

Lucas Ariel Totaro Garcia

Viabilidade de adenovírus humano recombinante e norovírus murino em
água do mar em tanques de depuração de ostras

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Biotecnologia e
Biociências.

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

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Garcia, Lucas Ariel Totaro

Viabilidade de adenovírus humano recombinante e norovírus murino em água do mar em tanques de depuração de ostras / Lucas Ariel Totaro Garcia ; orientadora, Célia Regina Monte Barardi - Florianópolis, SC, 2014.
92 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. adenovirus recombinante. 3. depuração. 4. água do mar. 5. norovirus. I. Barardi, Célia Regina Monte. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

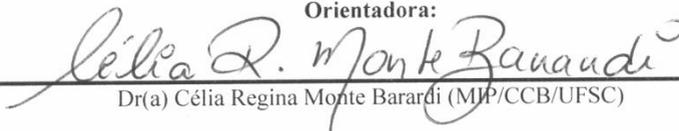
**“Viabilidade de adenovírus humano recombinante e norovírus murino em
água do mar em tanques de depuração de ostras”**

por

Lucas Ariel Totaro Garcia

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 04/PPGBTC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências- UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientadora:

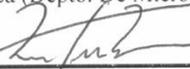


Dr(a) Célia Regina Monte Barardi (MIP/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



Dr(a) Adriana de Abreu Corrêa (Depto. De Microbiologia e Parasitologia/UFF)

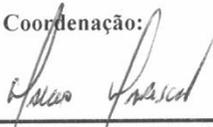


Dr(a) Rafael Diego da Rosa (BEG/CCB/UFSC)



Dr(a) Aguinaldo Roberto Pinto (MIP/CCB/UFSC)

Coordenação:



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2014.

“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.

Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos as pessoas que colaboram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Primeiramente aos meus pais, Carlos e Mônica. Nada disso seria possível sem o amor, a confiança, o apoio e a ajuda deles. Ao meu irmão, Leandro, pelas análises estatísticas, mas também pelas conversas e conselhos, e principalmente por servir de inspiração ao meu trabalho.

Agradeço carinhosamente a Prof^ª. Dr^ª. Célia Regina Monte Barardi, pela orientação, contribuições e ensinamentos. Mais do que isso, obrigado pela confiança e paciência por me aceitar por mais 4 anos.

À Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Maria Oliveira Simões pelas valiosas sugestões durante o meu mestrado e pelas contribuições como membro suplente da minha banca.

Aos demais membros da banca examinadora: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa, Prof^ª. Dr^ª. Adriana de Abreu Corrêa e Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto, pela disponibilidade e sugestões. Ao Aguinaldo, ainda, por me orientar durante o estágio de docência, professor pelo qual tenho apreço e admiração.

Aos técnicos Luciano e Felipe pela a instalação das depuradoras e devidos reparos. À Mariana Rangel, pela ajuda em fazer com que essa instalação pudesse acontecer.

Agradeço aos colegas e professores do MIP pelo apoio e ajuda quando necessário.

Aos servidores do LAMEB, Bibiana, Vanessa e Denis, por contribuírem com minha pesquisa, inclusive finais de semana e feriado.

A todos os colegas do LVA, os que já passaram e os que ainda estão. Não cito cada um, pois provavelmente esqueceria alguém. Mas, sou grato pelo ambiente de trabalho sadio e divertido no qual tenho prazer de fazer parte. Agradeço também as colaborações, conversas e trocas de ideias.

Em especial, agradeço à amiga Mariana Nascimento, a qual tive o prazer de trabalhar mais de um ano junto. Entre conversas, aflições e inúmeras discussões de resultados foi uma ótima parceria e que tornou o nosso trabalho sempre agradável.

À Rafaela, pela compreensão, apoio e parceria em todos os momentos.

A todos os meus amigos André, Carol, Bob, Mary, Barr, PV, Mick, pela companhia, apoio e churrascos. Aos companheiros de

apartamento: Renan, Vivi e Rafa. Aos meus amigos de futebol e ao time da LDU.

Aos meus professores amigos Paulo Hofmann e Jorge Nogared como modelos de paixão à profissão.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

Por fim, agradeço a oportunidade de realizar esse mestrado. Mais do que conhecimento, aprendi muito profissionalmente e convivi com pessoas incríveis. Obrigado a todos.

RESUMO

A depuração de moluscos bivalves é um processo utilizado que resulta na expulsão de patógenos humanos presentes em seus tecidos. Durante a depuração, a etapa de desinfecção da água do mar é de extrema importância, sendo a luz ultravioleta (UV) o principal desinfetante utilizado. Modelos virais são geralmente empregados para substituir vírus fastidiosos em estudos de viabilidade. O adenovírus recombinante que expressa a proteína verde fluorescente (rAdV-GFP) oferece uma potencial aplicação no campo da virologia ambiental. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência na desinfecção viral de um tanque de depuração de moluscos com sistema fechado acoplado a um tratamento de luz UV utilizando os modelos rAdV-GFP e norovírus murino (MNV-1). Primeiramente, foi estabelecido o tempo de pós-infecção em que era possível detectar a fluorescência em células infectadas com o adenovírus recombinante. Em seguida, foi avaliado o limite de detecção das técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência e comparados com o ensaio de placa de lise. Para avaliar a eficiência da depuração na água do mar foram utilizados dois tanques, sendo um com tratamento com luz UV (36W) e outro sem tratamento. Para aferir a influência da água do mar na estabilidade viral, a água foi inoculada com rAdV-GFP e MNV-1 e foram feitas amostragens de um litro no tempo inicial (0h) e após 24h e análise por microscopia de fluorescência. Como resultados, o tempo de pós-infecção estabelecido para detecção de células fluorescentes infectadas por rAdV-GFP foi de 24h. A citometria de fluxo mostrou baixa sensibilidade, ao contrário da microscopia de fluorescência, que foi semelhante ao ensaio de placa de lise. Em ambas as técnicas a água do mar não influenciou na detecção da fluorescência de células infectadas por rAdV-GFP. No ensaio de desinfecção da água do mar nos tanques de depuração, o MNV-1 foi completamente inativado após 24h em ambos os tanques. A viabilidade do rAdV-GFP decaiu 99,99% após 24h de depuração com UV e 48h no tanque sem tratamento. Neste trabalho, concluiu-se que o rAdV-GFP se mostrou um eficaz modelo viral para estudos de estabilidade e desinfecção de adenovírus humanos, sendo de fácil cultivo e replicação, de baixo custo, fornecendo resultado rápidos e com alta sensibilidade, principalmente pela técnica de microscopia de fluorescência. Além disso, o processo de depuração foi eficiente para inativação dos vírus estudados na água do mar, com maior eficiência quando aplicado o tratamento com luz UV.

Palavras-chave: adenovírus recombinante, GFP, norovírus, depuração, água do mar, luz UV

ABSTRACT

Shellfish depuration is a process that results in the elimination of pathogens from their tissues. During purification, the disinfection of the seawater is of utmost importance for the inactivation of human pathogens and ultraviolet (UV) light is the main disinfectant used. Viral models are usually employed as surrogate of fastidious viruses in viability studies. The recombinant adenovirus expressing green fluorescent protein (GFP- rAdV) offers a potential application in environmental virology. This study aimed to evaluate the efficiency of viral disinfection on depuration that used closed system coupled with UV light treatment using rAdV-GFP and murine norovirus (MNV-1) as models. First, the time post infection at which it was possible to detect fluorescence in cells infected with the recombinant adenovirus cells was established. Next, we evaluated the detection limit of flow cytometry and fluorescence microscopy techniques compared with the plaque assay (PFU). To evaluate the efficiency of the seawater purification, two tanks were used, one coupled with UV light (36W) and one without UV light treatment. To assess the influence of seawater in the viral stability, water was inoculated with rAdV-GFP and MNV-1 and one liter sample was analyzed by fluorescence microscopy at the initial time (0h) and after 24h post seeding. The time post-infection established for the detection of infected GFP- fluorescent cells rAdV was 24h. Flow cytometry showed low sensitivity, when compared with fluorescence microscopy, which was similar to plaque assay. In both techniques the sea water matrix did not shown influence on the detection of fluorescence of GFP-rAdV infected cells. In the disinfection tests of sea water in the purification tanks, the MNV-1 was completely inactivated after 24 h in both tanks. rAdV-GFP declined 99.99% after 24 h in the tank coupled with UV and 48h in the tank without UV treatment. We concluded that the rAdV-GFP showed to be a effective viral model for stability studies and disinfection as surrogate for human adenoviruses, being easy to replicate *in vitro*, at low cost, giving quick results with high sensitivity, especially fluorescence microscopy method. Moreover, depuration process was effective to inactivate viruses in seawater with its efficiency improved when applying UV light for the water treatment.

Keywords: recombinant adenovirus, GFP, norovirus, depuration, seawater, UV light

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Produção de ostras (em toneladas) produzidas em Santa Catarina entre 1991 e 2011..... | 21 |
| Figura 2. Esquema dos sistemas de depuração de moluscos..... | 24 |
| Figura 3. Desenho esquemático de um tanque de depuração compacto, desenhado pela empresa Blue Water Aquaculture..... | 26 |
| Figura 4. Estrutura do adenovírus humano..... | 29 |
| Figura 5. Estrutura do norovírus humano..... | 31 |
| Figura 6. Células HEK293A observadas em microscópio óptico invertido..... | 39 |
| Figura 7. Células RAW264.7 observadas em microscópio óptico invertido..... | 40 |
| Figura 8. Formação de placas de lise após a infecção de células (A) HEK293A por rAdV-GFP e (B) RAW 264.7 por MNV-1..... | 52 |
| Figura 9. Detecção da fluorescência da GFP em células infectadas por adenovírus recombinantes nos MOIs de 10, 1, 0,5, 0,1 e 0,01, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro de UV a cada 2h..... | 53 |
| Figura 10. Título viral do rAdV-GFP em diferentes diluições virais, obtido pelas técnicas de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e placa de lise..... | 54 |
| Figura 11. Valores normalizados em log ₁₀ de rAdV inoculado no ensaio de placas (UFP/mL) versus o título viral obtido por citometria de fluxo (UVF/mL)..... | 55 |
| Figura 12. Dotplots e porcentagem de células infectadas por rAdV-GFP em duas diluições do estoque viral, da água do mar inoculada após a concentração e da água do mar inoculada antes da concentração e os respectivos títulos virais obtidos..... | 57 |
| Figura 13. Imagens de microscopia de fluorescência de células infectadas por rAdV-GFP na diluição 10 ⁻⁴ do estoque viral, da água do mar inoculada após a concentração e da água do mar inoculada antes da concentração, e os respectivos títulos virais obtidos..... | 58 |
| Figura 14. Concentração de rAdV-GFP (em log/L) na água do mar nos tanques de depuração com e sem UV no tempo inicial (0 h) e após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento..... | 60 |
| Figura 15. Imagens de microscopia de fluorescência de células infectadas por rAdV-GFP no tempo inicial (0 h) e após 24 h, 48 h e 72 h de depuração em tanques com e sem tratamento com luz UV. Os números (10 ⁻¹ e 1:4) representam as diluições utilizadas..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Comparação da eficiência da luz ultravioleta, cloro e ozônio como agentes desinfetantes nos processos de depuração de moluscos..... | 27 |
| Tabela 2. Dosagem de luz UV necessária para inativação de 1 a 4 logs para vírus e bactérias..... | 28 |
| Tabela 3. Média e desvio padrão do decaimento em logs de rAdV-GFP e MNV-1 após 24 h, 48 h e 72 h, em tanques de depuração com e sem tratamento de luz UV..... | 60 |
| Tabela 4. Média e desvio padrão do decaimento em logs de rAdV-GFP e MNV-1 após 24 h sob agitação em balde com água do mar..... | 63 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549 – Linhagem celular epitelial de carcinoma pulmonar humano
AdV – Adenovírus
DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium
E1 – gene do adenovírus humano
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
GFP – Green Fluorescent Protein (Proteína Verde Fluorescente)
HAV – Vírus da Hepatite A
HEK293 – Linhagem celular de rim embrionário humano
MEM – Modified Eagle Medium
mJ – milijoule (s)
MNV-1 – Norovírus murino
MOI – Multiplicidade de infecção
NMP – Número Mais Provável
NoV – Norovírus humano
p.i. – pós-infecção
PBS – Phosphate Buffer Solution (Solução Tampão de Fosfato)
PCR – Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
rAdV-GFP – Adenovírus humano recombinante que expressa a proteína GFP
RAW 264.7 – Linhagem celular de macrófagos murinos
SFB – Soro Fetal Bovino
UFF – Unidades Formadoras de Foco
UFP – Unidades Formadoras de Placas
UV – Ultravioleta
UVF – Unidades Verde Fluorescentes
VP – Viral Protein

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.CONTEXTUALIZAÇÃO..... | 25 |
| 1.1. CONTAMINAÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES..... | 25 |
| 1.2. PROCESSO DE DEPURAÇÃO..... | 28 |
| 1.3. VÍRUS ENTÉRICOS..... | 32 |
| 1.4. ESTUDOS DE VIABILIDADE VIRAL EM AMOSTRAS AMBIENTAIS..... | 35 |
| 2.JUSTIFICATIVA..... | 37 |
| 3.HIPÓTESE..... | 39 |
| 4.OBJETIVOS..... | 39 |
| 4.1. OBJETIVO GERAL..... | 39 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 39 |
| 5.MATERIAL E MÉTODOS..... | 40 |
| 5.1. CULTIVO DE CÉLULAS..... | 40 |
| 5.2. PRODUÇÃO DE ESTOQUES VIRAIS..... | 41 |
| 5.3. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO DOS ESTOQUES VIRAIS POR PLACA DE LISE..... | 41 |
| 5.4. CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE GFP EM CÉLULAS INFECTADAS POR rADV-GFP..... | 43 |
| 5.5. AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE rADV-GFP POR CITOMETRIA DE FLUXO E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO DESTAS..... | 43 |
| 5.6. OBTENÇÃO DA ÁGUA DO MAR E MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO VIRAL..... | 45 |
| 5.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DA ÁGUA DO MAR CONCENTRADA..... | 45 |
| 5.8. INFLUÊNCIA DA ÁGUA DO MAR CONCENTRADA NA DETECÇÃO DE rADV-GFP E AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO VIRAL DO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 5.9. AVALIAÇÃO DA DESINFECÇÃO VIRAL POR LUZ UV EM ÁGUA DO MAR EM TANQUES DE DEPURAÇÃO..... | 47 |
| 5.10. AVALIAÇÃO DO DECAIMENTO VIRAL NA ÁGUA DO MAR..... | 47 |
| 5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 48 |
| 6.RESULTADOS..... | 49 |
| 6.1. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO DOS ESTOQUES VIRAIS POR PLACA DE LISE..... | 49 |
| 6.2. CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE GFP EM CÉLULAS INFECTADAS POR rADV-GFP..... | 49 |
| 6.3. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO DE rADV POR CITOMETRIA DE FLUXO E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.... | 50 |
| 6.4. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DA ÁGUA DO MAR CONCENTRADA..... | 52 |
| 6.5. INFLUÊNCIA DA ÁGUA DO MAR CONCENTRADA NA DETECÇÃO DE GFP E AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO VIRAL DO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO..... | 52 |
| 6.6. AVALIAÇÃO DA DESINFECÇÃO VIRAL POR LUZ UV EM ÁGUA DO MAR EM TANQUES DE DEPURAÇÃO..... | 55 |
| 6.7. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE VIRAL NA ÁGUA DO MAR...58 | |
| 7.DISSCUSSÃO..... | 60 |
| 8.SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS..... | 68 |
| 9.CONCLUSÕES..... | 69 |
| 10.CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... | 70 |
| 11.REFERÊNCIAS..... | 71 |
| APÊNDICE A – Artigo referente a padronização do uso de rAdV-GFP, submetido ao Virology Journal..... | 83 |
| APÊNDICE B – Trabalhos científicos publicados durante a realização do mestrado..... | 91 |

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. CONTAMINAÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES

Microorganismos de transmissão fecal-oral, principalmente vírus entéricos, chegam ao ambiente marinho através de diversas rotas que incluem descarga direta de efluentes de esgotos tratados ou não tratados, rios contaminados pelo deságue direto de esgoto e água de lastro de navios (BOSCH, LE GUYADER, 2010). Em escala global, cerca de 90 % dos esgotos são despejados sem tratamento adequado nas águas costeiras. Além disso, as descargas de esgoto tratado carecem de uma regulamentação referente aos patógenos virais, sendo o monitoramento baseado na detecção de indicadores bacterianos (GRIFFIN et al., 2003). Mundialmente, diversos estudos mostram que os vírus são frequentemente detectados em esgotos, rios e águas costeiras (BOFFILMAS et al., 2013). Trabalhos realizados em Florianópolis, SC, detectaram a presença de adenovírus, norovírus, rotavírus e vírus da hepatite A em amostras de esgoto e água do mar (MORESCO et al., 2012; RIGOTTO et al., 2010). Assim, a manutenção e avaliação da qualidade virológica dos ambientes marinhos utilizados para a recreação e cultivo de moluscos é de extrema importância na prevenção de doenças transmitidas pela via fecal-oral (BOSCH, ABAD, PINTÓ, 2005).

