrenadante foi utilizado para a detecção do PV através da reação de RT-PCR, seguindo o protocolo C.

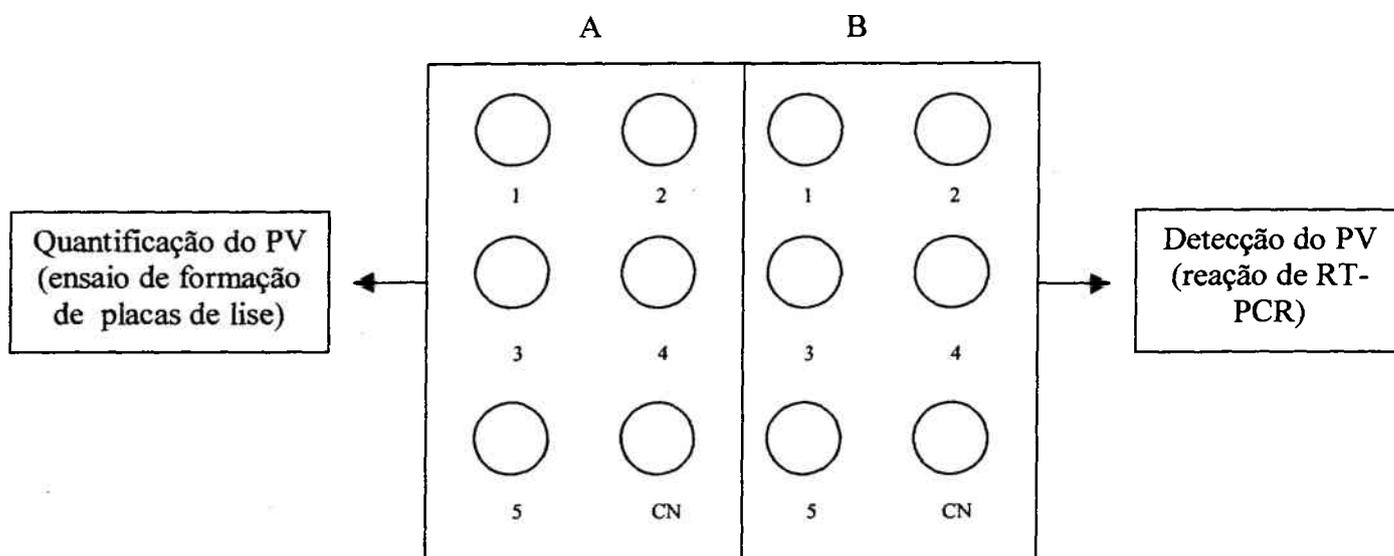


Figura 6. Esquema da placa de 12 cavidades utilizada no ensaio de RT-PCR associado à cultura celular para as bioacumulações. (A) Cavidades destinadas à quantificação do PV mediante o ensaio de formação de placas de lise; (B) Cavidades destinadas à detecção do PV mediante a reação de RT-PCR.

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo e infecção das células VERO

A metodologia descrita para o cultivo de células VERO permitiu o crescimento, a propagação e a formação de monocamadas celulares homogêneas em até 48h para as garrafas de 75cm²; para as placas de 12 ou 24 cavidades e garrafas de 25 cm² apenas 24h de incubação foram suficientes para a formação de monocamadas.

Como previsto, as células foram permissivas à infecção pelo poliovírus, produzindo o efeito citopático característico, que é o arredondamento das células com a posterior desorganização citoplasmática e incapacidade de aderência do tapete celular. Os primeiros sinais de infecção celular aconteceram após 8h de incubação, atingindo a completa destruição do tapete em 24h pós-infecção, que correspondem a três ciclos de replicação viral (Figura 7).

4.2 Título infeccioso do poliovírus.

A solução estoque viral produzida neste trabalho foi titulada através do ensaio de formação de placas de lise, produzindo um título viral de 10⁷ pfu/ml.

O tempo de adsorção do vírus nas células pode variar entre diferentes sistemas celulares. Neste caso, 60min foram suficientes para que os vírus adsorvessem às células e permitisse infecção posterior. O meio usado para a formação de placas de lise influencia no tempo de formação das placas. Neste caso, utilizando meio de cultura 199 adicionado de carboximetilcelulose, foram necessárias 48h para a formação de placas discretas, sem fusão entre elas.

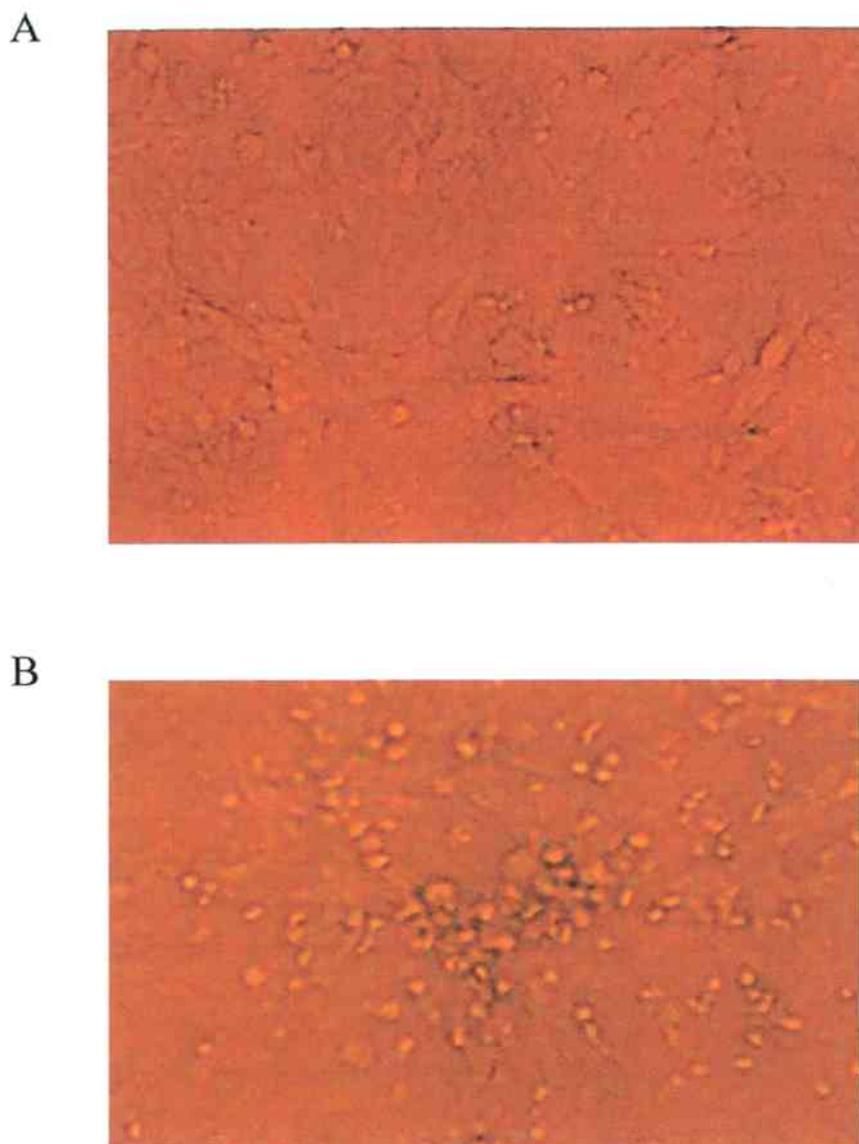


Figura 7: Infecção de células VERO pelo poliovírus. (A) Células VERO intactas; (B) Células VERO infectadas com poliovírus.

4.3 Citotoxicidade dos extratos tissulares de ostras

A avaliação da toxicidade dos extratos tissulares de ostras foi realizada em células VERO, mediante a observação qualitativa no microscópio invertido, das alterações morfológicas celulares e da integridade do tapete celular em diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72h), através da coloração das células pelo corante preto de naftaleno. De acordo com as observações foi possível determinar que os extratos tissulares de ostras, a partir da diluição 1:32 até 1:1024, não foram citotóxicos até 72h. As diluições menores mostraram-se tóxicas desde as primeiras 24h, aumentando seu efeito citotóxico gradativamente com o tempo de incubação e com a concentração dos extratos. Ficou evidente que os extratos puros e as duas diluições seguintes (1:2 e 1:4) foram tóxicas para as células, desde as primeiras horas em que os extratos estiveram em contato com as mesmas. Isto foi diminuindo gradativamente até chegar na diluição limite quando a monocamada celular já não apresentava alterações devido à toxicidade. O tempo de incubação também foi importante nesta determinação: pode-se observar que, em algumas das diluições testadas (1:8 e 1:16), à medida que o tempo de incubação crescia, os extratos tissulares tornavam-se mais tóxicos (Tabela 5).

Em vista dos resultados obtidos, a diluição de 1:32 dos extratos foi considerada a diluição limite não citotóxica, sendo que para os ensaios subseqüentes envolvendo cultura de células, tais como a recuperação viral e a determinação do número de partículas virais infectantes em ostras, esta diluição foi considerada como referência.

Tabela 5. Avaliação qualitativa da toxicidade em células VERO de diferentes diluições do extrato de ostras após 24, 48 e 72h de incubação.

Diluição	Citotoxicidade			Diluição	Citotoxicidade		
	24h	48h	72h		24h	48h	72h
Puro	+++	+++	+++	1:64	-	-	-
1:2	+++	+++	+++	1:128	-	-	-
1:4	+++	+++	+++	1:250	-	-	-
1:8	++	++	+++	1:500	-	-	-
1:16	+	++	++	1:1000	-	-	-
1:32	-	-	-				

(+++): Destruição total da monocamada celular

(++/+): Destruição parcial da monocamada celular

(-) : Monocamada celular conservada

4.4 Avaliação da recuperação viral dos extratos tissulares de ostras através do ensaio de formação de placas de lise.

A eficiência da técnica utilizada neste trabalho para a extração/ separação das partículas virais dos tecidos das ostras, mediante a eluição com TPB - glicina pH 9,0 e precipitação com PEG8000, foi determinada calculando-se os níveis de recuperação do PV nos extratos de ostras. Para quantificar esta recuperação foi utilizado o ensaio de formação de placas de lise.

Os níveis de recuperação do PV a partir dos extratos de ostras inoculadas com o vírus diretamente na região gastrointestinal, com concentrações variando de $1,3 \times 10^5$ a 6×10^5 pfu, estão apresentados na Tabela 6. A média de recuperação das partículas virais infectantes dos três experimentos foi de $23,8 \pm 5\%$, com um coeficiente de variação de 20%. Nos controles positivos (que representam 100% de recuperação viral) a média de recuperação viral de quatro repetições foi de $75,5 \pm 41\%$, com um coeficiente de variação de 54%..

Nos ensaios em que as ostras foram inoculadas semeando a água do mar com quatro diferentes concentrações do PV (bioacumulação), pôde-se observar uma correlação positiva entre a concentração de vírus na água do mar e a quantidade de vírus recuperada,

após processamento dos tecidos. A Tabela 7 mostra os resultados obtidos nos ensaios de bioacumulação. Nos três primeiros ensaios de bioacumulação, a concentração de vírus recuperada nos extratos tissulares foi de aproximadamente 10% daquela semeada na água do mar, perdendo-se aproximadamente 1 log da concentração inicial semeada de vírus. A porcentagem de recuperação calculada foi de $11,0 \pm 1\%$, com um coeficiente de variação de 5%. A análise de regressão aplicada aos valores dos poliovírus inoculados e recuperados resultou ser altamente significativa, apresentando um $r = 0,998$ e um R^2 de 98%. A equação resultante da regressão foi $y = -33,6 + 0,12x$.

Tabela 6: Resultados da recuperação do poliovírus a partir dos extratos de ostras inoculadas diretamente, utilizando o ensaio de formação de placas de lise.