Entre os fatores que afetam a sobrevivência dos vírus no ambiente marinho estão a temperatura, a associação dos vírus a partículas e a composição microbiológica da água. Fatores ambientais e a composição orgânica e inorgânica da água do mar podem ser substancialmente diferentes de uma região geográfica para outra, implicando na geração de diferentes dados de persistência viral (BOSCH, ABAD, PINTÓ, 2005). Muitos vírus entéricos são resistentes às condições do ambiente marinho, podendo contaminar os seres humanos diretamente pela atividade recreacional, mas também pelo consumo de alimentos cultivados nessa água.

Os moluscos bivalves, como ostras, mexilhões e vieiras, vivem em áreas estuarinas e se alimentam por meio da filtração da água do mar. Uma ampla variedade de microrganismos patogênicos para os seres humanos podem se acumular no trato digestivo desses animais. Moluscos cultivados em áreas contaminadas se tornam reservatórios de microrganismos, entre eles os vírus entéricos. Sendo assim, esses animais podem atuar como vetores de transmissão de doenças, uma vez que durante o processo de filtração são capazes de concentrar patógenos humanos (FLEMING et al., 2006). A bioacumulação de vírus no trato

digestivo dos bivalves é um fenômeno que ocorre rapidamente, sendo que a adsorção nos tecidos dos moluscos pode ocorrer a partir de 1 h de contato com a água contaminada (BOSCH, ABAD, PINTÓ, 2005). Tradicionalmente, os bivalves são consumidos crus ou ligeiramente cozidos. Esse hábito comum, juntamente com o fato de que todo o organismo é ingerido, representa um importante problema para a saúde humana, uma vez que os moluscos agem como portadores passivos de microrganismos patogênicos (WANG, DENG, 2012).

Evidências epidemiológicas dos últimos anos sugerem que os vírus entéricos humanos são os patógenos mais comuns transmitidos por moluscos bivalves (POTASMAN, PAZ, ODEH, 2002). Os vírus entéricos causam uma grande variedade de doenças e sintomas, sendo gastroenterites, otites e doenças do trato respiratório as mais frequentemente relatadas (GRIFFIN et al., 2003). Surto de doenças relacionados ao consumo de bivalves contaminados com vírus foram identificados em diversos países nos últimos anos, sendo detectados múltiplos vírus entéricos em moluscos e fezes humanas, como aichi vírus, norovírus, astrovírus, enterovírus e rotavírus (WESTRELL et al., 2010; LE GUYADER et al., 2008). Surto de grandes proporções, envolvendo mais de 800 pacientes foram relatados na Austrália, nos Estados Unidos, no Japão e na China, sendo o maior ocorrido em 1988 na cidade de Shanghai, afetando 290 mil pessoas que foram infectadas com o vírus hepatite A e causando 47 óbitos (POTASMAN, PAZ, ODEH, 2002).

Cerca de 80% dos surtos virais relacionados ao consumo de bivalves são ocasionados por norovírus humanos, causando gastroenterites agudas e diarreias. O vírus da hepatite A é o segundo mais frequentemente relacionado, representando 12 % dos surtos relacionados a vírus, causando doenças mais severas (BELLOU, KOKKINOS, VANTARAKIS, 2013; LEES, YOUNGER, DORÉ 2010). A causa mais comum dos surtos é o consumo dos bivalves cultivados em águas contaminadas que são ingeridos crus ou inadequadamente preparados (FLEMING et al., 2006). Além disso, as ostras são os principais moluscos que veiculam patógenos humanos (BELLOU, KOKKINOS, VANTARAKIS, 2013; BOSCH, LE GUYADER, 2010; POTASMAN, PAZ, ODEH, 2002). Devido à subnotificação generalizada de casos, é provável que os surtos reportados representem apenas uma pequena parte do total de casos (FLEMING et al., 2006).

O cultivo de ostras tem crescido mundialmente, sendo que a produção anual nos últimos 20 anos aumentou aproximadamente três vezes. Em 2011, 4,5 milhões de toneladas de ostras foram cultivadas,

movimentando cerca de 3 bilhões de dólares, sendo o continente asiático responsável por mais de 90 % da produção (FAO, 2011). O cultivo de ostras no Brasil iniciou na década de 90, com menos de 100 toneladas anuais. Em pouco mais de 15 anos, a produção brasileira aumentou aproximadamente 40 vezes, atingindo um cultivo anual superior a 2,3 mil toneladas. Esse aumento da produção é de grande importância econômica para o país, pois pode movimentar mais de 6 milhões de dólares por ano (FAO, 2011). O Estado de Santa Catarina foi o principal responsável pela crescente produção de ostras no Brasil, principalmente a partir de 2001 (Figura 1). Em 2011, o cultivo de ostras no Estado superou 2,2 mil toneladas, sendo a cidade de Florianópolis responsável por 75 % da produção (EPAGRI, 2012).

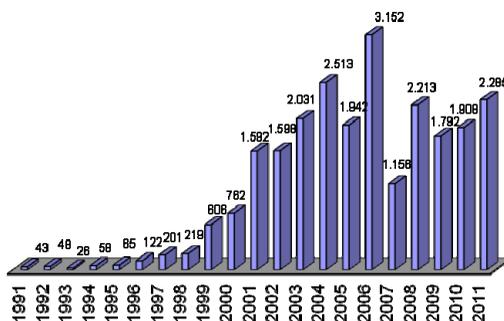


Figura 1. Produção de ostras (em toneladas) cultivadas em Santa Catarina entre 1991 e 2011 (EPAGRI, 2012).

Devido à crescente produção de moluscos, padrões sanitários para o cultivo e consumo foram estabelecidos por órgãos internacionais e nacionais. O *Codex Alimentarius* é um fórum internacional criado para a normatização do comércio de alimentos estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU). De acordo com este órgão, a comercialização dos bivalves é autorizada quando um molusco a cada cinco analisados apresenta número mais provável (NMP) de *Escherichia coli* entre 230 e 700 e se em nenhum dos cinco estiver acima de 700. Além disso, nos moluscos não pode ser detectado *Salmonella* sp. (ONU, 2008). No Brasil, a Instrução Normativa Interministerial N°7, de 8 de maio de 2012, libera o consumo de bivalves quando a cada 100 g de parte comestível contenha o NMP de *E. coli* inferior a 230. Quando o NMP estiver entre 230 e 46.000, os moluscos estão liberados sob a condição de serem depurados. Se estiver acima de 46.000 a

comercialização é proibida (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2012). No entanto, os padrões microbiológicos são baseados apenas em bactérias fecais, não havendo nenhuma recomendação para a pesquisa de vírus entéricos, sendo estes os principais responsáveis por surtos pela ingestão de moluscos bivalves contaminados (POTASMAN, PAZ, ODEH, 2002).

1.2. PROCESSO DE DEPURAÇÃO

Moluscos cultivados em áreas contaminadas necessitam de uma etapa de purificação prévia ao consumo. Um dos métodos utilizados é a alocação desses bivalves em águas não contaminadas, permitindo a liberação natural dos microrganismos pelo processo de filtração. Esse método também pode ser realizado em condições controladas pela imersão dos moluscos em tanques com água do mar, denominado depuração. A depuração é um processo pelo qual os bivalves são alocados em tanques de água do mar limpa, em condições que maximizem a atividade de filtragem natural, resultando na expulsão de patógenos humanos presentes em seus tecidos e impedindo a recontaminação (FAO, 2008). Os períodos de depuração podem variar de 1 a 7 dias, pois o tempo mínimo não está previsto na legislação, sendo 2 dias o período mais utilizado (BOSCH, ABAD, PINTÓ, 2005). Esse processo foi criado originalmente para diminuição de surtos de febre tifoide, causada pela bactéria *S. typhi*, e hoje é comumente utilizado em países da Europa e Estados Unidos (LEES, YOUNGER, DORÉ, 2010).

A depuração em bivalves tem se mostrado eficaz e rápida para a redução dos níveis de bactérias (LEES, YOUNGER, DORÉ 2010). Love, Lovelace e Sobsey (2010) relataram que *E. coli* e *Enterococcus fecalis* podem ser removidas de ostras e mexilhões em 44 h de depuração. Phuvasate, Chen e Su (2012) observaram 99 % de decaimento de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras depuradas em diferentes temperaturas após um dia. De acordo com Kingsley e Richards (2003), sistemas de depuração comercial, com água esterilizada com luz ultravioleta (UV) diminuem significativamente os níveis de *E. coli* em moluscos contaminados. O estudo de Corrêa et al. (2007) demonstrou uma inativação total de *S. enterica* em ostras alocadas em tanques de depuração com tratamento de UV e cloro após 12 h.

Apesar da eficiência do processo para bactérias, ainda existe um risco de contaminação viral após o consumo do molusco depurado. Mesmo com o cumprimento das normas bacterianas, não há uma

garantia da ausência de vírus (BOSCH, ABAD, PINTÓ, 2005). De acordo com Richards, McLeod e Le Guyader (2010), as bactérias são removidas dos moluscos mais rapidamente do que os vírus entéricos. Assim, a taxa de depuração de bactérias não pode prever com precisão as taxa de remoção de vírus. Além disso, casos de doenças virais foram registrados após o consumo de bivalves depurados que cumpriam os padrões bacterianos (BOSCH, ABAD, PINTÓ, 2005). Devido à baixa dose infecciosa, possivelmente entre 5 a 10 partículas virais, existe a necessidade de reduzir a quantidade de vírus para níveis próximos a negligenciáveis para melhorar a segurança do consumo de moluscos. Diversos estudos relataram que são necessários três dias para a inativação de 99 % de vírus entéricos como poliovírus, adenovírus, HAV e rotavírus em diferentes espécies de moluscos (CORRÊA et al., 2012a; RICHARDS, MCLEOD, LE GUYADER, 2010, ABAD et al., 1997).

Para evitar a recontaminação dos moluscos durante a depuração, a água do mar do tanque precisa ser substituída ou reciclada durante o processo. Assim, existem dois sistemas principais de depuração: de fluxo contínuo ou aberto e de circulação ou fechado. No sistema de fluxo contínuo (Figura 2A) a água do mar é captada, filtrada, desinfetada e em seguida passa pelo tanque onde os bivalves estão alocados. Após a passagem no tanque, a água é descartada no mar, em um ponto distante da captação. No sistema fechado (Figura 2B) a água que chega ao tanque de depuração é recirculada, passando por um processo de desinfecção e retornando ao tanque (FAO, 2008).

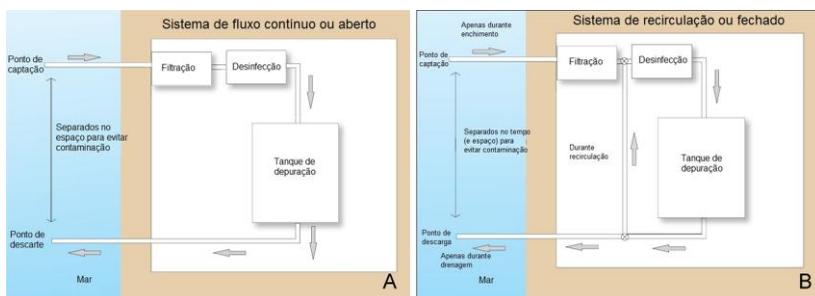


Figura 2. Esquema dos sistemas de depuração de moluscos: (A) sistema de fluxo contínuo ou aberto e (B) sistema de recirculação ou fechado (Adaptado de FAO, 2008).

A França é o país europeu com mais depuradoras em uso, utilizando tratamento com ozônio, cloro e UV, dependendo do tipo e

tamanho dos sistemas de depuração. Na Itália e na Espanha, o sistema contínuo é o mais empregado, aplicando tratamento com cloro e ozônio. Na Inglaterra existe cerca de 50 centros de purificação, sendo o processo de recirculação da água, juntamente ao tratamento com luz UV, o mais aplicado na depuração de moluscos. Nos Estados Unidos, há menos plantas de depuração operacionais hoje do que anteriormente, pois a maior parte do cultivo de moluscos está alocada em áreas mais limpas, evitando assim a necessidade de depuração (LEES, YOUNGER, DORÉ 2010; RODRICK, SCHNEIDER, 2003). No Brasil, ainda não existem centros de purificação de moluscos, apesar de o cultivo ser realizado em águas sabidamente contaminadas (MORESCO et al., 2012).

O processo de depuração é geralmente realizado em grande escala, com tanques que suportam entre 550 até 10.000 L de água do mar e 90 até 1.500 kg de moluscos, respectivamente (FAO, 2008). Para viabilizar a depuração no mercado brasileiro, a empresa Blue Water Aquaculture de Florianópolis propôs a construção de depuradoras mais compactas, de sistema fechado, com capacidade para 300 L de água e 50 dúzias de ostras (Figura 3), para serem alocadas em restaurantes tanto localizados na orla marítima quanto fora dela, com utilização de água do mar artificial (SOUZA et al., 2013).

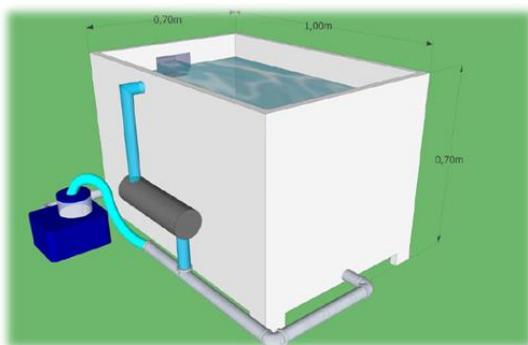


Figura 3. Desenho esquemático de um tanque de depuração compacto, desenhado pela empresa Blue Water Aquaculture.

A etapa de desinfecção da água do mar é de fundamental importância para evitar a recontaminação dos moluscos por microrganismos, principalmente na depuração de sistema fechado, no qual a descontaminação dos bivalves é dependente desse processo. Dessa forma, métodos eficientes de descontaminação de patógenos humanos na água do mar precisam ser aplicados (FAO, 2008). O cloro,

a luz ultravioleta (UV) e o ozônio são os desinfetantes mais utilizados nos processos de depuração. A Tabela 1 apresenta uma comparação entre os três modos de desinfecção. O cloro é eficiente para inativação de diversos patógenos, porém pode deixar gosto e odor na carne dos moluscos, comprometendo seu consumo. Além disso, o contato desse agente desinfetante com compostos orgânicos pode levar à formação de subprodutos tóxicos, como os trihalometanos. O ozônio é extremamente eficiente para remoção de patógenos, porém seu alto custo de operação e manutenção o torna economicamente inviável. O tratamento com luz UV é eficiente, de baixo custo, fácil manutenção e não altera a qualidade da água e dos moluscos, sendo o método mais utilizado nos processos de depuração (FAO, 2008).

Tabela 1. Comparação da eficiência da luz ultravioleta, cloro e ozônio como agentes desinfetantes nos processos de depuração de moluscos (Adaptado de FAO, 2008).

| Operação/condição | Luz ultravioleta | Cloro | Ozônio |
|--------------------------|-------------------------|----------------|---------------------|
| Capital inicial | Baixo | Médio | Alto |
| Instalação | Simple | Complexo | Complexo |
| Manutenção | Fácil | Médio | Difícil |
| Custo de manutenção | Baixo | Médio | Alto |
| Efeito virucida | Bom | Médio | Bom |
| Perigo ao homem | Médio (olhos e pele) | Alto | Médio (Oxidante) |
| Ação residual | Não | Sim | Alguma |
| Subprodutos na água | Não | Trihalometanos | Subprodutos tóxicos |
| Problemas de operação | Pouco | Médio | Muito |
| Efeitos no molusco | Nada | Irritante | Oxidante |

A ação microbicida da luz UV tem maior eficiência a um comprimento de onda próximo de 265 nm, pico máximo de absorção pelos ácidos nucleicos. A luz UV atua no genoma dos microrganismos formando dímeros de timina, inibindo a transcrição e replicação dos ácidos nucleicos, interferindo na replicação dos microrganismos (LECHEVALLIER, AU, 2004). Além disso, a fotocatalise por UV pode causar rompimento de membranas celulares em bactérias e danos em proteínas estruturais dos capsídeos virais (WIGGINTON et al., 2012; PIGEOT-RÉMY et al., 2012). No entanto, os danos no material genético podem ser reparados pelos microrganismos, principalmente aqueles que possuem genoma de DNA dupla fita, utilizando enzimas de reparo das células hospedeiras. Assim, a desinfecção por luz UV deve ser feita com dose relativamente elevada para garantir dano suficiente no genoma que evite o seu reparo (LECHEVALLIER, AU, 2004).

A eficiência da inativação de diversos microrganismos em água por luz UV é bem conhecida. Geralmente, as bactérias são mais susceptíveis a esse tratamento, sendo que para um decaimento de 4 logs (99,99 %), as bactérias fecais, como *E. coli* e *Streptococcus faecalis*, requerem doses inferiores a 30 mJ/cm². Nessa mesma dosagem, alguns vírus também são inativados, como norovírus e o vírus da hepatite A. Contudo, alguns vírus apenas são inativados quando submetidos a dosagens superiores de luz UV, como os adenovírus, que requerem cerca de 170 mJ/cm² para sua completa inativação (HIJNEN, BEERENDONK, MEDEMA, 2006; LECHEVALLIER, AU, 2004). A Tabela 2 apresenta a dosagem aproximada de UV necessária para inativação de diferentes microrganismos.

Tabela 2. Dosagem de luz UV necessária para inativação de 1 a 4 logs de vírus e bactérias (Adaptado de HIJNEN, BEERENDONK, MEDEMA, 2006).

| Inativação microbicida (log) | Dose necessária (mJ/cm ²) | | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Adenovirus | 42 | 83 | 125 | 167 |
| Calicivirus canino | 10 | 21 | 31 | 41 |
| Rotavirus SA-11 | 10 | 20 | 29 | 39 |
| Calicivirus felino | 9 | 9 | 28 | 38 |
| Coxsackie virus B5 | 8 | 17 | 25 | 34 |
| <i>Streptococcus faecalis</i> | 9 | 16 | 23 | 30 |
| <i>Legionella pneumophila</i> | 8 | 15 | 23 | 30 |
| Poliovirus tipo 1 | 7 | 15 | 22 | 30 |
| <i>Salmonella typhi</i> | 6 | 12 | 17 | 51 |
| Vírus da hepatite A | 6 | 11 | 17 | 22 |
| <i>Escherichia coli</i> | 5 | 9 | 14 | 19 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 3 | 7 | 10 | 14 |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 2 | 4 | 7 | 9 |

1.3. VÍRUS ENTÉRICOS

Dentre os microrganismos transmitidos pela via fecal-oral, os vírus entéricos humanos são causadores de diversas doenças, como gastroenterites, hepatites e conjuntivites. Alguns deles também estão relacionados com algumas doenças crônicas, como diabetes e síndrome da fadiga crônica. Os vírus entéricos mais prevalentes e que são transmitidos ao homem são os vírus da hepatite A e E, norovírus, enterovírus, poliomavírus e adenovírus. Pessoas infectadas podem excretar de 10⁵ a 10¹¹ partículas virais por grama de fezes, mesmo na ausência de sintomas. Além disso, esses vírus possuem baixa dose infecciosa, podendo causar infecção pela ingestão de 10 a 100 vírions.

Apesar da exposição nos primeiros anos de vida evocar imunidade contra novas infecções, os vírus entéricos podem ser um fator de risco para pacientes imunocomprometidos, gestantes, crianças e idosos (LA ROSA et al., 2012; ASHBOLT, 2004).

Os adenovírus humanos (AdV) pertencem a família Adenoviridae, gênero Mastadenovirus, o qual contém 57 sorotipos divididos em 7 espécies (A a G). São vírus de aproximadamente 90 nm, não envelopados, com capsídeo de formato icosaédrico, de 252 capsômeros, sendo estes compostos por 240 hexons e 12 pentons (Figura 4). Em cada penton há a projeção de uma ou duas fibras, que apresentam grande importância na adsorção à célula hospedeira. Possuem genoma de DNA dupla fita com tamanho que varia entre 26 e 45 kb. As infecções por adenovírus podem gerar diversas enfermidades, desde inflamações no trato respiratório até gastroenterites (ICTV, 2012; WOLD, HORWITZ, 2007).

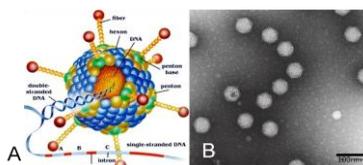


Figura 4. Estrutura do adenovírus humano: (A) desenho esquemático e (B) microscopia eletrônica de transmissão.

Os adenovírus são capazes de sobreviver às condições ambientais, sendo resistentes a alterações térmicas e à radiação solar. O DNA de dupla fita, que compreende o genoma do vírus, também proporciona uma maior estabilidade no ambiente. Além disso, os adenovírus utilizam enzimas de reparo das células hospedeiras para restaurar o DNA danificado, podendo prolongar a sua sobrevivência e aumentar sua resistência à inativação por luz UV (MENA, GERBA, 2008). Devido a sua grande resistência, os adenovírus têm sido utilizados para avaliar a eficiência de alguns tipos de tratamentos em diferentes matrizes ambientais, sendo também indicados por alguns autores como marcadores virais de contaminação (CARRATALÀ et al., 2013; BOFFIL-MAS et al., 2013; ALBINANA-GIMENEZ et al., 2009).

Os adenovírus figuram como a segunda principal causa de doenças respiratórias e gastroenterites em crianças, sendo que diversos surtos dessas doenças foram relatados em hospitais e creches (ERSOY et al., 2012; LANDRY et al., 2009; MENA, GERBA, 2008; SHIMIZU

et al., 2007). Além disso, um surto de pneumonia no Alasca foi relacionado com a infecção por adenovírus do sorotipo 14 em crianças e adultos (ESPOSITO et al., 2010). A principal via de transmissão é pela ingestão de água e alimentos contaminados. Estudos relatam que os adenovírus são frequentemente detectados em moluscos produzidos em todo mundo, inclusive na cidade de Florianópolis, SC (SOUZA et al., 2013; RIGOTTO et al., 2010; UMESHA et al., 2008; HERNROTH, ALLARD, 2007).

Os norovírus humanos (NoV) pertencem à família Caliciviridae, gênero *Norovirus*. São vírus de genoma RNA fita simples de senso positivo linear, com tamanho aproximado de 7,5 kb. Seu genoma é envolto por um capsídeo icosaédrico contendo 180 cópias da proteína estrutural VP1, organizada em 90 dímeros, e algumas cópias da proteína VP2. Possuem um diâmetro aproximado de 30 nm de e são desprovidos de envelope lipídico (Figura 5). Estão divididos em cinco genogrupos (GI-GV), com base na identidade de aminoácidos da proteína estrutural principal VP1, sendo GI, GII e GIV os genogrupos que infectam humanos. São os principais agentes causadores de gastroenterites não bacterianas, sendo diarreia e vômito as manifestações clínicas mais frequentes (GREEN, 2007). Por não possuírem envelope, podem resistir a condições adversas no ambiente, como variações de temperatura e ação do cloro na água (LA ROSA et al., 2012)

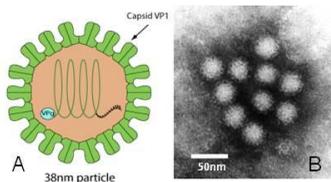


Figura 5. Estrutura do norovírus humano: (A) desenho esquemático e (B) microscopia eletrônica de transmissão.

Surto têm sido frequentemente relatados em ambientes coletivos (asilos, hospitais, creches, navios de cruzeiro), onde o controle de NoV é dificultado devido à transmissão eficiente de pessoa a pessoa, bem como a resistência do vírus aos agentes de limpeza comumente utilizados. Apesar de ser tipicamente uma doença de curta duração, casos de mortes têm sido reportados em populações vulneráveis, como pessoas imunocomprometidas, idosos e crianças (LA ROSA et al., 2012; CDC, 2011). Norovírus é o principal patógeno relacionado a surtos pelo

consumo de alimentos contaminados, incluindo moluscos (CDC, 2011). A detecção de norovírus humano em bivalves é bastante relatada, sendo relacionada com surtos em diversos países (SUFFREDINI et al., 2012; MESQUITA et al., 2011; TERIO et al., 2010).

1.4. ESTUDOS DE VIABILIDADE VIRAL EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Nas últimas décadas, tem crescido a importância do estudo de vírus transmitidos pela água. Isso se deve principalmente ao aumento da proporção de pessoas susceptíveis a tais infecções (idosos, crianças, indivíduos imunocomprometidos e gestantes), assim como a evolução natural dos microrganismos que adquiriam maior virulência, aliado ao uso de métodos moleculares de monitoramento mais sofisticados e identificação de patógenos (REYNOLDS, MENA, GERBA, 2008). Os métodos de amplificação de ácidos nucleicos pela técnica de PCR são amplamente utilizados, porém o seu emprego na detecção de vírus em amostras ambientais é controversa. Isso se deve ao fato de que a infecciosidade viral não pode ser inferida pelos métodos moleculares, baseados unicamente na identificação da presença do genoma desses patógenos, sendo importante o emprego de métodos de infecção celular *in vitro* que confirmem a viabilidade desses vírus no ambiente. (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2012; BAERT, DEBEVERE, UYTENDAELE, 2009; BOSCH et al., 2008). Além disso, o material genético viral pode permanecer estável em amostras ambientais, porém pode haver redução da infecciosidade desses vírus. Essa divergência pode ser maior quando as amostras são armazenadas, tanto em temperatura ambiente, quanto refrigeradas ou congeladas (OLSON, AXLER, HICKS, 2004).

A divulgação de dados de contaminação viral no meio ambiente aquático e nos moluscos bivalves pode comprometer seriamente o desenvolvimento sustentável dessas atividades. Esses laudos, que são baseados na detecção dos genomas virais, não inferindo sobre a infecciosidade dos mesmos, podem ser alarmantes e sem real significado epidemiológico, uma vez que os vírus podem se encontrar inativados. A maioria dos trabalhos de depuração viral de bivalves faz a avaliação apenas pela presença ou ausência e quantificação de cópias genômicas (CORRÊA et al., 2012a; LOVE, LOVELACE, SOBSEY, 2010; NAPPIER, GRACZYK, SCHWAB, 2008). Dessa forma, é importante verificar a redução da viabilidade viral no processo de depuração, oferecendo assim uma informação confiável do risco de desenvolver uma doença após o consumo de moluscos.

Estudos que avaliam a viabilidade viral necessitam de técnicas de cultivo celular bem estabelecidas. Porém, muitos vírus entéricos detectados em amostras ambientais, como os norovírus humanos, o vírus da hepatite A e os adenovírus 40 e 41, não são adaptados para esses ensaios, pois não são capazes de causar efeito citopático *in vitro*, inviabilizando a observação e acompanhamento da infecção. Nesses casos, apenas é possível detectar os vírus por métodos moleculares (GENSBERGER, KOSTIC, 2013; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2012). No entanto, estudos de desinfecção viral por diferentes tratamentos em diversas matrizes precisam garantir que os vírus não permanecem viáveis após o tratamento. Para isso, vírus cultiváveis *in vitro* podem ser utilizados como modelos para inferir o comportamento dos vírus fastidiosos (BAERT, DEBEVERE, UYTTENDAELE, 2009).

O norovírus murino (MNV-1) tem sido amplamente utilizado como substituto ao norovírus humano, pois pertence à mesma família e gênero e apresenta grande semelhança estrutural e na via de transmissão (CANNON et al., 2006). É capaz de infectar *in vitro* a linhagem celular de macrófago murino RAW264.7, causando efeito citopático em aproximadamente 36 h. O ensaio de placa de lise está bem padronizado, fornecendo informações sobre a viabilidade viral em apenas 48 h (GONZALEZ-HERNANDEZ, CUNHA, WOBUS, 2012; PREDMORE, LI, 2011).

Com relação aos adenovírus humanos, os sorotipos 40 e 41 (entéricos) são fastidiosos e podem ser substituídos, em análises de infecciosidade, pelos adenovírus humanos dos sorotipos 2 e 5 (respiratórios), que infectam diversos tipos celulares (CARRATALÀ et al., 2013; KAHLER, 2010). O ensaio mais utilizado para a detecção é o de placa de lise, porém essa técnica é morosa e demora até sete dias para apresentar resultados (CROMEANS et al., 2008; GUERET et al., 2002).

Os adenovírus humanos recombinantes proporcionaram avanços para os estudos de expressão gênica e aplicações terapêuticas, incluindo a transferência de genes *in vitro*, podendo ser utilizados em ensaios de terapia gênica e vacinas (McCONNELL, IMPERIALE, 2004; NADEAU, KAMEN, 2003; MILLER, 1992). A substituição do gene E1 pelo gene da proteína verde fluorescente (GFP) em adenovírus do sorotipo 5 permitiu a visualização das infecções *in vitro* pela emissão de fluorescência nas células infectadas. O gene E1 tem sua expressão imediata logo após a entrada do adenovírus na célula hospedeira e é responsável pela transcrição do genoma viral, indução da fase S no ciclo celular e bloqueio da apoptose na célula infectada (WOLD, HORWITZ, 2007). O adenovírus recombinante que expressa GFP (rAdV-GFP) se

replica apenas em linhagem celular permissiva que possui o gene E1 inserido em seu genoma, como as células embrionárias de rim humano (HEK293), que foram transformadas por Graham et al. (1977). Assim, quando o adenovírus se replica nessa linhagem celular expressa também a GFP, permitindo o acompanhamento da infecção viral por meio de técnicas de detecção de fluorescência (WEAVER, KADAN, 2000).

Estudos demonstram que a detecção de células infectadas por adenovírus recombinante pode ser realizada de forma rápida e eficaz pela técnica de citometria fluxo e microscopia de fluorescência, sem a necessidade do emprego de métodos imunológicos, o que torna o ensaio mais rápido, barato e específico (LI, HE, JIANG, 2010; GUERET et al., 2002; HITT et al., 2000). Assim, o rAdV-GFP pode ser utilizado como um modelos em estudos de infecciosidade em amostras ambientais. Estudos com a utilização de rAdV em matrizes ambientais ainda são raros. Li, Shi e Jiang (2010) avaliaram a eficiência de técnicas para concentração de amostras ambientais usando esse vírus. Porém, estudos de desinfecção e estabilidade viral com o adenovírus recombinante não foram encontrados na literatura até o presente momento.