Extrato	Vírus inoculados (pfu/ml)	Vírus recuperados (pfu/ml)	% de recuperação viral
C+	$5,8 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	75,5
1	$1,3 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	31,0
2	$5,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	21,0
3	$6,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	19,6
Média	$4,3 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$	23,8

C+: Controle positivo (100% de recuperação viral). Porcentagem média de 4 repetições: $75,5 \pm 41\%$, coeficiente de variação (CV) = 54%

Porcentagem média de recuperação dos extratos 1,2 e 3: $23,8 \pm 5\%$; CV = 20%

A recuperação viral da bioacumulação 4, estimada por esta equação foi de 26,4 pfu/ml, e a porcentagem teórica de recuperação viral foi de 5,2%. Além disso, não foram observados focos de infecção nas células após 72h de incubação.

Tabela 7: Resultados da recuperação do poliovírus a partir dos extratos de ostras submetidas à bioacumulação, utilizando o ensaio de formação de placas de lise.

Ensaio de bioacumulação	Vírus semeados (pfu/ml de água do mar)	Vírus recuperados (pfu/ml de extrato de ostra) ^a	% de recuperação viral
1	$5,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	10,2
2	$2,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	12,8
3	$5,0 \times 10^3$	$5,1 \times 10^2$	10,2
4	$5,0 \times 10^2$	26,4 [*]	5,2 ^{**}
Média da bioacumulação 1,2 e 3			11,0

(a): Valor médio de recuperação de cinco réplicas

(*): Valor estimado com base na equação $y = -33,6 + 0.12x$

(**): Porcentagem calculada com base na recuperação estimada

Porcentagem média da recuperação dos ensaios 1,2 e 3: $11,0 \pm 1\%$; CV = 8%

4.5 Avaliação da técnica de extração do RNA viral para a remoção de inibidores da reação de RT-PCR

O RNA do PV da solução estoque viral, que foi extraído pela técnica do fenol – clorofórmio- álcool isoamílico, apresentou uma concentração média de $29,5 \mu\text{g/ml}$. A razão entre as leituras a 260nm-280nm ($A_{260-280}$) foi de 1,6.

A Figura 8 mostra que a técnica empregada para a extração de ácidos nucleicos e a remoção de inibidores de cinco extratos tissulares de ostras permitiu a detecção do PV pela reação de RT-PCR, mostrando uma eficiência de detecção de 100%. Pode ser observado que a reação produziu bandas de intensidades semelhantes às do controle positivo (RNA extraído da solução estoque viral), sendo que duas delas (linhas 2 e 6) mostraram menor intensidade em comparação às restantes.

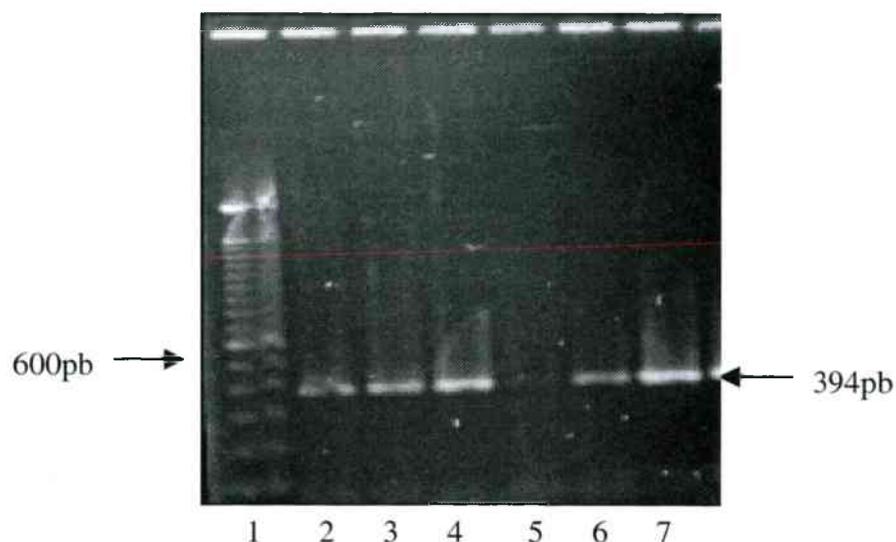


Figura 8: Determinação da eficiência da remoção de inibidores da reação de RT-PCR pela técnica de extração do RNA viral de diferentes amostras de extratos tissulares de ostras, inoculados com 5×10^6 pfu de poliovírus.

Linha 1: Padrão de peso molecular; Linhas 2, 3, 4 e 6 : RNA obtido de extratos tissulares de ostras; Linha 7 Controle positivo (RNA viral obtido da solução estoque de PV).

4.6 Reações de RT-PCR dos RNAs obtidos da solução estoque de poliovírus e dos extratos tissulares de ostras.

A análise dos resultados das reações de RT-PCR baseou-se na detecção visual das bandas dos produtos amplificados, assim como na intensidade das mesmas.

4.6.1 Definição dos iniciadores para a reação de transcrição reversa

Neste ensaio foram utilizados dois iniciadores para a reação de transcrição reversa: o iniciador randômico, que é um hexâmero que se liga à seqüências comuns de diversos genomas virais e o iniciador Polio-R específico para a região 5' não codificadora do genoma do PV.

A comparação entre os dois protocolos (A e B) foi realizada primeiramente com o RNA do PV obtido da solução estoque viral, o qual se encontrava na concentração de 31 μ g/ml.

Na Figura 9 observa-se que, na reação de RT-PCR utilizando 150ng deste RNA e o iniciador randômico, houve a formação de uma banda de amplificação (linha 6) visivelmente mais fraca em comparação com aquela da reação utilizando o iniciador Polio-R e a mesma quantidade de RNA.

Posteriormente, este iniciador foi testado com RNA viral extraído de extratos tissulares de ostras. A Tabela 8 mostra os resultados dos extratos obtidos de ostras inoculadas com 6 x 10⁶pfu do PV, onde pôde-se observar que as amostras que não foram amplificadas com o iniciador randômico, mas foram positivas quando o iniciador específico para PV foi utilizado.

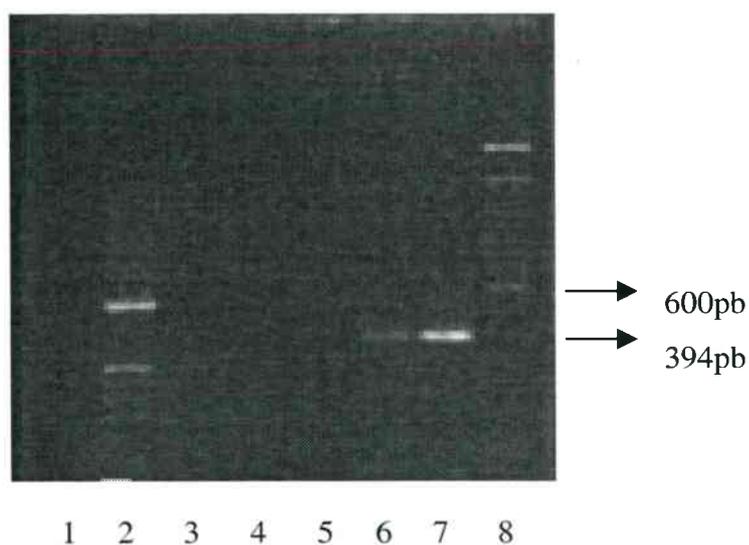


Figura 9: Eficiência da reação de RT-PCR utilizando iniciador randômico e iniciador Polio-R na síntese do cDNA.

Linhas 2 e 8 :Padrão de peso molecular

Linha 3: Controle negativo

Linha 6: RNA de PV amplificado com 50pmoles de iniciador randômico

Linha 7: RNA de PV amplificado com 100 pmoles de iniciador Polio-R

Tabela 8: Comparação da sensibilidade da reação de RT-PCR utilizando o iniciador randômico e o iniciador Polio-R, em diferentes amostras de ostras semeadas com poliovírus na concentração de $6,0 \times 10^6$ pfu/ml.

Amostras	Iniciador randômico (50pmoles/ μ l)	Iniciador Polio-R (100pmoles/ μ l)
Controle +	+	+
1	-	+
2	-	+
3	-	+/-
4	-	-

Controle + : RNA da solução estoque viral

(+): RT-PCR positivo

(-) : RT-PCR negativo

(+/-): Amplificação fraca

4.6.2 Determinação das concentrações ideais dos componentes do tampão e do pH para a reação de PCR

Este ensaio permitiu testar simultaneamente três variáveis importantes na reação de PCR: o pH e as concentrações ideais de $MgCl_2$ e de KCl . Para efeito de comparação, também foi realizada uma reação utilizando a mistura comercial de PCR SuperMix®, seguindo o protocolo B.

A Figura 10 mostra que a amplificação de 150ng de RNA viral ocorreu com os 12 tampões e com a PCR SuperMix®, mas pôde-se observar algumas diferenças. É notória uma menor intensidade na amplificação do RNA quando utilizada a mistura comercial PCR SuperMix® (linha 1). Entre os produtos amplificados, bandas mais intensas foram obtidas com os tampões 1, 2 5 e 9 (linhas 3, 4, 7 e 11, respectivamente), além de apresentarem rastros menores no gel de corrida. Apesar do restante das bandas formadas poderem ser consideradas satisfatórias com respeito à amplificação do PV, foram escolhidos esses quatro tampões, pelas razões já mencionadas, e com o objetivo de serem testados, através da reação de RT-PCR, para avaliar a sensibilidade de detecção do genoma viral.

No que diz respeito à composição destes quatro tampões (Tabela 3), foi possível observar que a concentração final de $MgCl_2$ (1,5 mM) se mantém constante nos quatro tampões. No que se refere ao pH, a reação aparentemente ocorreu de forma semelhante para os três valores. Quando o pH foi de 8,3 a concentração final de KCl não pareceu ser determinante para a amplificação, pois esta ocorreu tanto com 2,5 como com 7,5mM de KCl (tampões 1 e 2). Já nos valores de pH de 8,8 e 9,2, a concentração de KCl permaneceu constante em 2,5mM (tampões 5 e 9).

A combinação do pH 9,2 com a concentração maior de KCl (7,5mM) mostrou-se menos sensível, como pode ser observado no produto do tampão 10 (linha12). Os tampões 11 e 12, que também amplificaram mais fracamente o RNA viral, têm uma concentração de $MgCl_2$ de 3 mM (linhas 13 e 14).

A composição da mistura comercial PCR SuperMix® tem grande semelhança com aquela encontrada nos tampões considerados mais eficientes. No protocolo desenvolvido por COELHO (2001), a concentração de $MgCl_2$ foi acertada para 3 mM, o que poderia explicar a menor intensidade da banda formada (Linha 1).

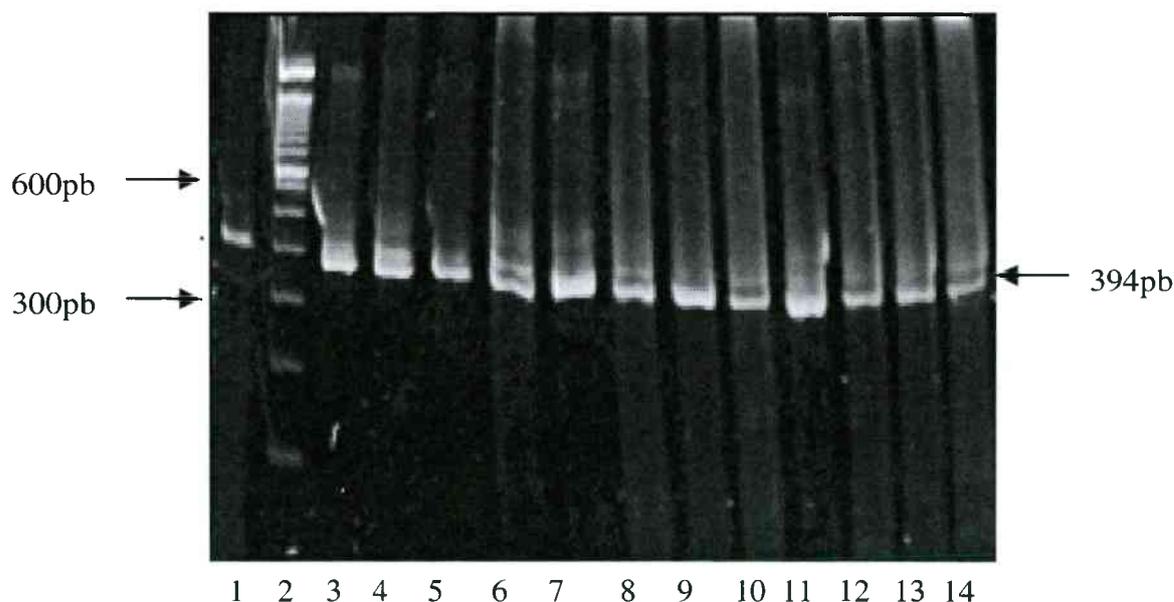


Figura 10 : Determinação das concentrações ideais dos componentes do tampão e do pH para a reação de PCR. Linha 1: RNA amplificado utilizando a mistura comercial PCR SuperMix®; Linha 2: Marcador de tamanho molecular; Linhas 3 a 14: RNA amplificado com os tampões 1 ao 12, respectivamente

4.6.3 Determinação do limite de sensibilidade da reação de RT-PCR

Com o propósito de avaliar os limites de sensibilidade da reação de PCR, foram amplificadas diluições seriadas do RNA do PV, extraídos tanto de cultura celular quanto de extratos tissulares de ostras, a fim de verificar a maior diluição na qual foi possível a detecção do PV, definindo o tampão de PCR mais eficiente. A mistura comercial PCR SuperMix® apresenta vantagens com relação ao tempo e facilidade de preparação e, como já mencionado anteriormente, por apresentar semelhança com a composição dos tampões 1,2,5 e 9, ela foi também testada quanto à sensibilidade de detecção.

Os resultados obtidos com a mistura comercial PCR SuperMix®, nas duas concentrações testadas de $MgCl_2$ (1,65mM e 3,0mM), são apresentados na Figura 11, onde pode ser observado que o limite mínimo de detecção do PV foi de 9,2 ng tanto para o RNA obtido de cultura de células, como dos extratos tissulares de ostras (Linha 4 Fig. 11A e linhas 5 e 9 Fig. 11B).

No teste com os tampões 1 e 2, a sensibilidade máxima alcançada também foi de 9,2 ng de RNA, como é mostrado na Figura 12 (linhas 2 e 5). Com os tampões 5 e 9 foi possível detectar até 0,1ng de RNA (Figura 13) (linha 6, Fig. 13A; linha 5, Fig. 13B).

As bandas formadas pelo tampão 9 apresentaram-se ligeiramente mais intensas nas duas últimas diluições em comparação com àquelas formadas com o tampão 5. Ambos tampões apresentam as mesmas concentrações de $MgCl_2$ e KCl (Tabela 3). Os valores de pH destes dois tampões são de 8,8 e 9,2 e pode-se constatar que estes valores foram decisivos para a sensibilidade da reação.

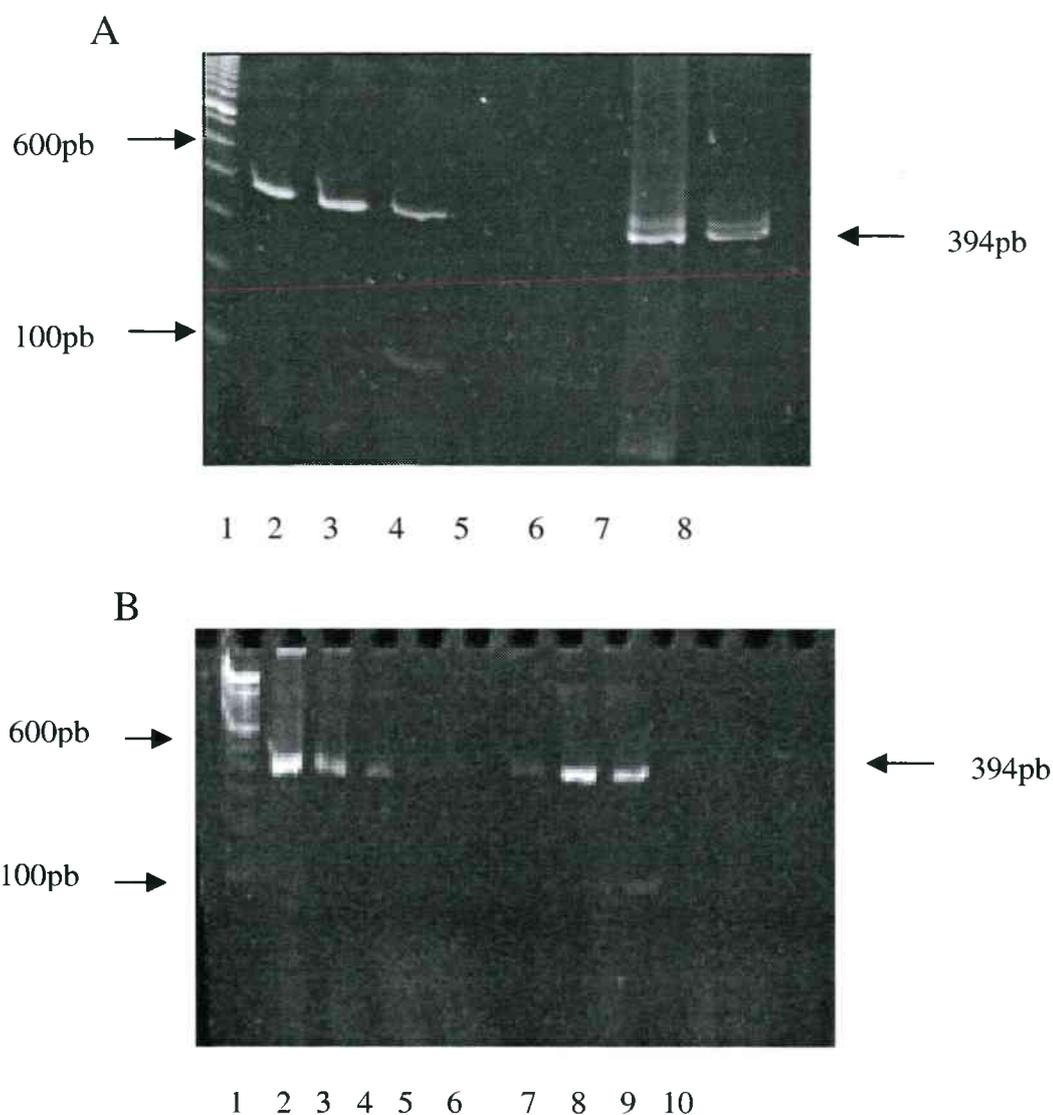


Figura 11: Determinação do limite de sensibilidade de detecção do RNA do poliovírus por RT-PCR, utilizando a PCR SuperMix® e diferentes diluições do RNA do poliovírus da solução estoque viral e dos extratos tissulares de ostras.

A: PCR SuperMix® com 1.65mM de $MgCl_2$. Linha 1- Padrão de peso molecular. Linha 2 e 3 - RNA do extrato de ostras na concentração de 18,4 ng. Linha 4 e 5 - RNA do extrato de ostra na concentração de 9,2ng e 4,6 ng. Linhas 7 e 8 - RNA da solução estoque de PV na concentração de 147,5 ng.

B: PCR SuperMix® com 3,0mM de $MgCl_2$. Linha 1- Padrão de peso molecular. Linha 2 a 6- RNA da solução estoque de PV nas concentrações de 147,5ng, 73,7ng, 18,4ng, 9,2ng e 4,6ng respectivamente. Linhas 8 a 10 - RNA do extrato de ostras nas concentrações de 18,4ng, 9,2ng e 4,6 ng respectivamente.

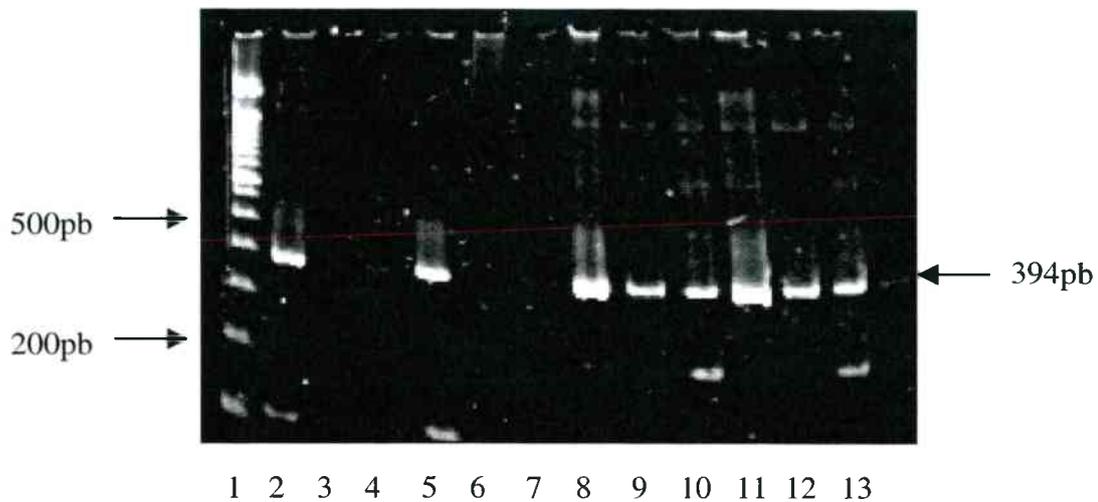


Figura 12: Determinação do limite de sensibilidade de detecção do RNA do poliovírus por RT-PCR, utilizando os tampões 1, 2, 5 e 9 e diferentes diluições do RNA do poliovírus isolado a partir dos extratos tissulares de ostras.

Linha 1 - Padrão de peso molecular

Linhas 2 a 4 - RNA amplificado com o tampão 1 na concentração de 9,2ng, 4,6ng e 2,3ng de RNA, respectivamente; linhas 5 a 7 com tampão 2; linhas 8 a 10 com tampão 5 e linhas 11 a 13 com tampão 9.