2. JUSTIFICATIVA

A cidade de Florianópolis, SC, é responsável por mais de 90 % da produção de ostras no Brasil (Epagri, 2012). Porém, muitos dos locais onde as ostras são cultivadas estão contaminados por patógenos, principalmente vírus entéricos, como adenovírus e norovírus (MORESCO et al., 2012; RIGOTTO et al., 2010). Devido à capacidade filtradora das ostras, elas podem concentrar patógenos em seus tecidos e se tornam reservatórios de vírus entéricos humanos. Ao serem consumidas cruas ou mal cozidas, podem causar uma diversidade de doenças, como as gastroenterites e hepatites (WANG, DENG, 2012).

A depuração surgiu como um método para purificação de moluscos anterior ao consumo e é utilizada em vários países (LEES, YOUNGER, DORÉ 2010). O processo é eficiente para a remoção de bactérias, porém a redução de vírus é mais demorada. Os parâmetros estabelecidos na legislação são baseados apenas em *E. coli* e *Salmonella* sp., no entanto vírus são mais resistentes às condições ambientais e aos tratamentos aplicados, além de serem responsáveis por diversos surtos (BELLOU, KOKKINOS, VANTARAKIS, 2013). A garantia de uma boa depuração depende da eficiência do tratamento aplicado à água do mar, principalmente nos sistemas de recirculação (fechado). O tratamento mais frequentemente utilizado para depuração é a luz UV,

pois apresenta baixo custo de instalação e manutenção, não altera a qualidade da água e dos moluscos e é eficiente na inativação de bactérias e vírus (FAO, 2008).

A divulgação de dados de contaminação viral no ambiente aquático e em moluscos baseados na detecção molecular, sem inferir a viabilidade dos mesmos, pode não ter real significado epidemiológico e comprometer o desenvolvimento econômico e sustentável dessas atividades. Dessa forma, é importante a utilização de métodos de cultura celular para avaliar a infecciosidade viral. Porém, muitos vírus não são cultiváveis *in vitro*, necessitando de modelos virais como substitutos dos vírus entéricos humanos para os estudos de desinfecção e estabilidade (BAERT, DEBEVERE, UYTENDAELE, 2009).

O presente trabalho de dissertação se justifica pela importância de avaliar a inativação viral em água do mar frente ao processo de depuração em tanques que utilizam o tratamento com luz UV. Em geral, os estudos de depuração avaliam o decaimento apenas de cópias genômicas e trabalhos que inferem a viabilidade viral durante o processo são escassos. No entanto, a avaliação do decaimento da infecciosidade dos vírus apresenta maior relevância epidemiológica. Além disso, pretende-se aferir o uso rAdV-GFP como um modelo viral de adenovírus, servindo como base para futuros estudos de desinfecção e estabilidade viral em amostras ambientais.

3. HIPÓTESE

O tanque de depuração com tratamento de luz ultravioleta é eficiente para inativação viral em água do mar, sendo o adenovírus recombinante e o norovírus murino bons modelos virais para estudos de desinfecção.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a inativação adenovírus humano recombinante e norovírus murino em água do mar em tanques de depuração de moluscos com e sem tratamento de luz ultravioleta.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Estabelecer o período de pós-infecção de rAdV-GFP para a detecção de fluorescência;
- b. Padronizar as técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência para detecção de células infectadas com rAdV-GFP;
- c. Determinar o título infeccioso e limites de detecção de rAdV-GFP por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, comparando com o ensaio de placa de lise;
- d. Verificar a influência da água do mar concentrada na detecção da fluorescência de células infectadas por rAdV-GFP;
- e. Avaliar a desinfecção de rAdV-GFP e MNV-1 com e sem luz UV na água do mar em tanques de depuração;
- f. Avaliar a estabilidade de rAdV-GFP e MNV-1 na água do mar.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. CULTIVO DE CÉLULAS

Para a produção dos estoques virais e para os ensaios de viabilidade viral foram utilizadas as linhagens celulares HEK293A e RAW264.7, permissivas ao rAdV-GFP e MNV-1, respectivamente. As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular com tamanho de 180 cm² e mantidas em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO₂.

A linhagem celular HEK293A (Figura 6), derivadas de rim embrionário humano, possuem o gene *E1* dos adenovírus integrado ao seu genoma, permitindo a replicação de adenovírus com deleção desse gene. Para o cultivo das células HEK293A foi utilizado meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), suplementado com 10 % de soro fetal bovino [(SFB) Gibco], sal HEPES 1 mM (Sigma) e 1 % de solução de antibióticos e antifúngico [(PSA Cultilab - penicilina G 100 U/mL; sulfato de estreptomicina 100 µg/mL; anfotericina B 0,25 µg/mL)].

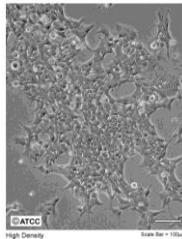


Figura 6. Células HEK293A observadas em microscópio óptico invertido.

A linhagem celular RAW264.7 (Figura 7) são macrófagos murinos (*Mus musculus*) e foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Rosina Girones Llop do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona (Espanha). O cultivo foi feito em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) suplementado com 10 % SFB, L-glutamina 2 mM (Sigma), sal HEPES 1,5 mM (Sigma) e aminoácidos não essenciais (IX) (Sigma).

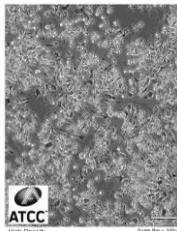


Figura 7. Células RAW264.7 observadas em microscópio óptico invertido.

5.2. PRODUÇÃO DE ESTOQUES VIRAIS

Para a produção de rAdV-GFP e MNV-1, as células foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 180 cm² até atingirem confluência e em seguida foram infectadas com os respectivos vírus para a produção dos estoques virais a serem utilizados em ensaios posteriores. Na monocamada celular, $8,0 \times 10^7$ e 2×10^7 UFP de rAdV-GFP e MNV-1, respectivamente, foram adicionados e em seguida incubados por 1 h para adsorção em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5 % de CO₂. Após esse período de incubação, foi adicionado 30 mL de meio de manutenção, que difere do meio de cultivo apresentado acima apenas na concentração de SFB (2 %). As células foram mantidas em estufa e observadas diariamente em microscópio óptico invertido (Olympus) para visualização de efeitos citopáticos (alterações morfológicas que caracterizam a infecção viral). Como controle negativo foi utilizada uma garrafa com monocamada de células não infectadas.

O tempo de incubação variou entre 36 h e 48 h para obtenção de 90-100 % de efeito citopático. Nesse estágio as garrafas foram congeladas em freezer -80 °C e degeladas a 25 °C por três vezes para promover a lise das células e liberar os vírus intracelulares. Em seguida o meio foi centrifugado a 3500 xg por 5 min para sedimentação dos restos celulares. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas de 1 mL, posteriormente armazenadas a -80 °C.

5.3. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO DOS ESTOQUES VIRAIS POR PLACA DE LISE

O título infeccioso do adenovírus recombinante e norovírus murino foi determinado pelo método de placa de lise, como descrito, respectivamente, por Cromeans et al. (2008) e Gonzalez-Hernandez, Cunha e Wobus (2012), com algumas alterações.

Para o adenovírus, células HEK293A foram cultivadas em placas de seis cavidades com 5×10^5 células por cavidade. 24 h após o plaqueamento, o meio de cultivo foi removido e adicionou-se 250 μ L de diluições seriadas entre 10^{-1} a 10^{-7} do fluído viral produzido diluído em DMEM, em duplicata. As placas foram incubadas em estufa por 1 h para adsorção viral, sendo homogeneizadas a cada 15 min. Em seguida foi removido o inóculo e adicionou-se 2,5 mL, por poço, de uma solução de meio DMEM 2X com alto teor de glicose (suplementado com 4 % de SFB, 1 % de PSA, MgCl₂ a 5 mM e piruvato de sódio a 1 mM) e Bacto™-agar 0,6 % (BD Biosciences). A adição dessa camada de agar tem por objetivo a delimitação dos locais onde houve replicação viral e lise celular. Após a polimerização do Bacto™-agar, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5 % de CO₂ por sete dias. Decorrido esse tempo, a camada contendo meio de cultura e Bacto™-agar foi retirada e o tapete celular corado com solução de cristal violeta preparado em etanol, diluído cinco vezes em água destilada, por 5 min. Após o corante ser aspirado, as placas de lise foram contadas a olho nu.

Para o norovírus murino, células RAW264.7 foram cultivadas em placas de seis cavidades com 2×10^6 células por cavidade. 24 h após o plaqueamento, o meio de cultivo foi removido e adicionado 250 μ L de diluições seriadas entre 10^{-1} a 10^{-7} do fluído viral produzido diluído em DMEM, em duplicata. As placas foram incubadas em estufa por 1 h para adsorção viral, sendo homogeneizadas a cada 15 min. Em seguida foi removido o inóculo e adicionou-se 2 mL, por poço, de uma solução de meio MEM 2X (suplementado com 2 % de SFB, 1 % de L-glutamina 2 mM, HEPES 1,5 mM, 1 % aminoácidos não essenciais e 1 % de PSA) e agarose de baixo ponto de fusão [Sea Plate (Lonza)] 3 %. Após solidificação da agarose as placas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO₂ por 48 h. Para visualização das placas de lise foi adicionado 2 mL de uma solução de vermelho neutro 0,3 % (Sigma), preparado em PBS e incubado por 2 h. Em seguida o corante foi aspirado e as placas de lise formadas foram contadas a olho nu.

Para ambos os vírus o título viral estimado, expresso em Unidades Formadoras de Placas por mL (UFP/mL), foi calculado conforme fórmula a seguir.

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{número de placas contadas} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{recíproca do volume inoculado (em mL)}}$$

O limite de detecção da técnica foi estabelecido de acordo com a maior diluição onde foi possível realizar contagem de placas.

A padronização das metodologias de cultura celular do fluido viral, descritas nos tópicos 5.4, 5.5 e 5.6, foram realizadas em parceria com a mestrandia Mariana de Almeida do Nascimento.

5.4. CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE GFP EM CÉLULAS INFECTADAS POR rADV-GFP

A cinética da detecção de fluorescência da proteína GFP expressa em células infectadas por adenovírus recombinante foi realizada para que fosse possível estabelecer o período de replicação viral no qual fosse possível detectar a fluorescência e assegurar o primeiro ciclo de replicação, evitando a superestimação do título viral devido a longos tempos de incubação.

Para isto, $1,87 \times 10^5$ células HEK293A foram cultivadas cavidades de placas de 24 poços e após 24h, quando atingido confluência, foram infectadas com 100 μL de fluido viral nos seguintes MOIs (razão vírus/célula): 10, 1, 0,5, 0,1 e 0,01. Após adsorção viral por 1 h a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO_2 , foi adicionado 650 μL de meio de manutenção por poço (DMEM 1X, 2 % SFB, 1 % PSA e 1 % Hepes). A cada 2 h, por um período de até 60 h, a fluorescência relativa foi mensurada em espectrofotômetro de UV (excitação/emissão: 395/508 nm) (Biodevices-Biosystem). Depois de estabelecida a cinética da expressão da GFP foi possível determinar o período de pós-infecção (p.i.) mais adequado para realizar os experimentos de infecciosidade viral.

5.5. AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE rADV-GFP POR CITOMETRIA DE FLUXO E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO DESTAS

As células HEK293A foram cultivadas em placas de 24 ou 48 poços na concentração de $1,87 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^5$ células/poço, respectivamente. Depois de obtida confluência em 24 h, foram adicionados 100 μL de fluido viral em diluições seriadas entre 10^{-1} e 10^{-7} ou de amostras a serem testadas, em réplicas. Para as diluições foi utilizado 50 μL de estoque viral ou amostra em 450 μL de meio DMEM acrescido de 1 % PSA. Após adsorção viral por 1 h a 37 °C sob atmosfera de 5 % de CO_2 , foram adicionados 650 μL e 400 μL por cavidade de meio de manutenção por poço (DMEM 1X, 2 % SFB, 1 %

PSA e 1 % Hepes), para as placas de 24 e 48 poços, respectivamente. Após o período de incubação determinado pelo ensaio da cinética de expressão da GFP as células infectadas foram avaliadas por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.

5.5.1. Citometria de Fluxo

As placas de 24 poços contendo as células infectadas por rAdV-GFP foram incubadas pelo período p.i. determinado pela cinética da expressão de GFP, a saber, 24h. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e as células foram retiradas das cavidades com uso de tripsina. As réplicas das diluições foram centrifugadas a 3.500 xg por 3 min, ressuspendidas e homogeneizadas com solução de EDTA 5 mM, preparada em PBS. As células foram contadas em contador automático Countess (Invitrogen) e então transferidas para tubos plásticos próprios para citometria de fluxo (BD Biosciences).

A leitura foi realizada em citômetro BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD Biosciences), contando 50.000 eventos e observada a fluorescência emitida pela GFP nas células infectadas por rAdV-GFP. A análise dos dados foi feita pelo programa Weasel 3.0.2, permitindo assim a titulação do vírus em Unidades Verde Fluorescentes por mL (UVF/mL). Para o cálculo do título viral foi utilizado a fórmula a seguir.

$$\text{UVF/mL} = \frac{\% \text{ de células infectadas} \times \text{número total de células} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{recíproca do volume inoculado (em mL)}}$$

O limite de detecção da técnica foi estabelecido de acordo com a maior diluição onde foi possível realizar a contagem das células infectadas.

5.5.2. Microscopia de Fluorescência

As placas de 48 poços contendo as células infectadas por rAdV-GFP ficaram incubadas por 24 h, período p.i. determinado pela cinética da expressão de GFP. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e imediatamente foi realizada a visualização em microscópio de fluorescência invertido (Olympus). As células fluorescentes foram contadas em aumento de 100x e a estimativa do título viral foi estabelecida em Unidades Formadoras de Foco por mL (UFF/mL) conforme a fórmula a seguir.

$$\text{UFF/mL} = \frac{\text{número de células fluorescentes} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{recíproca do volume inoculado (em mL)}}$$

O limite de detecção da técnica foi estabelecido de acordo com a maior diluição onde foi possível realizar contagem de células fluorescentes.

5.6. OBTENÇÃO DA ÁGUA DO MAR E MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO VIRAL

A água do mar natural utilizada nos ensaios foi coletada na Praia Barra da Lagoa, localizada no Leste da Ilha de Florianópolis e fornecida através de um contrato da UFSC com a empresa transportadora da água. A água era filtrada previamente ao armazenamento em caixa d'água com oxigenação. A salinidade mensurada foi de 31 partes por mil (ppm). Em todos os experimentos que envolveram a detecção de vírus em água do mar, foi utilizado o volume de 10 L ou 1 L de água para a concentração dos vírus presentes na mesma

A metodologia empregada para a concentração da água do mar no presente trabalho se encontrava padronizada no Laboratório de Virologia Aplicada. No entanto buscou-se a otimização da técnica no laboratório, certificando a alteração do pH com aparelho de medição digital. A concentração baseou-se no método descrito por Calgua et al. (2008), que consiste na concentração de vírus presentes em um determinado volume de amostra até um volume de 10 mL por meio da interação dos vírus presentes nas amostras com uma solução de leite desnatado floculado. A amostra de água do mar foi previamente acidificada com HCl 5 N até o pH 3,5, seguida da adição de uma solução de leite desnatado acidificado (pH 3,5) preparado em água do mar natural (*Pre-flocculated Skimmed Milk PSM*, 0,1 % - Difco). Essa solução acidificada permite a formação de flocos proteicos de leite, permitindo a adsorção dos vírus presentes na água. Após 8 h de agitação, a amostra permaneceu 8h em repouso para sedimentação dos flocos com os vírus adsorvidos. Em seguida foi retirado o sobrenadante e o sedimentado foi centrifugado a 3.800 $\times g$ por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em tampão fosfato (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,2 M 1:2 v/v) e completado até 10 mL. As amostras concentradas foram imediatamente adicionadas às monocamadas de células, sem armazenamento prévio.

5.7. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DA ÁGUA DO MAR CONCENTRADA

Este ensaio foi realizado para determinar a menor diluição da amostra de água do mar concentrada a ser utilizada nos ensaios de

cultura celular que não apresentasse efeito citotóxico frente às células de estudo.