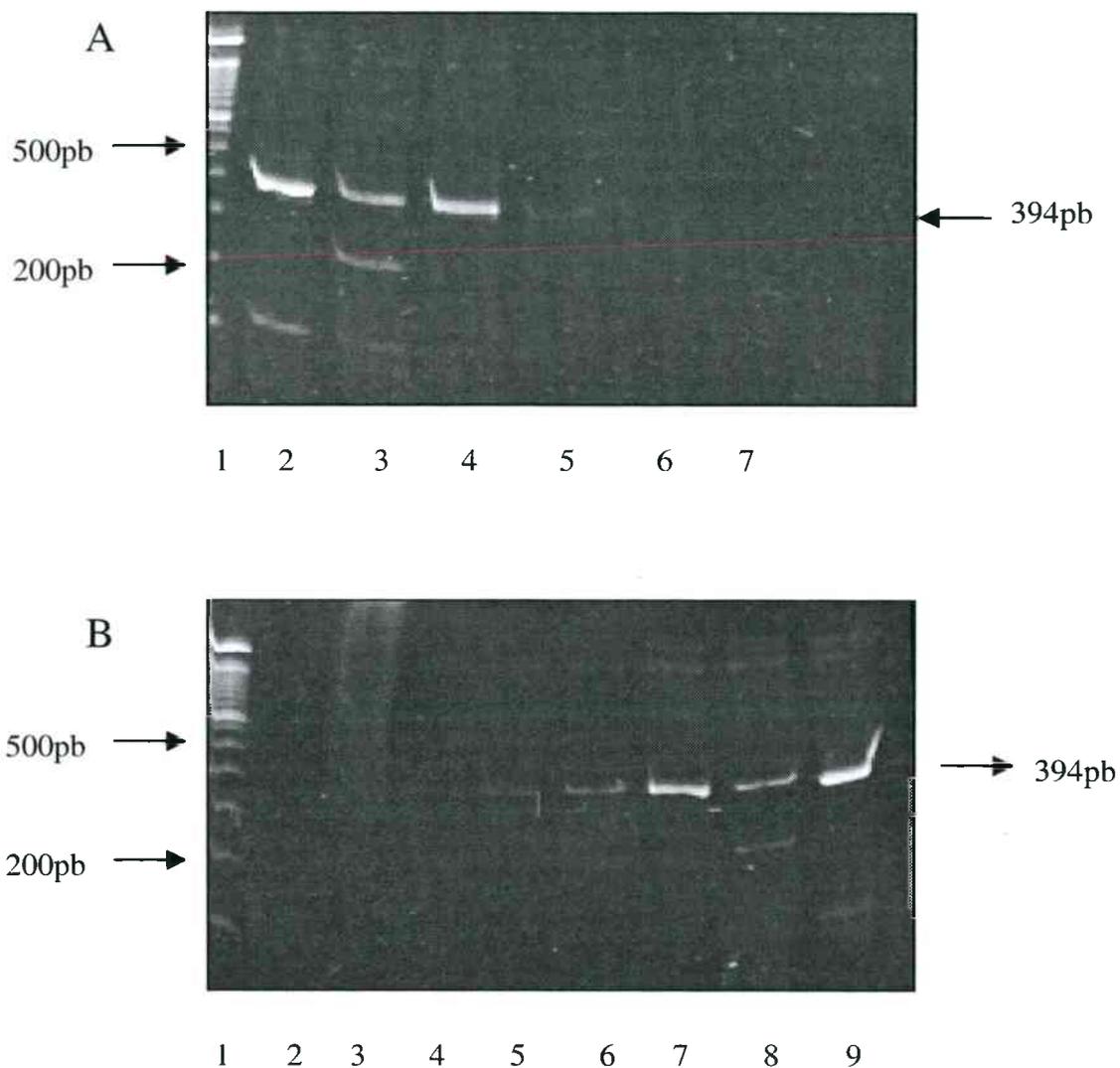


Figura 13: Limite de sensibilidade de detecção do RNA do poliovírus isolado a partir dos extratos tissulares de ostras, utilizando os tampões 5 e 9.

A: Tampão 5

Linha 1 - Padrão de peso molecular

Linhas 2 a 6 - Concentrações de RNA de 9,2; 1,1; 0,5; 0,2 e 0,1ng respectivamente

B: Tampão 9

Linha 1 - Padrão de peso molecular

Linha 2 - Controle negativo

Linhas 5 a 9 - Concentrações de RNA de 0,1; 0,2; 0,5; 1,1 e 9,2ng respectivamente

4.7 Ensaio de RT-PCR associado à cultura celular para detecção do PV em ostras submetidas à bioacumulação.

Neste ensaio as ostras que foram submetidas à bioacumulação, com diferentes concentrações de PV, mimetizaram amostras contaminadas no ambiente natural. Cada grupo de ostras foi analisado por RT-PCR direto (reação a partir do RNA isolado do extrato de ostras) e RT-PCR associado à cultura celular (RNA isolado das células infectadas por PV presente nos extratos de ostras).

A Figura 14 mostra que a análise direta dos extratos de ostras pela reação de RT-PCR foi positiva, embora as bandas formadas se apresentassem pouco intensas (Fig. 14A linhas 3 e 9; Fig. 14B linha 3). A Tabela 9 mostra que para a bioacumulação 1, somente 20% do total analisado foi positivo, nas bioacumulações 2 e 3 os valores foram de 60%. A sensibilidade de detecção da reação foi de 3 pfu de PV.

Os dados obtidos com as duas técnicas associadas mostram que o PV não pode ser detectado em tempos inferiores a 1h de incubação, para todas as bioacumulações, indicando que o nível de seqüências do PV encontrado nos extratos na diluição 1:32, utilizada para inocular as células, não foi detectado pela reação de RT-PCR antes do crescimento em cultura celular. Após 24h de crescimento, 100% das amostras analisadas das bioacumulações 1, 2 e 3 foram positivas (Tabela 9).

A associação das duas técnicas se mostrou mais eficiente, porque incrementa de forma indireta a sensibilidade de detecção da reação de PCR, devido ao aumento do número de partículas virais infectantes, após algumas horas de incubação dos extratos de ostras em células. O limite de detecção da reação, mediante esta técnica foi de 0,04 pfu de PV por volume de reação.

Para o ensaio de bioacumulação 4 não foi verificada amplificação do PV em nenhuma das duas técnicas.

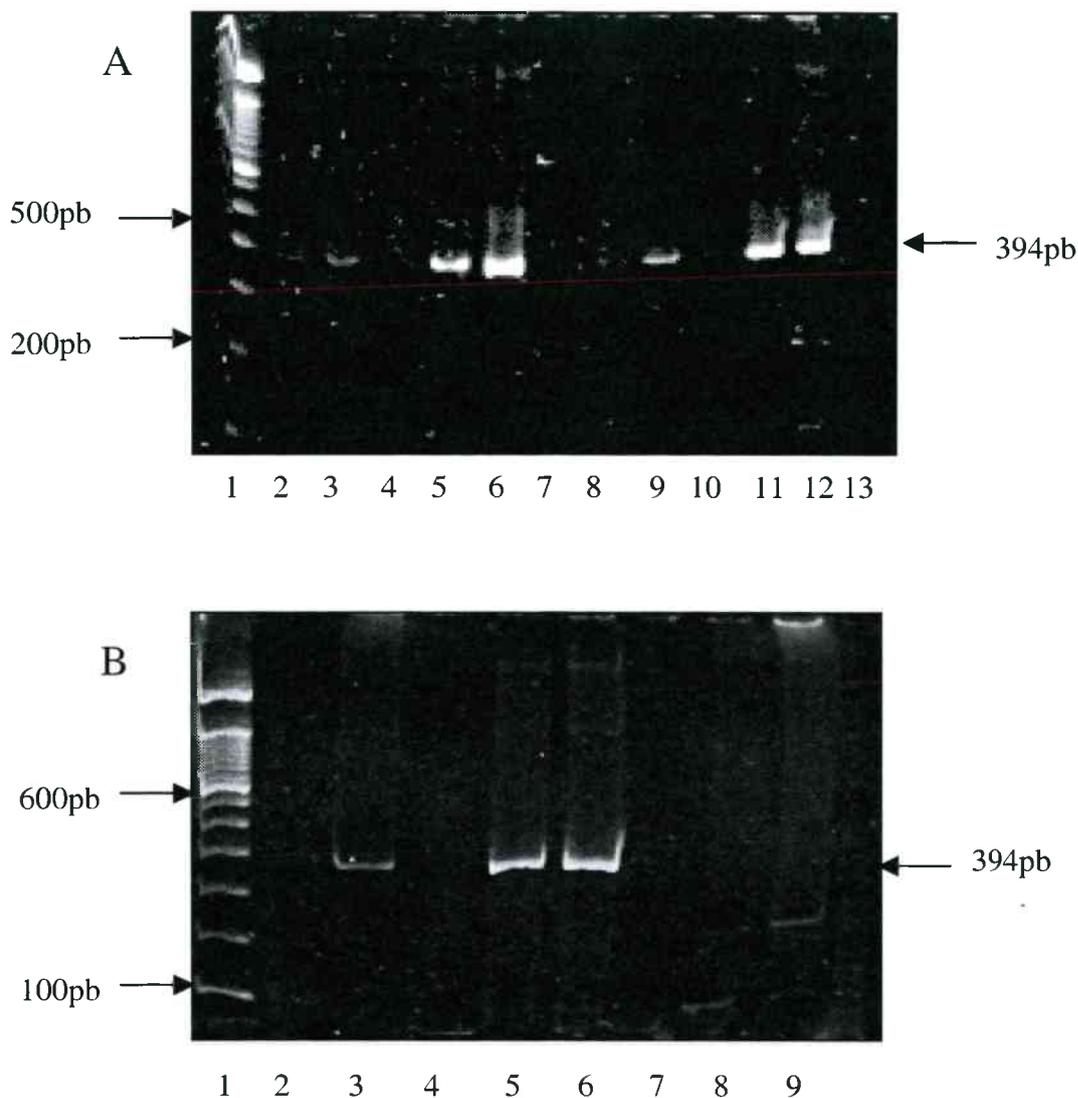


Figura 14: Reação de RT-PCR associada à cultura celular para a detecção de poliovírus em ostras submetidas a bioacumulação.

A: Extratos de ostras na concentração de $5,1 \times 10^3$ PFU/mL (Linhas 2 a 5) e $2,0 \times 10^3$ PFU/mL (Linhas 8 a 12) obtidos da bioacumulação 1e 2.

Linha 1: Padrão de peso molecular; linhas 2 e 7: Controles negativos; linhas 3 e 9: Extratos de ostras. Linhas 4 e 1: Extrato de ostra com menos de uma hora de incubação; linhas 5 e 11: 24h de incubação; linhas 6 e 12: 48h de incubação.

B: Extratos de ostras na concentração de $4,2 \times 10^2$ PFU/ml (Linhas 2 a 5) obtido da bioacumulação 3. Linha 1: Padrão de peso molecular; linha 2: Controle negativo; linha 3: Extratos de ostras; linha 4: Extrato de ostra com menos de uma hora de incubação; linha 5: 24h de incubação; linha 6: 48h de incubação; linhas 7 a 9: Biacumulação 4

Tabela 9: Detecção do poliovírus em ostras submetidas a bioacumulação através da análise direta dos extratos, pela reação de RT-PCR.

Bioacumulação	Pfu/ volume de reação	Nº de positivos/ Nº de réplicas	% de reações positivas
1	24	1/5	20
2	14	3/5	60
3	3	3/5	60
4	0,1 [*]	0/5	0

(*): Valor teórico calculado com base no valor estimado de recuperação viral pela equação de regressão: $y = -33,16 + 0,12x$

Tabela 10: Detecção do poliovírus em ostras submetidas à bioacumulação através da técnica associada de RT-PCR à cultura celular.

Bioacumulação	pfu/ volume de reação	Nº de positivos/ Nº de réplicas	% de reações positivas
1	0,16	3/3	100
2	0,11	3/3	100
3	0,04	3/3	100
4	0,01 [*]	0	0

(*): Valor teórico calculado com base no valor estimado de recuperação viral pela equação de regressão: $y = -33,16 + 0,12x$

5. DISCUSSÃO

Desde 1998, o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC vem desenvolvendo metodologias de detecção de patógenos humanos em moluscos, cultivados na orla litorânea de Santa Catarina, com o objetivo de serem utilizadas no controle sanitário dos mesmos. Os resultados obtidos até o momento demonstraram que é possível detectar rotavírus (RV) liberados nas fezes e que se acumulam nos tecidos de moluscos. A técnica foi padronizada por inoculação experimental de RV nos moluscos (SANTOS, 2000), sendo que também foi detectado o vírus da hepatite A (HAV) tanto em ostras inoculadas no laboratório como em amostras contaminadas no próprio ambiente onde as mesmas são cultivadas (COELHO, 2001).

5.1 Avaliação da recuperação do poliovírus a partir dos extratos tissulares de ostras, através do ensaio de formação de placas de lise.

O desenvolvimento de protocolos eficientes de extração de vírus entéricos a partir de tecidos de moluscos e a posterior concentração dos mesmos em um volume pequeno de amostra são etapas importantes na padronização das metodologias de detecção viral, tanto moleculares, como a reação de RT-PCR, quanto convencionais, como a cultura de células. Nesse último caso, o sucesso dos protocolos está relacionado à remoção eficiente de substâncias tóxicas para as células em cultura e uma boa recuperação das partículas virais. LEES (2000), em uma revisão das técnicas desenvolvidas e relatadas na literatura, concluiu que a ausência de consenso ou de padronização das mesmas dificulta a comparação eficaz de resultados. O mesmo autor divide estas técnicas em duas categorias: extração-concentração e adsorção-eluição-concentração, enumerando ainda variações em cada uma delas.