Para isso, monocamadas de células HEK293A e RAW264.7 em placas de 24 poços foram adicionadas com 100 µL de amostra de água do mar concentrada (sem a presença dos vírus) diluídas seriadamente em DMEM (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), além de uma amostra pura, sempre com a adição de 1 % de PSA. As placas foram mantidas a 37 °C, 5 % de CO₂ e após 1 h as amostras foram aspiradas e foi adicionado meio de manutenção (DMEM suplementado). As células foram observadas em microscópio óptico para visualização de alterações morfológicas celulares (efeito citotóxico) durante um período 48 h. Após esse período, o sobrenadante foi aspirado e a monocamada de células foi corada com solução de preto de naftaleno para confirmação do efeito citotóxico.

5.8. INFLUÊNCIA DA ÁGUA DO MAR CONCENTRADA NA DETECÇÃO DE rADV-GFP E AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO VIRAL DO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO

Este ensaio teve o objetivo de determinar se a água do mar concentrada poderia alterar a sensibilidade das técnicas e detecção de células infectadas por adenovírus recombinante e também verificar a porcentagem de recuperação viral obtida pelo processo de concentração.

Para isso, 10 L de água do mar foram inoculados com $4,0 \times 10^7$ UFP de rAdV-GFP e concentrados com descrito anteriormente. Outros 10 L de água do mar sem vírus foram concentrados e inoculados com $4,0 \times 10^7$ UFP de rAdV-GFP após a eluição com tampão fosfato. Essas amostras foram diluídas em DMEM com 1% de PSA, entre 10^{-1} e 10^{-7} , e 100 µL foram adicionados em monocamadas de células HEK293A cultivadas em placas de 24 ou 48 poços. O fluído viral nas mesmas diluições foi utilizado como controle positivo. Após 1h de adsorção viral em estufa foram adicionados 650 µL e 400 µL por cavidade de meio de manutenção por poço para as placas de 24 e 48 poços, respectivamente. Após o período de incubação determinado pelo ensaio da cinética de expressão da GFP as células infectadas foram avaliadas por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência e observada a influência na detecção de GFP. Para estimar a porcentagem da recuperação viral da concentração foi feito o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{\text{título viral inoculado antes da concentração} \times 100}{\text{título viral inoculado após a concentração}}$$

5.9. AVALIAÇÃO DA DESINFECÇÃO VIRAL POR LUZ UV EM ÁGUA DO MAR EM TANQUES DE DEPURAÇÃO

Para os ensaios de desinfecção viral em água do mar por luz UV, foram utilizados dois tanques de depuração com capacidade de 300 L de água (Figura 3), com um fluxo de 1800 L/h. Um dos tanques continha uma lâmpada UV de 36 W acoplada, que aplicava uma dose aproximada de 44 mJ/cm² por passagem da água. Assim, a dose acumulada por hora foi de 264 mJ/cm². A água nos tanques teve sua temperatura controlada em 16°C.

Os dois tanques (com UV e sem UV) foram preenchidos com 300 L de água do mar e após alcançarem a temperatura desejada foram inoculados os vírus rAdV-GFP e MNV-1 em quantidades suficientes para se observar pelo menos 4 logs de decaimento, com concentração aproximada de 3x10⁶ UFF/L e 3x10⁶ UFP/L, respectivamente. Imediatamente após a homogeneização dos vírus foi retirada uma amostra de 10 L de água de cada tanque, representando o tempo 0h. Após 24 h, 48 h e 72 h de depuração foram realizadas novas amostragens de 10 L de água. As amostras coletadas nos tanques foram imediatamente concentradas e o eluato final, sem armazenamento prévio, foi inoculado em monocamada de células HEK293A e RAW264.7 para avaliação da infecciosidade viral por microscopia de fluorescência (rAdV-GFP) e placa de lise (MNV-1), respectivamente. Em todos os tempos de amostragem, 10 L de água do mar limpa foi inoculada com quantidade conhecida de rAdV-GFP e MNV-1, concentrada e avaliada a infecciosidade, para servir como controle da recuperação viral. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.10. AVALIAÇÃO DO DECAIMENTO VIRAL NA ÁGUA DO MAR

Para determinar a estabilidade do rAdV-GFP e MNV-1 na matriz de água do mar, em escala de bancada, 10 L de água do mar foram inoculados com 4,0x10⁷ e 1x10⁷ UFP de adenovírus e norovírus, respectivamente. Após homogeneização, 1 L de água foi coletado, concentrado por floculação e imediatamente inoculado em monocamada de células HEK293A e RAW264.7 para avaliação da infecciosidade viral por microscopia de fluorescência (rAdV-GFP) e placa de lise (MNV-1), respectivamente. Após 24 h de agitação em temperatura controlada, uma nova amostra de 1 L foi retirada, concentrada e a infecciosidade foi avaliada.

5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a estatística descritiva foi utilizada a média e o desvio-padrão (dp). Para a cinética de expressão de GFP e correlação entre as técnicas de detecção viral foi aplicado, respectivamente, o teste *t* de Student e regressão linear pelo programa GraphPad Prism version 5.0 (USA).

Para a análise dos experimentos de desinfecção dos vírus considerando os grupos de tratamento e o tempo decorrido, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) mista. Previamente, foram verificados os pressupostos de normalidade dos resíduos (por meio do teste de Shapiro-Wilk), de esfericidade (por meio do teste de Mauchly) e de homogeneidade das variâncias (por meio do teste de Levene), sendo que todos foram atendidos. Foram analisados os efeitos do grupo de tratamento (fator independente), do tempo decorrido (fator dependente) e da interação entre grupo e tempo decorrido sobre a média de concentração dos vírus. O teste de Bonferroni foi utilizado como teste *post hoc*.

Para análise do ensaio de estabilidade viral na água do mar foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. Em todos os testes estatísticos aplicados considerou-se como significativos valores $-p < 0,05$. As análises de ANOVA mista e de Wilcoxon foram realizadas com o programa IBM SPSS 19.0.

6. RESULTADOS

6.1. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO DOS ESTOQUES VIRAIS POR PLACA DE LISE

A determinação do título infeccioso de rAdV-GFP foi determinado pelo ensaio de placa de lise, sendo posteriormente comparado com as técnicas de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. O título do estoque viral obtido foi de $4,0 \times 10^7$ UFP/mL, sendo a diluição 10^{-6} o limite de detecção desta. O título de MNV-1 obtido por placa de lise foi de $1,0 \times 10^7$ UFP/mL, com o limite da detecção na diluição 10^{-6} . A Figura 8 exemplifica o resultado do ensaio de placa de lise em células HEK293A e RAW264.7, respectivamente infectadas com rAdV-GFP e MNV-1.

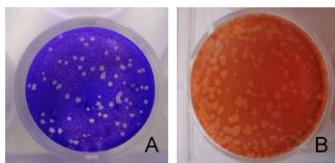


Figura 8. Formação de placas de lise após a infecção de células (A) HEK293A por rAdV-GFP e (B) RAW 264.7 por MNV-1.

6.2. CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE GFP EM CÉLULAS INFECTADAS POR rADV-GFP

A partir do título de rAdV-GFP obtido por placa de lise, células HEK293 foram infectadas em multiplicidade de infecção (MOI) de 10, 1, 0,5, 0,1 e 0,01. Após a infecção foi realizada a leitura de fluorescência em espectrofotômetro de UV (excitação/emissão: 395/508 nm) a cada 2 h por até 60 h, para avaliar em qual período seria possível detectar a fluorescência da GFP produzida em células infectadas.

Após 20h de infecção foi possível observar efeito citopático nas células infectadas com MOIs de 10, 1 e 0,5. Após 40h, as células infectadas com MOI de 10 não estavam mais aderidas e nos poços em que se utilizou MOIs de 1 e 0,5 as células apresentavam 100 % de efeito citopático. A Figura 9 apresenta a cinética de detecção de fluorescência. Observou-se que entre 18 h e 20 h, nos MOIs de 10 e 1, há um aumento significativo da fluorescência detectada ($p < 0,05$). Dessa forma, o período de pós-infecção (p.i.) de 24 h foi escolhido para os ensaios de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, uma vez que foi possível detectar a fluorescência em células infectadas.

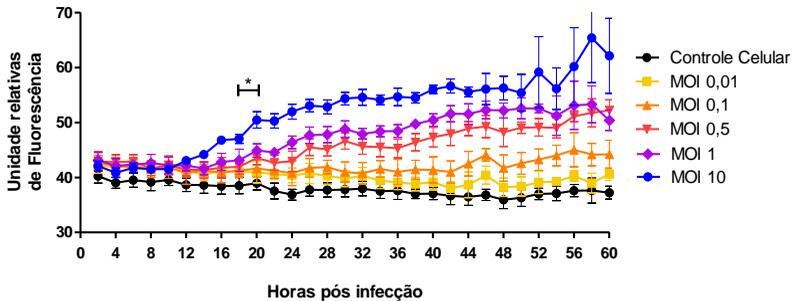


Figura 9. Detecção da fluorescência da GFP em células infectadas por adenovírus recombinantes nos MOIs de 10, 1, 0,5, 0,1 e 0,01, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro de UV a cada 2 h. * $p < 0,05$.

6.3. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO DE rADV POR CITOMETRIA DE FLUXO E MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Estabelecido o período p.i. de 24 h para a detecção da GFP, realizou-se a determinação do título infeccioso do rAdV por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.

Para a citometria, após a infecção, as células foram recolhidas e 50.000 eventos foram contados em citômetro de fluxo. O título obtido foi de $1,4 \times 10^9$ UFF/mL e o limite de detecção foi a diluição 10^{-4} , correspondente a $2,1 \times 10^5$ UFF/mL. O título estabelecido pela técnica da microscopia de fluorescência, o foi de $8,5 \times 10^7$ UFF/mL, sendo possível detectar células fluorescentes até a diluição 10^{-6} , correspondente a $8,5 \times 10^1$ UFF/mL. A comparação dos limites de detecção das técnicas é mostrada na Figura 10. A microscopia de fluorescência e o ensaio de placa de lise apresentaram títulos e limites de detecção semelhantes, sendo ambas mais sensíveis do que a citometria de fluxo.

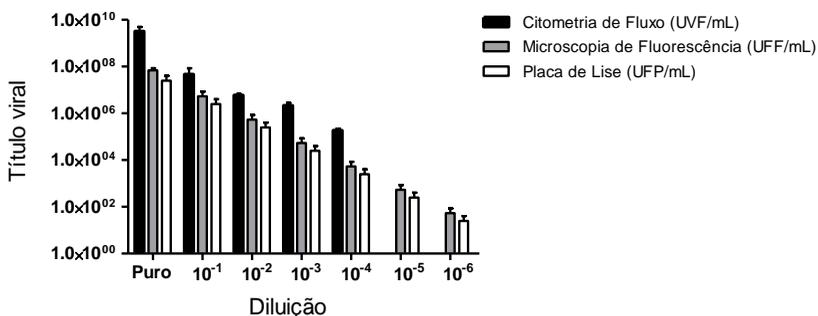


Figura 10. Título viral do rAdV-GFP em diferentes diluições virais, obtido pelas técnicas de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e placa de lise.

A análise de regressão apresentou uma correlação linear entre a citometria de fluxo e o ensaio de placa de lise, com um valor de r^2 de 0,9468. Foram plotados os valores normalizados em \log_{10} de rAdV inoculados em diluições decimais que variaram de $4,0 \times 10^2$ - $4,0 \times 10^7$ UFP/mL e o título viral obtido pelo ensaio de citometria de fluxo em cada diluição (Figura 11).

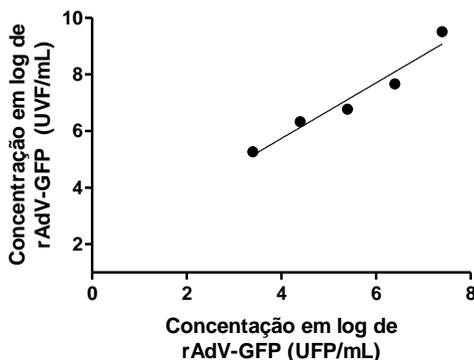


Figura 11. Valores normalizados em \log_{10} de rAdV inoculado no ensaio de placas (UFP/mL) versus o título viral obtido por citometria de fluxo (UVP/mL). A análise de regressão linear, com um valor r^2 de 0,9468 foi obtido com a equação: $y = 0,9821x + 1,8048$.

6.4. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DA ÁGUA DO MAR CONCENTRADA

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para avaliar qual diluição de água do mar concentrada não era tóxica para as células HEK293 e RAW264.7. A amostra de água do mar concentrada, sem vírus, foi adicionada pura e em diluições seriadas sobre as células. Após 48 h as diluições a partir de 1:4 não apresentaram efeito citotóxico em ambas as linhagens celulares, sendo essa a diluição mínima escolhida para os ensaios seguintes.

6.5. INFLUÊNCIA DA ÁGUA DO MAR CONCENTRADA NA DETECÇÃO DE GFP E AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO VIRAL DO MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO

Esse ensaio foi realizado para determinar se a água do mar concentrada poderia influenciar na detecção da GFP em células infectadas por rAdV, bem como avaliar a porcentagem de recuperação viral do método de concentração por floculação. Para isso, inoculou-se rAdV-GFP em uma amostra de água do com antes da concentração e outra amostra depois da concentração. Após a infecção em monocamada de HEK293A, a contagem de células foi realizada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.

O título viral determinado pela técnica de citometria de fluxo na água do mar inoculada com rAdV-GFP após a concentração foi $1,2 \times 10^9$ UFF/mL, semelhante ao do estoque viral (Figura 12). Da mesma forma, o título viral avaliado por microscopia de fluorescência na água do mar inoculada após a concentração foi de $8,2 \times 10^7$ UFF/mL, similar à solução estoque (Figura 13). Em ambas as técnicas a diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Assim, a água do mar concentrada não influenciou na detecção da GFP, podendo ser utilizada nos ensaios posteriores.

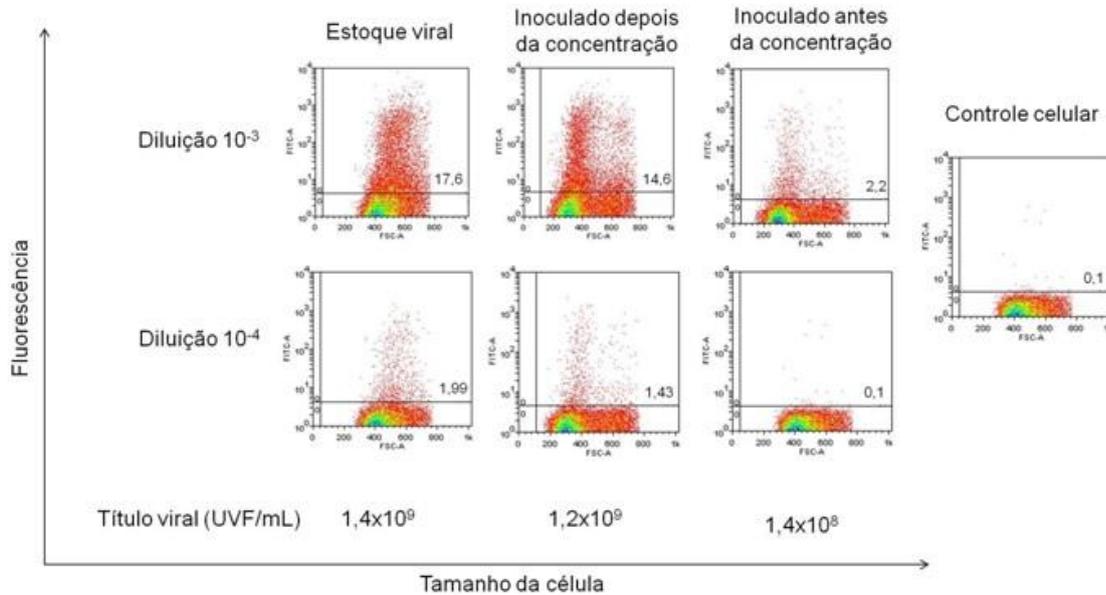


Figura 12. Dotplots e porcentagem de células infectadas por rAdV-GFP em duas diluições do estoque viral, da água do mar inoculada após a concentração e da água do mar inoculada antes da concentração e os respectivos títulos virais obtidos. As células foram contadas por citometria de fluxo, considerando 50.000 eventos e analisadas no programa Weasel 3.0.2.