Neste trabalho, as ostras inoculadas com poliovírus foram processadas pelo método de adsorção-eluição-concentração, visando extrair as partículas virais dos tecidos dos moluscos e concentrar a amostra num pequeno volume. O uso do meio triptose-fosfato (TPB), em presença do tampão glicina, pH 9, para a eluição viral, foi adotado por ser um

eluente simples, capaz de propiciar um bom índice de recuperação de partículas virais, como observado por LEWIS & METCALF (1988), BARARDI *et al.* (1999), SHIEH *et al.* (1999) e SANTOS *et al.* (2001). Neste caso, os vírus são separados dos sólidos presentes nos tecidos das ostras, através do controle das concentrações salinas e do pH (SOBSEY *et al.* 1978).

A precipitação das partículas virais foi realizada utilizando-se polietilenoglicol (PEG), que é um polímero sintético, quimicamente inerte, não tóxico, solúvel em água e amplamente utilizado na precipitação de proteínas (LEWIS & METCALF, 1988). Conforme observado por LEGGIT *et al.* (2000), a concentração desse polímero é fundamental para uma precipitação eficiente das partículas virais. O critério para a escolha do PEG 8000 utilizado na precipitação do poliovírus, baseou-se nos resultados obtidos por TRAORE *et al.* (1998), que mostrou que a recuperação do PV utilizando eluição alcalina com tampão glicina e PEG 8000 foi mais eficiente quando comparado à utilização do PEG 6000, sendo que foram encontradas recuperações virais de 92 % e 79%, respectivamente.

Quando o ensaio de formação de placas de lise foi utilizado para avaliar a taxa de recuperação viral, no caso das ostras inoculadas diretamente nos tecidos, o resultado foi de 23,8% (Tabela 6). Este valor pode ser considerado baixo quando comparado com outros relatados na literatura. SHIEH *et al.* (1999) encontraram taxas de recuperações para PV tipo 3 que variaram de 10% até 76%, quando foram comparadas duas metodologias de eluição: a adsorção-eluição ácida e a eluição alcalina, seguidas de duas precipitações com PEG 8000 e utilizando o ensaio de formação de placas de lise para quantificar as partículas do PV recuperadas.

O ensaio de formação de placas de lise quantifica as partículas virais viáveis, ou seja, que possuem capacidade de infectar células em cultivo. A taxa de recuperação do vírus da hepatite (HAV), encontrada por COELHO (2001), utilizando as mesmas metodologias de extração e de concentração viral, foi de 75,7 %, valor este determinado pela reação de RT-PCR. Esta reação não discrimina se o produto gênico amplificado provém de uma partícula viral viável ou não, sendo esta uma das razões que poderia explicar as diferenças nos valores de recuperação obtidos no presente trabalho. TRAORE *et al.* (1998) encontraram recuperações virais de 79%, sendo que a detecção dos vírus recuperados também foi realizada por RT-PCR. BARARDI *et al.* (1999) compararam a

recuperação de rotavírus mediante duas metodologias: a primeira foi a mesma utilizada no presente trabalho e a segunda, utilizou a eluição alcalina em alta salinidade, Cat-Floc® e PEG 6000 para precipitação dos vírus. As partículas virais recuperadas foram detectadas por citometria de fluxo, sendo que não houve diferença significativa entre ambas as metodologias, mostrando uma recuperação média de 86%.

Um outro fato que poderia explicar esta baixa recuperação foi o observado na utilização dos extratos controles positivos (extratos inoculados ao final do processo) (Figura 4), que representaria 100% de recuperação viral, quando a recuperação foi de 75,5% (Tabela 6), mostrando que houve uma perda média de 24% em relação à quantidade de vírus inicialmente inoculada. Este resultado parece indicar que houve inativação do PV, quando em contacto com o extrato tissular das ostras, como também foi observado por HERRERO *et al.* (1999), que trabalharam na detecção de vírus entéricos em moluscos coletados de ambientes contaminados com efluentes de esgotos domésticos e resíduos industriais. Estes autores demonstraram ainda que os fluidos dos moluscos analisados foram capazes de inativar o PV tipo 1, quando comparados às carnes dos mesmos. Da mesma forma, amostras mais citotóxicas interferiram na adsorção dos vírus às células, apesar do efeito tóxico de algumas amostras às vezes não ter sido aparente. WILLIAMS & SHAY FOUT (1992) observou que, extratos de moluscos adicionados às células em cultura, embora não interferissem aparentemente com a morfologia das mesmas, o número de placas de lise formadas pelas partículas virais, reduzia-se em até 50%. Este mesmo autor afirma também que diferentes linhagens celulares, assim como células de uma mesma linhagem, mas derivadas de passagens diferentes, podem exibir sensibilidade distinta aos vírus.

A média de recuperação viral para estes extratos mostrou um coeficiente de variação alto (54%), corroborando as observações descritas anteriormente, e aquelas assinaladas por LEES *et al.* (1994) e SHIE *et al.* (1999), que a composição tecidual dos moluscos varia com o local de cultivo, as estações do ano e a qualidade dos efluentes. Em meses frios, as ostras acumulam mais substâncias inibidoras da reação de PCR como o glicogênio de reserva, que se não for eficientemente removido, alterará a detecção viral. O coeficiente de variação para os extratos utilizados para a avaliação da recuperação viral foi de 20%

(Tabela 6) indicando que, provavelmente, o lote de animais utilizado para estes experimentos possuía uma composição tecidual mais homogênea.

No caso das ostras que foram submetidas à bioacumulação, a taxa de recuperação viral foi de 11,0 % (Tabela 7). Vários fatores podem ter contribuído para este índice de detecção: perdas durante o processamento dos tecidos das ostras para a obtenção dos extratos tissulares; adesão dos vírus às paredes do aquário e/ou mangueira de aeração ou, então, eliminação nas fezes ou pseudofezes. Pode-se afirmar que o valor detectado de poliovírus não reflete a eficiência da recuperação das partículas virais, pois não pode ser controlado de forma exata a quantidade de vírus inoculada/g de tecido, mas que de fato a técnica para separar os vírus dos tecidos das ostras e concentrá-los funcionou da forma esperada.

Este ensaio também indica que as ostras efetivamente bioacumularam o poliovírus e o comportamento de bioacumulação pareceu ser constante em todas as repetições, como mostra a análise de regressão aplicada as duas variáveis testadas (concentração de vírus inoculados na água do mar vs concentração de vírus recuperados). Pode-se constatar que existe uma estreita correlação entre ambas, sendo que, quanto maior for a concentração a ser inoculada, maior será a possibilidade de detecção, nos limites de 5×10^2 e 5×10^4 pfu/ml, conforme o coeficiente de regressão obtido (0,998). Resultados semelhantes foram encontrados por CROMEANS *et al.* (1997) na avaliação da recuperação viral em ostras contaminadas com o vírus da hepatite A (HAV) por bioacumulação durante 24h, com concentrações de vírus que variaram de 10^3 a 10^4 pfu. Estes autores relataram uma recuperação viral de 10%, determinada pelo ensaio de formação de placas de lise, à semelhança da encontrada no presente trabalho.

Durante a preparação dos extratos tissulares das ostras submetidas à bioacumulação, foram utilizadas alíquotas de 20g de tecido. Pode-se constatar que esses extratos ficaram menos viscosos, e as perdas de material nas paredes dos tubos, no pistilo do aparelho de ultra-som e/ou nas ponteiros foram mínimas, contrariamente ao que acontecia quando se trabalhava com 40g tecido. Cabe ressaltar que a eficiência da eluição das partículas virais melhora com o incremento no volume do eluente (LEGGITT & JAYKUS, 2000). Como o peso dos tecidos processados diminui pela metade,

provavelmente, deve ocorrer uma eluição mais eficiente. Estes fatos podem ser levados em conta para aperfeiçoar a técnica, tornando-a mais eficiente na recuperação viral.

Novas investigações poderão ser realizadas a fim de explorar outros fatores que possam afetar a recuperação viral. Isto poderá ser feito através da ampliação do número de amostras testadas, em função da diversidade da sua composição, com lotes de moluscos de um único local e períodos de coleta maiores.

5.2 Avaliação da técnica de extração do RNA viral a partir dos extratos tissulares de ostras para a remoção de inibidores da reação de RT-PCR

No final da década de 70, com o advento das metodologias moleculares, foram desenvolvidas técnicas alternativas visando aumentar a sensibilidade de detecção de vírus em amostras ambientais. O desenvolvimento da técnica de PCR, que permite a detecção de seqüências gênicas de microrganismos pela sua amplificação, aprimorou a possibilidade de avaliação da presença de vírus entéricos no meio ambiente. Entretanto, um dos principais problemas enfrentados por esta técnica é a freqüência com que as amostras ambientais apresentam substâncias inibidoras, capazes de interferir no sistema enzimático utilizado na reação, inibindo o processo de amplificação. LEES (2000) afirma que numerosos processos envolvendo a remoção efetiva de compostos inibidores, durante a extração dos ácidos nucléicos, são amplamente relatados na literatura.

As técnicas de amplificação gênica estão bem padronizadas, mas os métodos usados para a preparação das amostras a serem utilizadas nesta técnica, dependem muito da natureza do espécime a ser testado. Atualmente, diversas técnicas, de complexidade variável, estão disponíveis, desde a simples fervura da amostra, até métodos mais elaborados envolvendo lise celular em tampão salino na presença de detergentes e enzimas proteolíticas, seguidas por extração orgânica, todas elas com o intuito de eliminar inibidores das amostras (ARNAL *et al.*, 1999).

Outras tentativas, com este mesmo objetivo, foram realizadas nos trabalhos desenvolvidos por ROMALDE *et al.* (1994), ATMAR *et al.* (1995), SCHWAB *et al.* (1998), que trabalharam na determinação da concentração de inibidores, encontrados em diferentes partes dissecadas de ostras inoculadas experimentalmente ou contaminadas no

ambiente com vírus entéricos. SCHWAB *et al.* (1998) encontraram maior concentração de inibidores no músculo adutor, seguido do trato gastrointestinal e hemolinfa. Segundo LE GUYADER *et al.* (2000), resultados melhores e mais representativos foram obtidos mediante a análise do tecido digestivo ou do hepatopâncreas, quando comparada à análise dos moluscos como um todo, sem dissecção.

O método de extração e purificação do RNA viral a partir do extrato tissular de ostras, utilizado neste trabalho, foi realizado mediante digestão com a enzima proteinase K, extração orgânica com fenol e clorofórmio, e purificação com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Este último composto é um detergente catiônico utilizado na precipitação seletiva dos ácidos nucleicos e eliminação de polissacarídeos das amostras (STRAUB *et al.*, 1994; ARNAL *et al.*, 1999; SHIE *et al.*, 1999; LEES, 2000). Foi também utilizado Freon®, como agente clarificante, para a remoção de lipídeos, pigmentos e resíduos celulares (DIX & JAYKUS, 1998; SCHWAB *et al.*, 1999).

Quando foram utilizados os extratos controles, foi possível detectar o PV em todos eles (Figura 8); este dado poderia demonstrar que, de fato, foram removidos os inibidores presentes nos extratos tissulares das ostras. Outro dado que confirma a eficiência da técnica é que o limite de sensibilidade de detecção da reação de RT-PCR, encontrada para o RNA isolado da solução estoque viral, foi o mesmo que aquele encontrado para o RNA isolado dos extratos tissulares de ostras. Nos dois casos foi de 1,1ng; este dado não pode ser documentado, mas a Figura 11 mostra o limite de sensibilidade para ambos como sendo de 9.2ng.

A remoção de inibidores pode ser feita através de métodos químicos, mas também físicos, utilizando simples diluições ou separação cromatográfica. Foi observado que, para amostras de RNA do PV isolado dos extratos tissulares de ostras, e que foram diluídos com água em volumes menores que 400µl, a detecção pela reação de RT-PCR não ocorreu, como também observado por ABBASZADEGAN *et al.* (1999). Estes pesquisadores demonstraram que diluições crescentes de amostras de RNA aumentavam a eficiência da amplificação. Isto sugere que a técnica utilizada neste trabalho ainda requer diluição do RNA em volumes de, no mínimo, 400µl, para a diluição simultânea dos inibidores da reação de RT-PCR. O RNA isolado da solução estoque viral, que foi usada como referência de amostra ausente de inibidores, pode ser diluída em volumes menores de 50µl.

Devido ao fato, já amplamente discutido, da grande variação da composição tecidual e da presença de inibidores entre lotes de ostras, foi necessária a inclusão de extratos controles positivos, processados simultaneamente e testados em todas as reações de RT-PCR para detecção do PV em ostras. Este procedimento facilitou a interpretação dos dados, já que a ausência de amplificação do controle positivo não significa que não existem seqüências gênicas a serem amplificadas, mas que esse lote de ostras continha possivelmente inibidores e, portanto, a reação de RT-PCR foi negativa.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por COELHO (2001), que utilizou as mesmas técnicas, tanto para obtenção dos extratos tissulares de ostras quanto para a extração do RNA do vírus da hepatite A, com valores de detecção de 75,5% a 100%. ARNAL *et al.* (1999) compararam sete metodologias de extração do RNA do HAV, em amostras de fezes e moluscos, e encontraram taxas de detecção que variaram de 0 até 92%. Este último valor foi encontrado utilizando PEG 6000 para a obtenção do extrato tissular de ostras e CTAB para a remoção de inibidores. Taxas de detecção do PV, semeado em moluscos, que variaram de 38 a 74%, foram encontradas por DIX & JAYKUS (1998), após tratamento com PEG 8000 e duas extrações sucessivas do RNA viral com Freon®.

5.3 Sensibilidade de detecção da reação de RT-PCR

Embora as reações de PCR já estejam padronizadas, existem ainda algumas variáveis no processo de amplificação, que podem causar dificuldades e que são inerentes a cada análise realizada, como a presença de impurezas nos iniciadores ou nas fitas moldes dos ácidos nucléicos, pois certas interações da fita molde com os iniciadores podem provocar amplificações não específicas ou mesmo amplificações fracas do produto desejado de PCR (SCHOETTLIN, NIELSON, MATHUR, 1993; SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Estes autores também afirmam que não existe um consenso sobre as condições salinas e pH ideal que devem ser usados para cada seqüência de DNA, e que estes efeitos deletérios podem ser minimizados otimizando-se as concentrações dos componentes do tampão de reação para cada tipo de iniciadores utilizados.

É importante ressaltar a influência da concentração do $MgCl_2$ na sensibilidade e especificidade da reação de PCR. Diversas etapas dessa reação, tais como o anelamento dos

iniciadores, a dissociação da fita molde e a atividade e a fidelidade das enzimas polimerizadoras, são influenciadas pela concentração do íon Mg^{++} . A presença de altas concentrações no tampão de reação pode provocar amplificações não específicas, enquanto que baixas concentrações podem reduzir a taxa em que a fita molde é copiada, resultando em diminuição de sensibilidade (SAMBROOK & RUSSEL, 2001; SIMMONDS, 1995).

Neste trabalho, a otimização dos componentes do tampão da reação foi realizada, visto a importância que ela representa na qualidade da amplificação. A utilização do Kit Opti-Prime™ simplificou notavelmente a determinação das concentrações de cada componente do tampão.

Foi constatado que, embora a amplificação do PV tenha acontecido com todos os tampões, inclusive com a mistura de PCR SuperMix® (Figura 10), nem todos tiveram o mesmo desempenho quanto à sensibilidade de detecção (Figuras 11, 12 e 13). Dos quatro tampões escolhidos (por apresentarem bandas mais intensas), esperava-se igual desempenho com respeito à sensibilidade de detecção do RNA viral. No entanto, isto não aconteceu, pois somente dois tampões conseguiram detectar até 0,1ng de RNA (Figura 13). Uma ligeira diferença na intensidade da banda, correspondente à última diluição testada, fez com que o tampão 9 (composição descrita na Tabela 3) fosse selecionado e considerado como sendo o mais específico para os iniciadores Polio-R e Polio-L e para a fita de cDNA, obtida da transcrição reversa do RNA do poliovírus.

A sensibilidade de detecção, encontrada para os extratos tissulares de ostras, utilizando o protocolo de RT-PCR estabelecido como sendo o mais sensível (protocolo C), foi de 3pfu do PV (Tabela 10). TSAI (1994) trabalhou com o mesmo par de iniciadores e o limite de detecção encontrado para as amostras de água do mar semeadas com PV foi de 1,2 pfu; quando ele trabalhou com águas de efluentes primários de esgotos, a sensibilidade de detecção diminuiu para 10 pfu. TSAI & PARKER (1998) detectaram até 0,6pfu em amostras de água do mar semeadas com PV, trabalhando com os mesmos iniciadores.

5.4 Ensaio de RT-PCR associado à cultura celular para detecção do PV em ostras submetidas à bioacumulação

Como já foi discutido, a detecção da contaminação viral no ambiente apresenta certos problemas que ainda persistem, sem que tenham sido totalmente resolvidos. Nos últimos anos, têm-se sugerido novas alternativas para contornar estes problemas. REYNOLDS *et al.* (1996, 1998 e 2001), GRABOW *et al.* (1999) propõem a associação da clássica e bem estudada metodologia de cultura celular para solucionar os problemas da técnica de PCR, que é facilmente inibida por substâncias comumente presentes em amostras ambientais, podendo provocar resultados falso-negativos. Outro fato é que os produtos amplificados não podem ser diferenciados como sendo de partículas infecciosas ou não. Este último dado é considerado essencial para as técnicas de rotina de detecção viral em alimentos, ou seja, a determinação das seqüências virais que possam realmente significar um perigo à saúde pública. As desvantagens da detecção da contaminação ambiental por vírus, utilizando a técnica de infecção de células em cultura, são a baixa especificidade, o longo período de tempo empregado para a detecção de vírus, e o fato de não poder realizá-la com vírus de difícil adaptação em cultura, presentes em contaminações ambientais como HAV e vírus Norwalk. O poliovírus, assim como outros vírus do gênero *Enterovírus* apresentam a vantagem de se replicar em cultura celular, razão pela qual foi possível a utilização desta técnica no desenvolvimento deste trabalho.

A técnica associada fundamenta-se na fusão das vantagens das duas metodologias de detecção de vírus no ambiente: a de PCR, como sendo uma técnica sensível e rápida, e a da cultura de células, que permite detectar partículas virais infectantes. Nesta associação de técnicas as amostras são primeiramente cultivadas em cultura de células e os sobrenadantes celulares resultantes são analisados por RT-PCR. Deste modo, há um incremento indireto do volume analisado, a presença de inibidores é reduzida pela diluição da amostra em meio de cultura e, finalmente, as partículas virais infectantes são detectadas através da reação de RT-PCR, de forma rápida e sensível. Cabe ressaltar que amostras ambientais com baixos níveis de contaminação, após algumas horas de incubação em cultura de células, os vírus se replicam e a concentração de partículas virais presentes aumenta de tal forma que estes passam a ser detectadas pela reação de PCR, aumentando indiretamente a sensibilidade de detecção da mesma (REYNOLDS *et al.*, 2001)

Resultados promissores para a detecção de vírus de difícil adaptação em cultura de células foram descritos por REYNOLDS *et al.* (2001) que, ao utilizarem esta técnica,

puderam detectar o vírus da hepatite A, o qual requer um tempo muito longo, com inúmeras passagens *in vitro*, para se adaptar à cultura de células. Mas estes autores concluíram que a incubação de, no mínimo, 72h já permitiu a detecção deste vírus, mesmo sem ter sido observado efeito citopático nas células.

A aplicação da associação destas duas técnicas, até o momento, utilizada pelos autores acima mencionados somente na análise de águas contaminadas, surgiu como uma proposta que poderia ser aplicada no monitoramento da contaminação viral de ostras de cultivo. Para isto foram utilizados lotes de 12 ostras submetidas à bioacumulação em laboratório, semeando água do mar com diferentes concentrações do PV, com o intuito de mimetizar um ambiente natural poluído, no qual as ostras seriam contaminadas durante o processo de filtração. Os extratos tissulares (cinco para cada bioacumulação) foram comparados quanto à detecção do PV de duas formas: a primeira, analisando diretamente os extratos tissulares através da reação de RT-PCR e, a segunda, utilizando a reação de RT-PCR associada à cultura celular. Os resultados da detecção direta, mostrados na Tabela 9, mostram que a detecção do PV foi de 20% para um lote de ostras e de 60% para os outros lotes. Devido ao fato de que estes resultados derivam da análise de uma mesma amostra, cabe aqui ressaltar a probabilidade de obtenção de resultados falso-negativos. Para GREEN & LEWIS (1999), a falha da reação de PCR em detectar vírus em amostras positivas ocorre já que a existência de diferentes concentrações de inibidores em cada amostra, poderia ter efeitos negativos na eficiência da concentração e purificação viral, ou ter ainda degradado o RNA viral. REYNOLDS *et al.* (1998) afirmam que os inibidores não são o único fator limitante da análise direta de amostras pela reação de PCR, mas também o volume pequeno que pode ser testado em uma simples reação. Quando as amostras contêm baixos níveis de contaminação viral, como é o caso de amostras ambientais, a probabilidade de ter a seqüência gênica de interesse no tubo de reação se torna casual. Este último fato acredita-se, poderia explicar os resultados obtidos quando os extratos foram diretamente analisados pela reação de RT-PCR, como mostra a Tabela 9, onde a quantidade de unidades formadoras de placas (pfu) utilizada por volume de reação foi pequena, variando de 3 até 24pfu.

No ensaio de bioacumulação 4 não houve detecção do PV, tanto através da cultura celular como da reação de RT-PCR. Através da análise de regressão foi estimada uma

recuperação viral de 26,4pfu/ml (Tabela 7) para este ensaio. A partir do resultado anterior, calculou-se que na cultura de células estaria-se inoculando apenas 0,42 pfu do PV e para a reação de RT-PCR o valor seria de 0,1pfu (Tabela 9). Ambos os valores mostram que a probabilidade da seqüência gênica encontrar-se na porção de amostra analisada, torna-se mínima.

Dos resultados obtidos com a associação das duas técnicas, pode ser observado que, após 24h de incubação dos extratos em cultura celular, a taxa de detecção viral foi de 100% (Tabela 10 e Figura 14 A e B), minimizando assim a probabilidade de se obter resultados falso-negativos. A sensibilidade de detecção equivalente também aumentou indiretamente para 0,04 pfu do PV. Em todos os ensaios, os resultados com incubações de menos de 60min foram negativos, o que sugere que os produtos amplificados foram provenientes de partículas virais infecciosas. Os resultados encontrados por REYNOLDS *et al.* (2001) mostraram que a sensibilidade de detecção do PV, em água do mar semeada, foi de 0,1 pfu após 25h de incubação e de 10 pfu quando o tempo de incubação foi menor que 10h. REYNOLDS *et al.* (2000) também analisaram águas marinhas e efluentes de esgotos para avaliar esta técnica e concluíram que houve diferenças significativas em relação àquelas encontradas pela análise direta das águas, mediante a reação de RT-PCR.