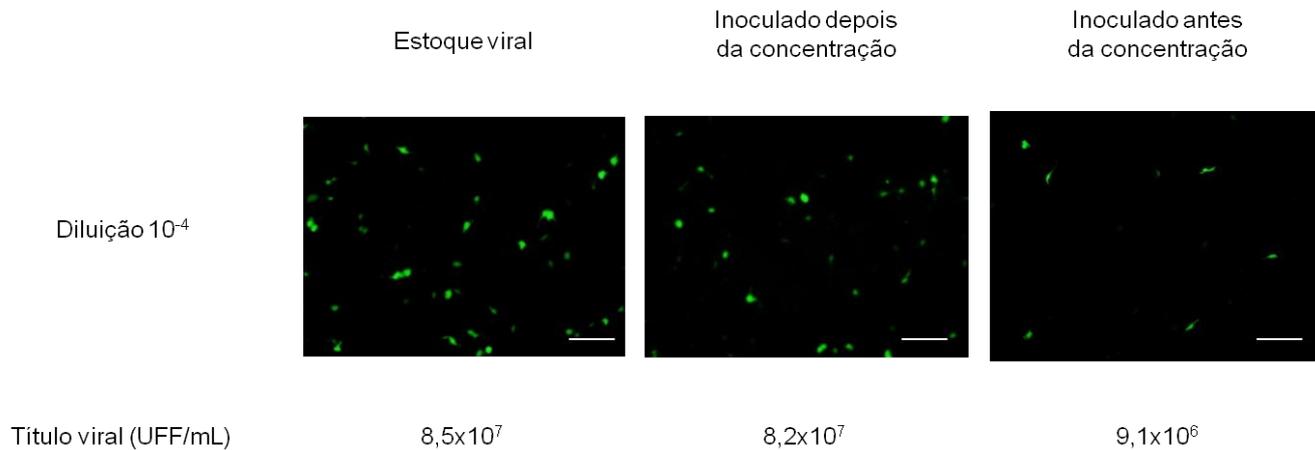


Figura 13. Imagens de microscopia de fluorescência de células infectadas por rAdV-GFP na diluição 10^{-4} do estoque viral, da água do mar inoculada após a concentração e da água do mar inoculada antes da concentração, e os respectivos títulos virais obtidos. Aumento de 100x. Barras representam 200 μm .

A partir da comparação entre o título infeccioso obtido na água do mar inoculada após a concentração e na água inoculada antes da concentração, pode-se definir a porcentagem da concentração viral do método. O título determinado na água inoculada antes da flocculação foi de $1,4 \times 10^8$ UVF/mL por citometria de fluxo e $9,1 \times 10^6$ UFF/mL por microscopia de fluorescência. Assim, a técnica de concentração por flocculação orgânica apresentou uma eficiência de recuperação viral de 11% neste ensaio.

Devido a maior sensibilidade na detecção de células verde fluorescentes com relação à citometria de fluxo e também o menor tempo de pós-infecção comparada ao ensaio de placa de lise, a técnica de microscopia de fluorescência foi selecionada para os ensaios posteriores.

6.6. AVALIAÇÃO DA DESINFECÇÃO VIRAL POR LUZ UV EM ÁGUA DO MAR EM TANQUES DE DEPURAÇÃO

Para avaliar o decaimento viral na água do mar em tanques de depuração acoplados a luz UV, dois tanques (com e sem tratamento) foram preenchidos com água do mar, inoculados com rAdV-GFP e MNV-1 em concentração final aproximada de $3,0 \times 10^6$ UFF/L e $3,0 \times 10^6$ UFP/L, respectivamente. Foram retiradas amostras de 10 L de água no tempo inicial (0h), bem como após 24 h, 48 h e 72 h, para posterior concentração e avaliação da viabilidade viral por microscopia de fluorescência (rAdV- GFP) e por placa de lise (MNV-1). Em cada tempo de amostragem, como controle positivo da concentração, uma amostra de 10 L de água do mar filtrada foi inoculada com ambos os vírus e concentrada pelo mesmo método.

A Tabela 3 apresenta a média do decaimento viral em logs e o desvio padrão da triplicata. Para o MNV-1, 24 h de depuração foi suficiente para inativar mais de 6 logs, não sendo possível detectar norovírus viáveis em ambos os tanques. O decaimento da concentração viral nos tanques de depuração para rAdV-GFP pode ser visualizado na Figura 14. O tanque de depuração com tratamento de luz UV foi capaz de inativar 99,99 % (4 logs) em apenas 24 h. Em 48 h não foi possível detectar células fluorescentes. No tanque sem tratamento, o decaimento foi mais gradual, decaindo 2 logs a cada 24 h, inativando 99,99 % em 48 h. Em 72 h não foi possível detectar vírus viáveis na água do mar de ambos os tanques (Figura 15).

Tabela 3. Média e desvio padrão do decaimento em logs de rAdV-GFP e MNV-1 após 24 h, 48 h e 72 h, em tanques de depuração com e sem tratamento de luz UV.

| Vírus | Tempo | Logs de decaimento (DP) | |
|-------|-------|-------------------------|---------------------|
| | | Com UV | Sem UV |
| rAdV | 24h | 4,03 (0,11)** | 2,02 (0,17)* |
| | 48h | > 6,00 ^a | 4,14 (0,29)** |
| | 72h | - | > 6,00 ^a |
| MNV | 24h | > 6,00 ^a | > 6,00 ^a |

a Abaixo do limite de detecção da técnica.

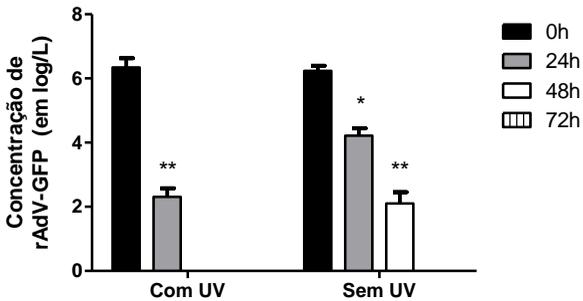


Figura 14. Concentração de rAdV-GFP (em log/L) na água do mar nos tanques de depuração com e sem UV no tempo inicial (0h) e após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento.

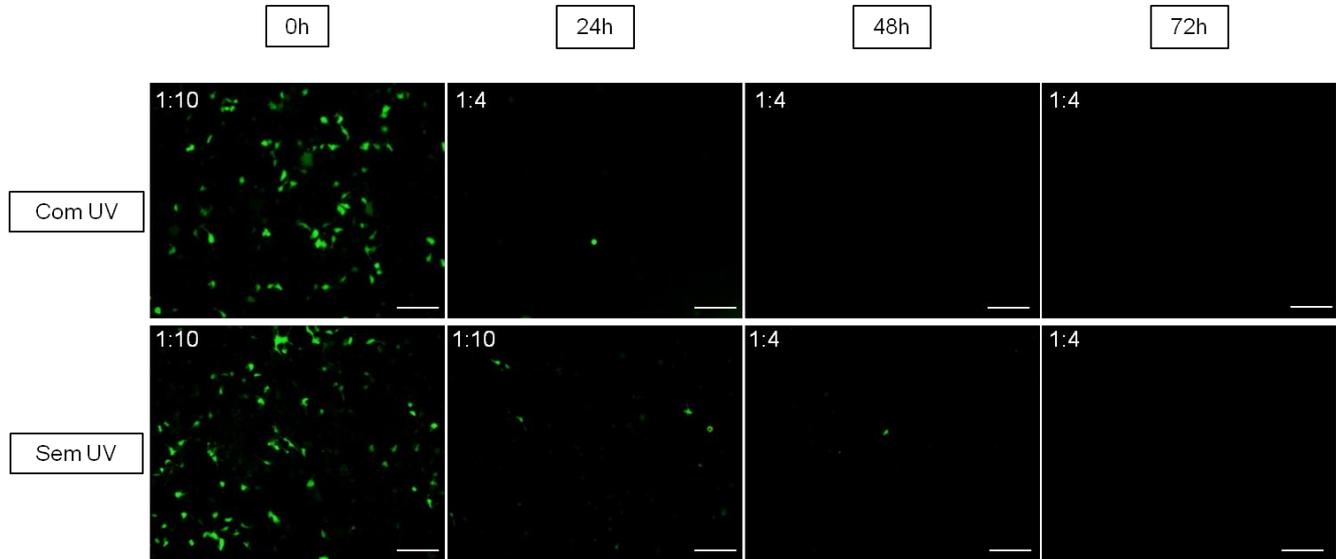


Figura 15. Imagens de microscopia de fluorescência de células infectadas por rAdV-GFP no tempo inicial (0 h) e após 24 h, 48 h e 72 h de depuração em tanques com e sem tratamento com luz UV. Os números (1:10 e 1:4) representam as diluições utilizadas. Aumento de 100x. Barras representam 200 μm .

Para o rAdV-GFP, a análise estatística (ANOVA mista) mostrou que independentemente do tratamento aplicado, o decaimento viral no decorrer do tempo foi significativo. Da mesma forma, independentemente do tempo decorrido, o tratamento aplicado reduziu a quantidade de vírus de modo significativo. Além disso, existe uma interação entre o tempo decorrido e o tratamento aplicado, de tal forma que o tratamento com UV e um tempo maior de depuração apresenta uma melhor inativação de adenovírus. Para o MNV-1, a mesma análise mostrou que apenas o efeito do tempo foi significativo, não havendo interação entre o tempo e o tratamento.

As amostras de controle do método de concentração foram sempre positivas e apresentaram uma recuperação média de 31 % ($\pm 8,5$) para rAdV-GFP e 33 % ($\pm 13,4$) para MNV-1. Assim, a eficiência da concentração viral foi superior ao ensaio realizado anteriormente, devido ao ajuste do pH certificado pelo medidor digital.

6.7. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE VIRAL NA ÁGUA DO MAR

Devido ao decaimento dos vírus após 24 h no tanque de depuração sem tratamento de luz UV (2 logs para rAdV-GFP e >6 logs para MNV-1), decidiu-se verificar a estabilidade desses vírus na água do mar. Para isso, 10 L de água do mar foram mantidos em baldes sob agitação na mesma temperatura dos tanques. Os vírus foram inoculados na água em concentração final similar à obtida nos tanques de depuração. Foi realizada amostragem de 1 L no tempo inicial (0 h) e após 24 h, realizada a concentração e avaliação da viabilidade viral por microscopia de fluorescência (rAdV-GFP) e por placa de lise (MNV-1).

A Tabela 4 apresenta a média do decaimento viral em logs e o desvio padrão da triplicata. Após 24 h sob agitação na água do mar, o decaimento médio de rAdV-GFP foi de 0,37 logs. O MNV-1 teve uma redução média de 1,12 logs. Apesar dos vírus apresentarem certa instabilidade na água do mar, esse decaimento não foi significativo ($p > 0,05$).

Tabela 4. Média e desvio padrão do decaimento em logs de rAdV-GFP e MNV-1 após 24 h sob agitação em balde com água do mar.

| Vírus | Logs de decaimento (DP) |
|----------|-------------------------|
| rAdV-GFP | 0,37 (0,09) |
| MNV-1 | 1,12 (0,12) |

7. DISCUSSÃO

A pesquisa de vírus entéricos humanos no ambiente tem crescido consideravelmente nos últimos anos, principalmente com o avanço das técnicas moleculares (REYNOLDS, MENA, GERBA, 2008). Porém, a detecção de material genético não revela o real risco de contaminação, uma vez que os vírus podem estar inativados. Assim, a aplicação de técnicas que são precedidas pela infecção celular *in vitro*, quando possível, são muito importantes para avaliar o potencial infeccioso dos vírus entéricos (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2012; BAERT, DEBEVERE, UYTENDAELE, 2009; BOSCH et al., 2008). Para isso, alguns modelos virais têm sido utilizados, sobretudo nos estudos de desinfecção e estabilidade em diferentes matrizes, como o adenovírus humano e o norovírus murino. O rAdV-GFP foi proposto neste trabalho como um modelo de adenovírus, sendo sua detecção, por técnicas baseadas na emissão de fluorescência, rápida e eficiente.

O adenovírus recombinante utilizado nesse trabalho, durante a sua modificação genética, teve o gene de expressão precoce denominado E1 substituído pelo gene codificador da proteína verde fluorescente (GFP). Esse adenovírus foi desenvolvido para ser utilizado em estudos de terapia gênica e como vetores de vacinas, uma vez que podem infectar diversas linhagens celulares sem se replicar (KOZARSKY, WILSON, 1993). O adenovírus replica facilmente *in vitro* produzindo altos títulos virais, é bem caracterizado, pode acomodar inserções genéticas de até 37 kb e o seu genoma permanece episossomal, raramente integrando-se ao genoma das células hospedeiras. (DANTHINNE, IMPERIALE, 2000). Quando utilizados como vetores vacinais, são capazes de induzir potente resposta imune inata e específica (TATSIS, ERTL, 2004). Assim, o presente trabalho propôs uma nova aplicação para o rAdV-GFP, no campo da virologia ambiental, como um modelo viral a ser utilizado em estudos de desinfecção e estabilidade de vírus entéricos.

Diferentes técnicas de cultura celular podem ser utilizadas para a detecção de adenovírus viáveis. O ensaio de placa de lise é um método sensível, bem estabelecido e frequentemente empregado. Porém esse ensaio é laborioso e leva cerca de sete dias para visualização das placas (CROMEANS et al., 2008; GUERET et al., 2002; HITT et al., 2000). Técnicas tradicionais baseadas em imunofluorescência são mais rápidas e específicas, no entanto demandam pré-tratamentos, padronizações, bloqueios de reações inespecíficas e o emprego de anticorpos específicos, introduzindo variáveis que interferem com a eficiência e

reprodutibilidade do ensaio (GUERET et al., 2002). A presença do gene E1 em células permissivas (HEK293) que possuem esse gene integrado em seu genoma permite a replicação do adenovírus recombinante e consequente expressão da proteína GFP, sendo possível acompanhar a infecção viral. Dessa forma, é possível detectar células infectadas pelo rAdV-GFP por técnicas de fluorescência, como a microscopia de fluorescência e a citometria de fluxo (GUERET et al., 2002; HITT et al., 2000). Essas técnicas baseadas na detecção de GFP são mais sensíveis do que as de imunofluorescência que exigem o emprego de anticorpos específicos para a região hexon de adenovírus (LI, HE, JIANG, 2010).

Com a proposta de estabelecer o tempo ideal de pós-infecção (p.i.) de adenovírus recombinante em células HEK293A, nas quais é possível detectar a expressão da GFP, foi realizada a cinética da detecção de fluorescência com leitura em espectrofotômetro com células infectadas em diferentes MOIs do vírus. Os MOIs de 10 e 1 mostraram que houve um aumento significativo na detecção da fluorescência entre 18h e 20h (Figura 9). A grande variação na fluorescência nas células infectadas 40h p.i., quando o MOI de 10 foi utilizado, foi devido à grande quantidade de células que foram lisadas devido à alta taxa de replicação viral e por isso não puderam ser contabilizadas por fluorescência. A partir do resultado obtido na cinética de emissão de fluorescência e sabendo que um ciclo de replicação do adenovírus leva entre 24h e 36h (WOLD, HORWITZ, 2007), o período p.i. de 24h foi escolhido para os ensaios posteriores de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. Assim, além de ser possível detectar e visualizar células infectadas, garante-se apenas um único ciclo de replicação, uma vez que replicações subsequentes podem superestimar o título viral determinado por essas técnicas. De Martin et al. (1997) também realizaram uma cinética da expressão de GFP por meio de Western blotting, utilizando um anticorpo policlonal anti-GFP, detectando a proteína após um dia de infecção. Trabalhos que realizaram a titulação de rAdV-GFP por citometria de fluxo utilizaram o período de pós-infecção entre 18h e 24h, sendo possível contabilizar células infectadas fluorescentes (GUERET et al., 2002; HITT et al., 2000; WEAVER, KADAN, 2000).

No presente estudo, 24h p.i. foi possível realizar a detecção de células infectadas por rAdV-GFP por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência, obtendo título viral de $1,4 \times 10^9$ UVF/mL e $8,5 \times 10^7$ UFF/mL, respectivamente. No entanto a citometria de fluxo apresentou baixa sensibilidade e alto limite de detecção, sendo possível

contabilizar células até a diluição 10^{-4} , equivalente a $2,1 \times 10^5$ UVF/mL. HITT et al. (2000) obtiveram resultado semelhante, com um título viral de $3,4 \times 10^9$, porém com um limite de detecção mais baixo, tendo detectado células infectadas na diluição 10^{-5} . A baixa sensibilidade da citometria de fluxo na detecção de células infectadas com rAdV-GFP 24h p.i. foi demonstrada também por Li, He e Jiang (2010). Esse estudo comparou o limite de detecção da citometria de fluxo em células infectadas com diferentes títulos virais (UFP/poço), com tempo de p.i. entre 1 e 5 dias. No primeiro dia de p.i., a fluorescência foi detectada somente a partir de 100 UFP/poço, o que corrobora aos dados obtidos no presente trabalho (400 UFP/poço). Li, He e Jiang (2010) mostraram que a sensibilidade da técnica aumenta proporcionalmente ao tempo de p.i., sendo que após 5 dias foi possível detectar até 0,1 UFP/poço. Portanto, é notável que quando o tempo de incubação é prolongado a sensibilidade do ensaio aumenta, embora este fato também superestime o título viral.

O título viral obtido por placa de lise (4×10^7 UFP/mL) foi inferior ao título por citometria de fluxo ($1,4 \times 10^9$ UVF/mL). Isso difere da literatura, que mostrou títulos virais semelhantes pelas duas técnicas aqui empregadas. No entanto, quando foi realizada uma análise de regressão, foi observada uma correlação linear entre os títulos virais obtidos através das duas técnicas em diferentes diluições (Figura 11), corroborando outros trabalhos publicados (LI, HE, JIANG, 2010; GUERET et al., 2002; HITT et al., 2000; WEAVER, KADAN, 2000).

A microscopia de fluorescência apresentou maior sensibilidade e baixo limite de detecção, podendo detectar células fluorescentes até a diluição 10^{-6} , referente a $8,5 \times 10^1$ UFF/mL, em apenas 24 h pós-infecção. Ao contrário da citometria de fluxo, esses valores foram semelhantes ao ensaio de placa de lise, no qual também foi possível detectar placas de lise até a diluição 10^{-6} . No entanto, a microscopia de fluorescência fornece resultados em 24 h, enquanto o ensaio de placa de lise demora cerca de sete dias (CROMEANS et al., 2008; GUERET et al., 2002; HITT et al., 2000). A maior sensibilidade da microscopia de fluorescência com relação à citometria de fluxo também foi observada por Li, He e Jiang (2010), no qual em um dia era possível detectar por microscopia o equivalente 1 UFP/poço. Portanto, devido ao menor limite de detecção e tempo p.i., a microscopia de fluorescência foi escolhida para os demais ensaios.

O emprego do adenovírus recombinante em amostras ambientais ainda é raro na literatura. Li, Shi e Jiang (2010) compararam a eficiência de diferentes técnicas de concentração inoculando o rAdV-GFP em amostras de água do mar, água do mar tratada por membrana de osmose

reversa e efluente de esgoto e avaliou células infectadas por citometria de fluxo três dias após infecção. Este trabalho foi o primeiro que avaliou a influência da água do mar na detecção da fluorescência da GFP empregando técnicas de microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, não sendo encontrada diferença significativa entre o título do vírus em estoque e em água do mar (Figuras 12 e 13). Além disso, juntamente com o trabalho de dissertação da mestranda Mariana de Almeida do Nascimento, que avaliou a desinfecção de rAdV-GFP por cloro em água de consumo, esses são os primeiros trabalhos que utilizaram adenovírus recombinante para avaliarem desinfecção de amostras ambientais.

Portanto, o rAdV-GFP é um potencial modelo viral para estudos de desinfecção e estabilidade no campo da virologia ambiental, uma vez que não necessita de anticorpos para a detecção da fluorescência, tornando a técnica mais econômica e prática. Além disso, a não necessidade do emprego de anticorpos para sua detecção evita a perda de células durante as extensivas lavagens realizadas nos métodos convencionais e também diminui a formação de ligações inespecíficas. Comparando com o ensaio de placa de lise, a microscopia de fluorescência foi igualmente sensível, porém menos laboriosa detectando células infectadas (fluorescentes) em apenas 24 h.

A pesquisa de vírus viáveis em amostras ambientais por meio de técnicas que envolvem a detecção fluorescência não tem sido muito empregada. Apesar da alta especificidade e rapidez, geralmente as técnicas são laboriosas, caras e nem sempre apresentam resultados satisfatórios (HAMZA et al., 2011). Existem poucos trabalhos na literatura que utilizaram tais métodos para detectar vírus em água do mar. Carratalà et al., (2013) avaliaram o decaimento da viabilidade viral por tratamento com UV em diferentes matrizes de água, sendo a água do mar uma delas, por meio do ensaio de imunofluorescência. Li, He e Jiang (2010) não detectaram adenovírus em 12 amostras ambientais de água do mar por meio de citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-hexon. Pelo mesmo método, Corrêa et al. (2012b) não obtiveram resultados satisfatórios na detecção de adenovírus em água do mar em tanques de depuração de ostras, apresentando baixa sensibilidade.

O processo de depuração de ostras é bastante utilizado no mundo e obrigatório nos Estados Unidos e Europa com a finalidade de remover bactérias dos moluscos bivalves. Corrêa et al. (2007) analisaram o decaimento de *S. enterica* serovar Typhimurium em ostras depuradas por 24h em tanques de sistema fechado com capacidade de 1000 L de água, avaliando o tratamento com UV, cloro e ambos juntos. Como

resultado, a partir de 12 h de depuração não havia *S. enterica* viável no tecido das ostras, porém foi possível detectar cópias genômicas mesmo após 24 h de depuração. Além disso, a combinação dos tratamentos foi mais eficiente para inativação da bactéria, sendo que o UV isoladamente foi melhor do que apenas com cloro. Love, Lovelace e Sobsey (2010) também avaliaram o decaimento de *E. coli* e *E. fecalis* em ostras e mariscos em tanques de depuração de sistema contínuo com capacidade de 230 L, obtendo 99,9 % de remoção após 44 h de depuração. Como a legislação avalia a eficácia da depuração somente com base em bactérias como indicadoras de contaminação fecal, não se pode inferir que o mesmo processo seja eficiente para reduzir, a níveis aceitáveis, a quantidade de vírus entéricos humanos (LOVE, LOVELACE, SOBSEY, 2010).

Os estudos de depuração de moluscos que avaliam o decaimento de vírus entéricos apresentam diferentes resultados. Corrêa et al. (2012a) observaram em ostras a inativação de vírus da hepatite A (HAV) infeccioso após 72 h e ausência de cópias genômicas em 96 h, após tratamento com luz UV em sistema fechado. Love, Lovelace e Sobsey (2010) mostraram que 44 h de depuração em sistema contínuo foi suficiente para remoção de 98,5% de HAV em ostras, porém em mariscos apenas 46 % foram removidos no mesmo tempo. Polo et al. (2014), mostraram que HAV tinha um decaimento em mariscos de apenas 1 log (90 %) após cinco dias de depuração em sistema fechado com tratamento de UV. Adenovírus humanos são mais resistentes aos processos de depuração, sendo detectado o genoma viral em ostras mesmo após quatro dias de depuração em sistema fechado com luz UV (CORRÊA et al., 2012a). Souza et al. (2013) também detectaram genoma de adenovírus humano e norovírus murino em ostras depuradas após sete e quatro dias de tratamento com UV, respectivamente.

O processo de tratamento da água do mar é um fator importante para a garantia de uma depuração eficiente, principalmente nos sistemas de recirculação. A eficiência da inativação viral na água por UV é bem conhecida. O MNV-1 tem maior resistência ao tratamento por UV entre os Calicivirus utilizados como modelos virais para estudos de infecciosidade, necessitando de dose aproximada de 40 mJ/cm² para inativação de 4 logs (LEE, ZOH, KO, 2008). Com relação ao adenovírus, Hijnen, Beerendonk e Medema (2006) reuniram diversos estudos que avaliaram o decaimento de diferentes vírus em amostras ambientais de água, demonstrando que o adenovírus é o mais resistente à inativação por luz UV, necessitando de doses superiores a 170 mJ/cm² para redução de 99,99 % de vírus viáveis. Carratalà et al. (2013)

verificaram o decaimento de adenovírus humano em diversas matrizes de água, incluindo água do mar, observando um decaimento viral de mais de 6 logs em 24 h com aplicação de altas doses de UVB. A grande resistência dos adenovírus ao tratamento com luz UV pode ser influenciada pelo reparo do DNA viral pelas enzimas da célula hospedeira (LECHEVALLIER, AU, 2004). No entanto, além do UV agir na degradação do genoma e na formação de dímeros de timina, pode também causar danos nas proteínas do capsídeo viral, incapacitando-os de infectar células (WIGGINTON et al., 2012; SIRIKANCHANA, SHISLER, MARINÑAS, 2008).

Apesar da ação germicida da luz UV em águas ser bem conhecida, poucos estudos avaliaram a eficiência do tratamento para inativação viral de água do mar em tanques de depuração (CORRÊA et al., 2012a; 2012b). O presente trabalho mostrou que a viabilidade de adenovírus humano decaiu 99,99 % (4 logs) na água do mar após 24 h com tratamento de luz UV, em tanque de depuração de sistema fechado. Sem tratamento, a mesma taxa de decaimento foi obtida com 48h de circulação da água, sendo que 99 % (2 logs) foi inativado no primeiro dia (Tabela 1). Comparando a inativação de adenovírus nos dois tanques após 24h de depuração, pode-se afirmar que o tratamento com luz UV foi 100 vezes mais eficiente e capaz de reduzir por si só, pelo menos 99 % de rAdV-GFP. A viabilidade norovírus murino decaiu mais de 6logs após 24h de depuração, tanto no tanque com luz UV quanto no sem tratamento (Tabela 1). Em um estudo utilizando depuradoras iguais, Corrêa et al. (2012b) observaram que após 72 h houve um decaimento de 4 logs de cópias genômicas de adenovírus no tanque com UV e 1 log no tanque sem UV. O norovírus murino foi mais susceptível, sendo observado por PCR quantitativa que em 24 h houve uma redução de 2 logs no tanque sem tratamento e cerca de 4 logs com UV. Em outro estudo, com tanques de sistema fechado e tratamento com luz UV, Corrêa et al. (2012a) não detectaram cópias genômicas de HAV e adenovírus na água do mar após 96 h de depuração.

Embora a depuração seja um processo natural dos moluscos, a atividade fisiológica, a taxa de filtração e as respostas ao ambiente podem variar de acordo das mudanças do ambiente marinho. Os fatores associados que podem alterar significativamente o processo de depuração são a temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, turbidez e concentração de fitoplantons (RODRICK, SCHNEIDER, 2003). Além disso, a dose mínima de luz UV geralmente prescrita para a desinfecção de águas é dependente das características da instalação do sistema de tratamento, do tempo de exposição, da coeficiência de absorção de UV

pela água e da espécie de microrganismo estudada (HASSEN et al., 2000). A variação desses fatores entre os diversos estudos pode explicar a diferença nos resultados de depuração e desinfecção da água do mar.

Para investigar a influência da água salgada na estabilidade viral foi realizado um ensaio de inoculação de rAdV-GFP e MNV-1 em balde com água do mar e avaliada a viabilidade no tempo 0 h e após 24 h sob agitação. O rAdV-GFP permaneceu praticamente estável, enquanto o MNV-1 decaiu 1 log (Tabela 2). Portanto, apesar de ser um fator que pode influenciar na estabilidade viral, a salinidade não foi determinante para a inativação de rAdV-GFP e MNV-1 nos tanques de depuração. Em estudo semelhante, Corrêa et al. (2012b) demonstraram maior instabilidade do genoma do MNV-1 do que AdV em água do mar, porém a redução também não foi significativa em 24 h. Enriquez e Gerba (1995) observaram grande estabilidade de adenovírus em água do mar, com decaimento da viabilidade viral aproximado de 1,5 logs em 60 dias. Lee et al. (2008) mostraram que o MNV-1 possui instabilidade em solução salina, no qual em concentração de 0,5 M de NaCl (concentração similar a água do mar) a viabilidade viral decaiu cerca de 0,5 logs a cada 24 h, comparado com água destilada, que mostrou uma inativação de 0,5 logs em 72 h. Trabalhos sobre o efeito da salinidade da água na inativação de poliovírus mostraram que há um decaimento aproximado de 1 log a cada dois dias na água do mar, além de uma maior estabilidade viral em águas com menor salinidade (WETZ et al., 2004; LO, GILBERT, HETRICK, 1976; AKIN et al., 1976).

A adsorção dos vírus na parede dos tanques pode ter influência sobre decaimento viral observado, uma vez que a presença de sais na água do mar pode alterar o ponto isoelétrico dos vírus, permitindo que eles se agreguem e adsorvam em superfícies (WONG et al., 2012). Um estudo realizado com poliovírus inoculado em água subterrânea armazenada em um tanque de polipropileno mostrou que após 10 dias havia 20 vezes mais vírus na parede do tanque do que na água (GASSILLOUD, GANTZER, 2005). Apesar de factível, a constante circulação da água, a rápida inativação de MNV-1 (mais de 6 logs em 24 h) e a constante taxa de decaimento do rAdV-GFP (2 logs a cada 24 h no tanque sem UV) permitiu inferir que a adsorção nas paredes do tanque de depuração não foi um fator fundamental para a inativação viral. Acredita-se que ocorra algum dano físico nos vírus durante o processo de circulação da água, afetando assim a viabilidade dos mesmos.

O método de concentração de água do mar com leite desnatado acidificado está bem estabelecido e trabalhos relatam uma recuperação

média de cópias genômicas aproximada de 50 % para AdV e 80 % para MNV-1 (CALGUA et al., 2013a; 2013b; 2008). No presente trabalho, o primeiro ensaio apresentou recuperação de 11 %, porém com o decorrer do estudo a técnica foi aprimorada, certificando o ajuste do pH com medidor digital, alcançando cerca de 30 % de recuperação viral para rAdV-GFP e MNV-1. Os estudos que utilizam essa técnica de concentração avaliam a recuperação apenas por PCR quantitativa, enquanto o presente trabalho determinou a porcentagem de recuperação por ensaios que inferem a viabilidade viral, o que pode justificar a diferença existente.

Os adenovírus humanos podem ser cultivados e isolados usando diversas linhagens celulares incluindo BGMK, Caco-2, HeLa, HEp-2, KB, A549 PLC/PRF/5 e HEK293. No entanto, a eficiência da replicação do vírus em culturas de células varia de acordo com os sorotipos, assim como a susceptibilidade das linhagens celulares podem variar ligeiramente. A linhagem celular recomendada pela Agência Proteção Ambiental dos Estados Unidos para monitoramento da água é a BGMK. No entanto, tem sido um consenso de que HEK293, A549, PLC/PRF/5 e Caco-2 apresentam um melhor desempenho para avaliar infecciosidade de adenovírus (JIANG et al., 2009; JIANG, 2006). Em especial, as células HEK293 tendem a ser mais apropriadas para a avaliação ambiental de contaminação por adenovírus humano, inclusive para os sorotipos fastidiosos (40 e 41) (JIANG et al., 2009).