Cabe ressaltar que os trabalhos relatados referem-se à aplicação desta técnica para análise de águas, não tendo sido encontradas referências que apliquem esta técnica na análise de moluscos. Mesmo assim, o protocolo desenvolvido neste trabalho mostrou resultados comparáveis em relação aos relatados na literatura e apresentou algumas vantagens, como por exemplo o uso de placas de 12 cavidades que possibilitou a análise de até cinco amostras simultaneamente, já a maioria dos autores, utilizou garrafas de 25cm² para cultivo da suas amostras, diminuindo a capacidade da análise de amostras.

Os resultados obtidos demonstraram que os objetivos foram plenamente atingidos. Além da reação de RT-PCR ter sido padronizada para a detecção do poliovírus vacinal em ostras, foi possível introduzir e padronizar duas outras importantes metodologias no Laboratório de Virologia Aplicada, que foram a bioacumulação e a associação do RT-PCR com a cultura celular. Com relação aos poliovírus vacinais, estes ensaios poderão ser aplicados em análise de rotina no monitoramento da contaminação de amostras ambientais.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos mostraram que a técnica de adsorção-eluição-concentração, para a obtenção dos extratos tissulares de ostras da espécie *Crassostrea gigas*, permitiu a recuperação do poliovírus numa taxa de apenas 23.8%.
- A detecção e a quantificação do poliovírus, através do ensaio de formação de placas de lise, mostrou-se perfeitamente viável para a avaliação da recuperação viral nos extratos tissulares de ostras.
- O método de extração e purificação do RNA do poliovírus utilizado apresentou resultados satisfatórios na remoção dos inibidores da reação de RT-PCR.
- O protocolo de RT-PCR usado foi capaz de detectar o poliovírus em ostras inoculadas, tanto em forma direta como por bioacumulação.
- A metodologia que associa a reação de RT-PCR à cultura celular demonstrou, através da sensibilidade de detecção, que a mesma pode ser aplicada eficazmente para a detecção do poliovírus e de outros vírus entéricos em ostras contaminadas no ambiente. A vantagem desta associação é o incremento significativo da detecção do poliovírus que, no presente estudo, alcançou 100%.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho permitiu padronizar a metodologia de utilização de um marcador viral vacinal (no caso o poliovírus do tipo 2) para o monitoramento da sanidade dos ambientes aquáticos. Por ser adaptado ao cultivo *in vitro*, este modelo viral permitiu inclusive confirmar a viabilidade infectiva dos vírus recuperados dos extratos de ostras, além de não oferecer riscos ao manipulador. Existe um consenso mundial, liderado pela OMS, que recomenda que a vigilância epidemiológica de incidência de poliovírus no meio ambiente continue mesmo após a interrupção das campanhas de vacinação em massa, e a erradicação da doença prevista para o ano 2005 (OMS, 2002). Esta decisão baseia-se no fato de que as cepas de poliovírus vacinais permanecerão no meio ambiente por um longo período de tempo e, reversões para formas virulentas podem significar um grande prejuízo para a humanidade.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASZADEGAN, M.; HUBER, M.S.; GERBA, C.P. PEPPER, I.L. – Detection of enterovirus in groundwater with polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59(5)**: 1318-1324, 1993.
- ABBASZADEGAN, M.; STEWART, P.; LeCHEVALIER, M. – A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65(2)**: 444-449, 1999.
- AHMED, F.E. – Review: Assessing and managing risk due to consumption of seafood contaminated with microorganisms, parasites, and natural toxins in the US. **Int. J. Food Sci. 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.
- 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
- ARNAL, C.; FERRE-AUBINEAU, V.; MIGNOTE, B.; IMBERT-MARCILLE, B.M.; BILLAUDELL, S. – Quantification of hepatitis A virus in shellfish by competitive reverse transcription-PCR with coextraction of standard RNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65(1)**: 322-326, 1999.
- ATMAR, R.L.; METCALF, T.G.; NEILL, F.H.; ESTES, N.K. – Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59(2)**: 631-635, 1993.
- ATMAR, R.; NEILL, F.; ROMALDE, J. – 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 Microbiology** . **49**: 9-18, 1999.

- BLACKMER, F.; REYNOLDS, K.; GERBA, C.; PEPPER, I. – Use of integrated cell culture – PCR to evaluate the effectiveness of poliovirus inactivation by chlorine. **Appl. Environm. Microbiol.** **66(5)**: 2267-2268, 2000.
- BOHER, S. & SCHWARTZBROD, L. - Study of viral purification of oysters. **Wat. Sci. Tech.**, **27(-4)**: 55-60, 1993.
- BOLL, M.; ROCZANSKI, M.; SILVEIRA, F. – Aquicultura dos pequenos virou grande. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro,. 9(55), p. 16-22, 1999.
- BOSCH, A.; GAJARDO, R. DIEZ, J.M.; PINTO, R.M. – Non isotopic automatable molecular procedures for the detection of enteroviruses. **Mol. Cell. Probes**, **10**: 81-89, 1996.
- BOSCH, A.; PINTO, R.M.; ABAD, P.X. - Differential accumulation and depuration of human enteric viruses by mussels. **Wat. Sci. Tech.**, **31(5-6)**: 447-451, 1995.
- BOUCHRITI, N. & GOYAL, S.N. - Methods for the concentration and detection of human enteric viruses in shellfish: a review. **Microbiologica**, **15**: 105-114, 1993.
- BURKHARDT, W.; LEJA, L.; Mc GOVERN, R.E.; Le GUYADER, F.; METCALF, T.G.; ESTES, M.K. – Notes: collaborative evaluation of a method for the detection of norwalk virus in shellfish tissues by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62(1)**: 254-258, 1996.
- BURLENSON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. – Plaque assay. In — **Virology: a laboratory manual**. San Diego, Academic Press, 1992. p 74-84.
- CHEZZI, C. – Rapid diagnosis of poliovirus infection by PCR amplification. **J. Clin. Microbiol.**, **34(7)**: 1722-1725, 1996.
- CHRISTENSEN, B.F.; HENSHILWOOD, K.; 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(5)**: 1633-1635, 1998.
- COELHO, C. – **Padronização de métodos moleculares para a detecção do vírus da hepatite A em ostras *Crassostrea gigas* experimentalmente inoculadas**. Florianópolis, 2001. (Tese – mestrado – UFSC).
- CONAMA – Ministério do Desenvolvimento Urbano e do Meio Ambiente – Conselho Nacional do Meio Ambiente – Diário Oficial da União, 30 de julho de 1986. **Resolução/ CONAMA/ n^o 020/86**, 1986.

- COOK, D.W. & ELLENDER, R.D. - Relaying to decrease concentration of oyster-associated pathogens. **J. Food Protec.**, **9**: 196-202, 1986.
- CROCI, L.; DE MEDICI, D.; SCALFARO, C.; FIORE, ^a; DIVIZIA, M.; DONIA, D., COSENTINO, A. - Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophage and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. **J. Appl. Microbiol.** **88**(2): 293-298, 2000.
- CROMEANS, T.L.; NAINAN, O.V.; MARGOLIS, H.S. - Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**(6): 2460-2463, 1997.
- DAHLING, D.R.; WRIGHT, B.A. WILLIAMS, F.P. - Detection of viruses in environmental samples: suitability of commercial rotavirus and adenovirus test kits. **J. Virol. Methods**, **45**: 137-147, 1993.
- 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.; PALOMBI, L.; BUONOMO, E.; DONIA, D.; RUSCIO, V.; EQUESTR, M.; LENO, L.; PANA, A.; DEGENER, E.M. - Genomic characterization of human and environmental polioviruses isolated in Albania. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**(8): 3534-3539, 1999.
- DIX, A.; JAYKUS, L. Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams. **Journal of Food Protection**, **61**(4): 458-465, 1998.
- FRIEDRICH, F. - Neurologic complications associated with oral poliovirus vaccine and genomic variability of the vaccine strains after multiplication in humans. **Acta Virologica**, **42**: 187-195, 1998.
- FRIEDRICH, F. - Molecular evolution of oral poliovirus vaccine strains during multiplication in human and possible implications for global eradication of poliovirus. **Acta Virologica**, **44**: 109-117, 2000.

- GAJARDO, R.; BOURICHRITY, N.; PINTO, R.M.; BOSCH, A. – Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61 (9)**: 3460-3462, 1995.
- GANTZER, C.; SENOUCI, S.; MAUL, J.L.; SCHWARTZBROD, L. – Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. **J. Virol. Methods**, **65**: 265-271, 1997.
- GERBA, C.P. - Viral disease transmission by seafoods. **Food Technol.**, **42**: 99-103, 1988.
- GERBA, C.P.; GOYAL, S.M.; CECH, I.; BOGDAN, G. F. – Bacterial indicators and environmental factors as related to contamination of oysters by enteroviruses. **J. Food Protect.**, **43(2)** : 99-101, 1980.
- GILL, O.N.; CUBBIT, W.D.; MCSWAGGAN, N.A.; WATNEY, B.M.; BARTLETT, C.R.L. – Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. **Br. Med. J.**, **287**: 1532-1534, 1983.
- GOYAL, S.M. & GERBA, C.P. – Viral methods for detection of rotaviruses in surface waters. **J. Virol. Methods** **7 (5-6)**: 279-285, 1983.
- GRABOW, W.; BOTMA, K.; DE VILLIERS, J.; CLAY, C.; ERASMUS, B. – Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. **Bulletin of the World Health Organization**, **77(12)**: 973-980, 1999.
- 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. Research**. **33**: (5) 1195-1200, 1999.
- HENSHILWOOD, K.; GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W.G.; LEES, D.N. – The development of polimerase chain reaction assays for detection of small round structured and other human enteric viruses in molluscan shellfish. **J. shellfish Res.** **17(5)**: 1675-1678, 1998.
- HERRERO, L.; PALACIOS, A.; HUN, L.; VEGA, F. – Ausencia de detección de enterovirus en bivalvos *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) por contaminación química en el Pacífico de Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.**, **47(3)**: 419-427, 1999.

- HONG B.C.; SEUNG-HOON, L.; JANG-CHEON, C.; SANG-JONG, K. – Detection of adenovirus and enterovirus in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR. **Can. J. Microbiol.** **46**: 417-424, 2000.
- HU, J.M.; HSIUNG, g.d. – Evaluation of new antiviral agents: I. in vitro perspectives. **Antiviral Research**, **11**: 217-232, 1989.
- HURST, C.J.; KNUDSEN, G.R.; McINERNEY, M.J.; STETZENBACH, L.D.; WALTER, M. V. – Detection of viruses in environmental waters, sewage, and sewage sludges. - Detection of the presence of bacteria and viruses in shellfish. In: **Manual de Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology. Washington, DC, ASM Press 1997. p. 168-175, 203-212.
- 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 & Hall, p.92-153, 1994
- JAYKUS, L.A.; DE LEON, R.; SOBSEY, M.D. – Application of RT-PCR for the detection of enteric viruses in oysters. **Wat, Sci. Tech.** **27(3-4)**: 9-59, 1993.
- JAYKUS, L.A.; DE LEON, R.; SOBSEY, M.D. – A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oyster by PCR and oligoprobe hibridization. **Appl. Environ. Microbiol.** **62(6)**: 2074-2080, 1996.
- JAYKUS, L.A.; HEMARD, M. T.; SOBSEY, M.D. – Human enteric pathogenic viruses. In: HACKNEY, C.R. & PIERSON, M.D. - **Environmental indicators of shellfish safety**. New York, Chapman & Hall, 1994. p. 92-153.
- JOSÉ, VIVIAN FERES. **Bivalves e a segurança do consumidor**, 1996 (Dissertação de mestrado, Pós-graduação em Ciências Ambientais – USP, São Paulo).
- KANAMOTO, H.; HASEGAWA, S.; SAWATARI, S.; MIWA, C.; MORITA, O; HOSOKAWA, T.; TANAKA, H. – Small round-structure (SRSV_s) associated with acute gastroenteritis outbreaks in Gifu Japan. **Microbiol. Immunol.**, **37(12)**: 991-997, 1993.
- KIMMAN, T.; KOOPMANS M.; VAN DER AVORT, H. - Ending polio imunization: when and how are we sure that the needle is out of haystack?. **Vaccine** **17**:624-627. 1999.

- KINCHINGTON, D.; KANGRO, H.; JEFFRIES, D.J. – Design and testing of antiviral compounds. In: DESSELBERGER, U. - **Medical Virology: a practical approach**. New York, OIRL Press, 1995. p. 153-154.
- KOEPCKA, H.; DUBROU, S.; PREVOL, J.; MARECHAL, J.; LÓPEZ-PILA, J.M. – Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription polymerase chain reaction and hibridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59(4)**: 1213-1219, 1993.
- KRIKELIS, V.; SPYROU, N.; MARKOULATUS, P.; SERIE, C. – Seasonal distribution of enteroviruses and adenoviruses in domestic sewage. **Can. J. Microbiol.**, **31(1)**: 24-25, 1985.
- LANDRY, E.F.; VAUGHN, J.N.; VICALE, T.J. - Modified procedure for extration of poliovirus from naturally infected oysters using cat-floc and beef extract. **J. Food Protec.**, **43**: 91-94, 1980.
- 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.
- LEGGIT, P. & JAYKUS, L.A. – Detection methods for human enteric viruses in representative foods. **J. food Protect.** , **63(12)**: 1738-1744, 2000.
- LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, L.; DUBOIS,E.; POMMEPUY, M.- Three-Year study to assess human enteric viruses in shellfish – **Applied and Env. Microb.** , **66 (8)**: 3241-3248, 2000.
- 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. Tocol.**, **31**: 68-76, 1996
- LEES, D. – Viruses and bivalve shellfish **Intern. J. of Food Microb.** **59**: 81-116, 2000.
- LEES, D.N.; HENSHILWOOD, K.; DORÉ, W. – Development of a method for detection enterovirus in shellfish by PCR with poliovirus as a model. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60(8)**: 2999-3005, 1994.
- LEVINTON, J.S.; WARD, E.J.; THOMPSON, R.J. - Biodynamics of particle processing in bivalve mollusc: models, data, and future directions. **Invertebrate Biology**, **115(3)**: 232-242, 1996

- LEWIS, G.D. & METCALF, T.G. – Poliethylene glicol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water and sediment samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **54(8)**: 1983-1988, 1988.
- MA, J.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. – Increased sensitivity of poliovirus detection in tap water concentrates by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, **55**: 292-302, 1995.
- 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).
- MEGLITSCH, P.A. & SCHRAM, F.R. – Mollusca. In: _____ **Invertebrate Zoology**. 3. ed. New York. Oxford University Press, 1991, p. 212-213.
- MELNICK, J.L. – My role in the discovery and classification of the enteroviruses. **Ann. Rev. Microbiol.**, **50**: 1-24, 1996b.
- MELNICK, J.L. – Enteroviruses: poliviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: FIELDS, B.N. – **Virology**. 3.ed. Philadelphia, Lippincot-Raven , 1996a. p. 655-712.
- 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.
- METCALF, T.G.; MOULTON, E.; ECKERSON, D. - Improved method and testing strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, **39(1)**: 141-152, 1980.
- MINOR, D.P. – Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. **Expert Review in Molecular Medicine**. Set. 1999.URL: www.freemedicaljournals.com
- MOORE, J.N. & MARGOLIN, B.A. - Evaluation of radioactive and non radioactive gene probes and cell culture for detection of Poliovirus in water samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **5(9)**: 3145-3146, 1993.
- MUIR, P.; KAMMERER, U.; KORN, K.; MULDER, M.N.; POYRY, T.; WEISSBRICH, B.; KANDOLF, R.; CLEATOR, G.M.; VAN LOON, A.N. – Molecular typing of

- enteroviruses: current status and future requirements. **Clin. Microbiol. Rev.** **11(1)**: 202-227, 1998.
- MUSCILLO, M.; LA ROSA, G.; CARDUCCI, A.; CANTIANI, L.; MARIANELLI, C.
Molecular analysis of poliovirus 3 isolated from aerosol generated by a waster water treatment plant. **Wat. Res.**, 31: 3125-3131, 1997.
- NASCIMENTO, I. A. - Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, **7 (35)**: 871-876, 1983.
- NATIONAL ADVISORY COMMITTEE – Microbiological criteria for raw molluscan shellfish. **J. Food Protect.** **55(6)**: 463-480, 1992.
- NICAND, E.; TEYSSOU, R.; BUISSON, Y. – Le risque fécal virale. **Virology**, **2**: 103-116, 1998.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – URL www.oms.org, obtido em Março 2002.
- PANORAMA DA AQUICULTURA – Santa Catarina , a padroeira das ostras e mexilhões.
Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro, v7, n. 40, p. 10-11. 1995.
- PINA, S.; PUIG, N.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R. – Viral pollution in the environmental and shellfish: human adenovirus detection by PCR as a index of human viruses. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64(9)**: 3376-3382, 1998.
- 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.A.; GERBA, C.P.; PEPPER, J.L. – Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture – PCR procedures. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62(4)** : 1424-1427, 1996.
- REYNOLDS, K.A.; GERBA, C.P.; PEPPER, J.L. – Rapid PCR-based monitoring of infectious enteroviruses in drinking water. **Wat. Sci. Tech.**, **35(11-12)**: 423-427, 1997.
- REYNOLDS, K.; GERBA, P.; ABBASZADEGAN, M.; PEPPER, L. – ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. **Can. J. Microbiol.**, **47**: 153-157, 2001.
- RIPPEY, S.R. – Infectious deseases associated with molluscans shellfih consumption. **Clin. Microbiol. Rev.**, **7(4)**: 419-425, 1994.

- ROCZNSKI, M.; COSTA, S. W.; BOLL, MG.; OLIVEIRA NETO, F. M. – Evolution of Aquaculture production in Santa Catarina State – Brazil, **Simpósio de Aqüicultura Aqua 2000**. CD room.
- ROMALDE, J. L., ESTES, M. K., SZUCS, G., ATMAR, R. L., WOODLEY, C. M, AND METCALF, T. G. - *In situ* detection of HAV in cell cultures and shellfish tissues. **Appl. Environm. Microbiol**, 60(6): 1921-1926, 1994.
- ROMERO, R.J & ROTBART, A.H. – Detection of the human enteroviruses. In: PERSHING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.C. - **Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications**. Washington DC, American Society for Microbiology , 1993. p. 401-406.
- ROSE, J.B. & SOBSEY, M.D. – Quantitative risk assesment for viral contamination of shellfish and coastal waters. **J. Food Protect.**, 56(12): 1043-1050, 1993.
- ROTBART, H. A. -Nucleic acid detection system for enteroviruses. **Clin. Microbiol. Rev.** 4(2): 156-158, 1991.
- RUPPERT, E. & BARNES, R. Moluscos. In: _____ - **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo, Roca, 1996. p. 353-484.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. - Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition- **Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1, 2,3**, 2001. 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).
- SANTOS, C.; RIGOTTO, C.; SIMÕES, C.; BARARDI, C. – Improved method for rotavírus detection in oysters using RT-PCR: suitability of a commercial PCR kit. **J. Shellfish Res.**, 20(3): 997-1001, 2001.
- SCHOETTLIN, W.; NIELSON, K.; MATHUR, E. – Optimization of PCR using the Opti-Prime™ kit. Strategies in **Molecular Biology**, 6:43-44, 1993.
- SCHWAB, K.J.; LEON, R. SOBSEY, M.D. – Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62(6): 2086-2094, 1996.

- SCHWAB, K.; NEILL, F.; ESTES, M.; METCALF, T.; ATMAR, R. – Distribution of norwalkvirus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. **Journal of Food Protection**, **61(12)**: 1674-1680, 1998.
- 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.
- SEUNH-HOON, L. & SANG-JONG, K. – Detection of infectious enterovirus and adenovirus in tap water in urban areas in Korea. **Water Res.** **36**: 248-256, 2002.
- 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.
- SHIEH, Y.S.C.; BARIC, R.S.; SOBSEY, M.D. – Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63(11)**: 4401-4407, 1997.
- SHIEH, Y.S.C.; KEVIN, R.C.; BARIC, R.S. – A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65(11)**: 4709-4714, 1999.
- SIMMONDS, P. – Polymerase chain reaction. In: **Medical virology: a practical approach**. New York, IRL Press, 1995.
- SMAAL A.; WIDDOWS, J. – The scope for growth of bivalves as an integrated response parameter in biological monitoring. In: KRAMER, K.J.M. – **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.; WALLIS, C; MELNICK, J.L. - Development of a simple method for concentrating enteroviruses from oysters . **Appl. Environ. Microbiol.**, **29(1)**: 21-26, 1975.
- SOBSEY, M.D.; DAVIS, A.L.; RULLMAN, V.A. – Persistence of Hepatite A virus and other viruses in depurated eastern oysters. **Proceed. Oceans'87 Coastal and Estuarine Pollution.**, **5**: 1740-1745, 1987.
- SOBSEY, M.; CARRICK, R.; JENSEN, H. – Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **36**: 121-130, 1978.

- SOULE, H.; GENOULAS, O.; GRATACAP-CAVILLIER, B.; CHEVALLIER, P.; JING-XING, L.; SEIGNEURING, J.M. – Ultrafiltration and reverse transcription – polymerases chain reaction: an efficient process for poliovirus, rotavirus and hepatitis A virus detection in water. **Wat. Res.** **34(3)**: 1063-1067, 2000.
- ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S.C.; PELLETIER, E.; 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.
- 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.
- SUPLICY, F. – **Ensaio sobre depuração do mexilhão *Perna perna***. Florianópolis, 1998. (Tese de Mestrado – Universidade de Santa Catarina)
- TANI, N.; DOHI, Y.; KURUMATANI, N.; YONEMASU, K. – Seasonal distribution of adenoviruses, enteroviruses, reoviruses in urban river water. **Microbiol. Immunol.**, **39(8)**: 577-580, 1995.
- TRABELSI, A.; GRATTARD, F.; NEJMEDDINE, M.; BOURLET, T.; POZZETO, B. – Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. **J. Clin. Microbiol.**, **33(9)**: 2454-2457, 1995.
- 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. Environ. 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. & PARKER, E. – Quantification of poliovirus in sea water and sewage by competitive reverse transcriptase – polymerase chain reaction. **Can. J. Microbiol.** **44**: 35-41, 1998.

- VAUGHN, J. M.; LANDRY, E.F.; VICALÉ, T.J.; DAHL, M.C. - Modified procedure for the recovery of naturally accumulated poliovirus from oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **38(4)** : 594-598, 1979.
- VINATEA, L.A. – **Modos de apropriação e gestão patrimonial de recursos costeiros: estudo de caso sobre o potencial e os riscos do cultivo de moluscos marinhos na Baía de Florianópolis, Santa Catarina.** Florianópolis, 2000. (tese – doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina).
- WHITE, D. & FENNER, F.J. – **Medical Virology.** 4. ed. San Diego, Academic, 1994. 603p.
- WIDDOWS, J. & DONKIN, P. – Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: GOSLING, E., ed. - **The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture.** Amsterdam, Elsevier, 1992. p.383-424.
- WILLIAMS, F.P. & SHAY FOUT, G. – Contamination of shellfish by stool sheed viruses: methods for 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, 1997.
- WINCKLER, S.; GRUMANN, A.; NETO, F.; ROCKZANSKI, M. – Cadeias produtivas do estado de Santa Catarina: aquicultura e pesca. Florianópolis, EPAGRI, 1998.
- WITHMAN, 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.
- YU-LI, T.; TRAN, B.; SANGERMANO, L.; PALMER, C. – Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triples reverse transcriptase PCR. **Appl. Environm. Microbiol.** **60(7)**: 2400-2407, 1994.
- ZHOU, Y.J.; ESTES, M.K.; JIANG, X.; METCALF, T.G. – Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus in shellfish by hibridization tests. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57(10)**: 2963-2968, 1991.