É importante ressaltar a importância de realizar o ensaio de viabilidade viral imediatamente após a concentração para evitar perda de vírus infecciosos durante o armazenamento. Recomenda-se armazenar amostras ambientais para análise virológica por no máximo 48 h a 4 °C ou a -80 °C por períodos mais longos (OLSON, AXLER, HICKS, 2004). No entanto, a formação de cristais de gelo é responsável pela perda inicial de títulos virais em amostras congeladas, sendo que é aumentada quando as amostras são estocadas a -20 °C. (GOULD, 1999). Assim, estudos que avaliam a viabilidade de vírus após armazenamento podem subestimar o título viral.

Em geral, a pesquisa de vírus em amostras ambientais, como água do mar e alimentos, é relevante, pois são importantes agentes causadores de surtos e não apresentam correlação com a presença de bactérias preconizadas na legislação. Além disso, a avaliação de risco de contaminação microbiológica deveria avaliar a infecciosidade viral por técnicas de cultura celular, quando existentes, ao invés de somente métodos moleculares. No que se refere à depuração, o processo é eficaz

para remoção de patógenos virais da água do mar, principalmente quando aplicado tratamento com luz UV.

8. SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

- A fluorescência da GFP em células HEK293A infectadas com adenovírus recombinante pode ser detectada com 24 h pós-infecção, representando o primeiro ciclo de replicação viral;

- Pela técnica de citometria de fluxo foi possível fazer a detecção de células infectadas com rAdV-GFP, exibindo um título viral mais alto que o obtido pelo ensaio de placa de lise, porém apresentou baixa sensibilidade e alto limite de detecção;

- A microscopia de fluorescência foi mais eficiente do que a citometria de fluxo para detecção de células infectadas com rAdV-GFP, apresentando título viral, sensibilidade e limite de detecção semelhantes ao ensaio de placa de lise, porém com tempo de pós-infecção menor;

- A detecção da fluorescência da GFP do rAdV-GFP não foi influenciada pela matriz de água do mar concentrada para ambas as técnicas;

- O processo de depuração foi eficiente para inativação dos vírus estudados na água do mar. 99,99 % de rAdV-GFP foram inativados em 24 h e 48 h com e sem tratamento de luz UV, respectivamente. O decaimento da viabilidade de MNV-1 foi superior a 6 logs em 24 h nos dois tanques.

- O rAdV-GFP e o MNV-1 permanecem estáveis após 24 h sob agitação em água do mar

9. CONCLUSÕES

- O rAdV-GFP se mostrou um eficaz modelo viral para estudos de estabilidade e desinfecção de adenovírus humanos, sendo de fácil cultivo e replicação, de baixo custo, permitindo a obtenção de resultados rápidos e com alta sensibilidade.

- O MNV-1 comprovou ser um competente modelo viral para estudos de desinfecção de norovírus humanos.

- A ação da luz UV por si foi capaz de inativar ao menos 2logs de adenovírus na água do mar, uma vez que essa foi a diferença entre os dois tanques após 24 h de depuração;

- A depuradora compacta de moluscos acoplada com luz UV foi eficiente na inativação dos vírus na água do mar, podendo ser utilizada com segurança pelos restaurantes e por pequenos produtores;

- A composição da matriz de água salgada não foi um fator determinante para o decaimento viral no tanque de depuração sem UV, uma vez que o rAdV-GFP e MNV-1 foram relativamente estáveis após 24h na água do mar;

- Acredita-se que durante o processo de depuração ocorram danos físicos nos vírus, impedindo-os de infectar as células.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Surtos de doenças pela ingestão de moluscos bivalves contaminados com vírus entéricos humanos tendem a ser mais frequentes devido à constante contaminação do ambiente marinho e o aumento na produção de moluscos no Brasil e no mundo. Apesar da legislação não incluir os vírus nos parâmetros sanitários, é de extrema importância o estudo desses organismos devido à diversidade de doenças que causam e à maior resistência às condições ambientais e aos processos de tratamento.

Portanto, o processo de depuração em sistema fechado com tratamento de luz UV se mostrou eficiente para a inativação de vírus em água do mar, podendo ser aplicados em restaurantes previamente ao consumo. Apesar de o processo ser eficaz para a descontaminação da água do mar, ainda há necessidade de estudos para confirmar que os moluscos contaminados alocados nesses mesmos tanques podem ser purificados, permanecendo livres de patógenos virais viáveis. Esses estudos estão em andamento no laboratório. Assim, espera-se que esses tanques possam ser alocados em restaurantes para garantir melhor qualidade no consumo de moluscos.

Além disso, os estudos que avaliam diferentes tratamentos para desinfecção e estabilidade de vírus em diversas matrizes ambientais precisam de modelos virais que permitam inferir a infecciosidade de maneira simples, rápida e sensível. O rAdV-GFP mostrou-se ser um eficaz modelo viral para futuros trabalhos, sendo possível detectar células infectadas pela técnica de microscopia de fluorescência em apenas 24h, com alta sensibilidade. Portanto, a utilização desse vírus pode substituir os adenovírus atualmente utilizados nos estudos de viabilidade e também o ensaio de placa de lise.

11. REFERÊNCIAS

- ABAD, F.X.; PINTÓ, R.M.; GAJARDO, R.; BOSCH, A. Viruses in mussels: public health implications and depuration. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 677-681, 1997.
- AKIN, E.W.; HILL, W.F.; CLINE, G.B; BENTON, W.H. the loss of poliovirus 1 infectivity in marine waters. **Water Research**, v. 10, p. 59-63, 1976.
- ALBINANA-GIMENEZ, N.; MIAGOSTOVICH, M.P.; CALGUA, B.; HUGUET, J.M.; MATIA, L.; GIRONES, R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. **Water Research**, v. 43, p. 2011-2019, 2009.
- ASHBOLT, N.J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v. 198, p. 229-238, 2004.
- BAERT, L.; DEBEVERE, J.; UYTTENDAELE, M. The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 83-94, 2009.
- BELLOU, M.; KOKKINOS, P.; VANTARAKIS, A. Shellfish-borne viral outbreaks: A systematic review. **Food and Environmental Virology**, v. 5, p. 13-23, 2013.
- BOFILL-MAS, S.; RUSIÑOL, M.; FERNANDEZ-CASSI, X.; CARRATALÀ, A.; HUNDESA, A.; GIRONES, R. Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. **BioMed Research International**, v. 1, s/ p., 2013.
- BOSCH, A.; ABAD, F.X.; PINTÓ M.R. Human pathogenic viruses in the marine environment. In: BELKIN, S.; COLWELL, R.R. (ed.) **Oceans and health: pathogens in the marine environment**. New York: Springer, 2005.
- BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTÓ, R.M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 295-301, 2008.

BOSCH, A.; LE GUYADER, S.F. Viruses in shellfish. **Food and Environmental Virology**, v. 2, p. 115-116, 2010.

CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; WYN-JONES, A.P.; LÓPEZ-PILA, J.M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **Journal of Virological Methods**, v. 153, p. 79-83, 2008.

CALGUA, B.; FUMIAN, T.; RUSIÑOL, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; MBAYED, V.A.; BOFILL-MAS, S.; MIAGOSTOVICH, M.; GIRONES, R. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. **Water Research**, v. 47, 2797-2810, 2013a.

CALGUA, B.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; HUNDESA, A.; SUÑEN, E.; CALVO, M.; BOFILL-MAS, S.; GIRONES, R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 187, p. 215-221, 2013b.

CANNON, J.L.; PAPAFRAGKOU, E.; PARK, G.W.; OSBORNE, J.; JAYKUS, L.A.; VINJÉ, J. Surrogates for the Study of Norovirus Stability and Inactivation in the Environment: A Comparison of Murine Norovirus and Feline Calicivirus. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2761-2765, 2006.

CARRATALÀ, A.; RUSIÑOL, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; GUERRERO-LATORRE, L.; SOMMER, R.; GIRONES, R. Environmental effectors on the inactivation of human adenoviruses in water. **Food and Environmental Virology**, s/v., s/p., 2013.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. 2011. Morbidity and Mortality Weekly Report: Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines, v. 60.

CORRÊA, A.A.; ALBARNAZ, J.D.; MORESCO, V.; POLI, C.R.; TEIXEIRA, A.L.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Marine Environmental Research**, v. 63, p. 479-489, 2007.

CORRÊA, A.A.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; KLEEMANN, C.R.; TEIXEIRA, A.L.; POLI, C.R.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. The

deuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated with hepatitis A virus and human adenovirus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 11-17, 2012a.

CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.S.; MORESCO, V.; KLEEMANN, C.R.; GARCIA, L.A.; BARARDI, C.R. Stability of human enteric viruses in seawater samples from mollusc deuration tanks coupled with ultraviolet irradiation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1554-1563, 2012b.

CROMEANS, T.L.; LU, X.; ERDMAN, D.D.; HUMPHREY, C.D.; HILL, V.R. Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41. **Journal of Virological Methods**, v. 151, p. 140-145, 2008.

DANTHINNE, X.; IMPERIALE, M.J. Production of first generation adenovirus vectors: a review. **Gene Therapy**, v. 7, p. 1707-1714, 2000.

DE MARTIN, R.; RAIDL, M.; HOFER, E.; BINDER, B.R. Adenovirus-mediated expression of green fluorescent protein. **Gene Therapy**, v. 4, p. 493-495, 1997.

ENRIQUEZ, C.E.; GERBA, C.P. Concentration of enteric adenovirus 40 from tap, sea and waste water. **Water Research**, v. 11, p. 2554 – 2560, 1995.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. 2012. Síntese informativa da maricultura 2011. Disponível em: <<http://www.epagri.sc.gov.br>>, acessado em 20 de dezembro de 2013.

ERSOY, Y.; OTLU, B.; TÜRKÇÜOĞLU, P.; YETKIN, F.; AKER, S.; KUZUCU, C. Outbreak of adenovirus serotype 8 conjunctivitis in preterm infants in a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, p. 144-149, 2012.

ESPOSITO, D.H.; GARDNER, T.J.; SCHNEIDER, E.; STOCKMAN, L.J.; TATE, J.E.; PANOZZO, C.A.; ROBBINS, C.L.; JENKERSON, S.A.; THOMAS, L.; WATSON, C.M.; CURNS, A.T.; ERDMAN, D.D.; LU, X.; CROMEANS, T.; WESTCOTT, M.; HUMPHRIES, C.; BALLANTYNE, J.; FISCHER, G.E.; McLAUGHLIN, J.B.; ARMSTRONG, G.; ANDERSON, L.J. An outbreak of pneumonia associated with emergent human adenovirus serotype 14 - Southeast Alaska, 2008. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, p. 214-222, 2010.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2011. Fisheries and aquaculture information and statistics service. Disponível em: <<http://www.fao.org>>, acessado em 20 de dezembro de 2013.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2008. Fisheries technical paper. Disponível em: <<http://www.fao.org>>, acessado em 20 de dezembro de 2013.

FLEMING, L.E.; BROAD, K.; CLEMENT, A.; DEWAILLY, E.; ELMIR, S.; KNAP, A.; POMPONI, S.A.; SMITH, S.; SOLO GABRIELE, H.; WALSH, P. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 545-560, 2006.

GASSILLOUD, B.; GANTZER, C. Adhesion-aggregation and inactivation of *poliovirus 1* in groundwater stored in a hydrophobic container. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 912-920, 2005.

GENSBERGER, E.T.; KOSTIĆ, T. Novel tools for environmental virology. **Current Opinion in Virology**, v. 3, p. 61-68, 2013.

GONZALEZ-HERNANDEZ, M.B.; CUNHA, J.B.; WOBUS, C.E. Plaque assay for murine norovirus. **Journal of Visualized Experiments**, v. 66, s/p. 2012.

GOULD, E.A. Methods for long-term virus preservation. **Molecular Biotechnology**, v. 13, p. 57-66, 1999.

GRAHAM, F.L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W.C.; NAIRN, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, p. 59-74, 1977.

GREEN, K.Y. Caliciviridae: the Noroviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 5 ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

GRIFFIN, D.W.; DONALDSON, K.A.; PAUL J.H.; ROSE J.B. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, p. 129-143, 2003.

GUERET, V.; NEGRETE-VIRGEN, J.A.; LYDDIATT, A.; AL-RUBEAI, M. Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of infected HEK293 cells. **Cytotechnology**, v. 38, p. 87-97, 2002.

HAMZA, I.A.; JURZIK, L.; ÜBERLA, K.; WILHELM, M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 424-436, 2011.

HASSEN, A.; MAHROUK, M.; OUZARI, H.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A.; DAMELINCOURT, J.J. UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 141-150, 2000.

HERNROTH, B.; ALLARD, A. The persistence of infectious adenovirus (type 35) in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 296-302, 2007.

HIJNEN, W.A.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. **Water Research**, v.40, p. 3-22, 2006.

HITT, D.C.; BOOTH, J.L.; DANDAPANI, V.; PENNINGTON, L.R.; GIMBLE, J.M.; METCALF, J. Flow cytometric protocol for titrating recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescent protein. **Molecular Biotechnology**, v. 14, p. 197-203, 2000.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012. Disponível em <<http://www.ictvonline.org>>, acessado em 24 de fevereiro de 2014.

JIANG, S.C. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 7132-7140, 2006.

JIANG, S.C.; HAN, J.; HE, J.W.; CHU, W. Evaluation of four cell lines for assay of infectious adenoviruses in water samples. **Journal of Water and Health**, v. 7, p. 650-656, 2009.

KAHLER, A.M.; CROMEANS, T.L.; ROBERTS, J.M.; HILL, V.R. Effects of source water quality on chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5159-5164, 2010.

KINGSLEY, D.H.; RICHARDS, G.P. Persistence of hepatitis A virus in oysters. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 331-334, 2003.

KOZARSKY, K.F.; WILSON, J.M. Gene therapy: adenovirus vectors. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 3, p. 499-503, 1993.

LA ROSA, G.; FRATINI, M.; della LIBERA, S.; IACONELLI, M.; MUSCILLO, M. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. **Annali dell'Istituto Superiori di Sanità**, v. 48, p. 397-406, 2012.

LANDRY, M.L.; LEBECK, M.G.; CAPUANO, A.W.; McCARTHY, T.; GRAY, G.C. Adenovirus type 3 outbreak in Connecticut associated with a novel variant. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1380-1384, 2009.

LE GUYADER, F.S.; LE SAUX, J.C.; AMBERT-BALAY, K.; KROL, J.; SERAIS, O.; PARNAUDEAU, S.; GIRAUDON, H.; DELMAS, G.; POMMEPUY, M.; POTHIER, P.; ATMAR, R.L. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a french oyster-related gastroenteritis outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 4011-4017, 2008.

LECHEVALLIER, M.W.; AU, K. **Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water**. London: IWA Publishing, 2004.

LEE, J.; ZOH, K.; KO, G. Inactivation and uv disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2111-2117, 2008.

LEES, D.; YOUNGER, A.; DORÉ, B. Depuration and relaying. In: Rees, G.; Pond, K.; Kay, D.; Bartram, J.; Santo Domingo, J. **Safe management of shellfish and harvest waters**. London: IWA Publishing, 2010.

LI, D.; HE, M.; JIANG, S.C. Detection of infectious adenoviruses in environmental waters by fluorescence-activated cell sorting assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 1442-1448, 2010.

LI, D.; SHI, H.C.; JIANG, S.C. Concentration of viruses from environmental waters using nanoalumina fiber filters. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 33-38, 2010.

LO, S.; GILBERT, J.; HETRICK, F. Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, p. 245-249, 1976.

LOVE, D.C.; LOVELACE, G.L.; SOBSEY, M.D. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, p. 211-217, 2010.

McCONNELL, M.J.; IMPERIALE, M.J. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. **Human Gene Therapy**, v. 15, p. 1022-1033, 2004.

MENA, K.D.; GERBA, C.P. Waterborne Adenovirus. In: WHITACRE, D.M. (ed), **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 198. New York: Springer Science, 2008.

MESQUITA, J.R.; VAZ, L.; CERQUEIRA, S.; CASTILHO, F.; SANTOS, R.; MONTEIRO, S.; MANSO, C.F.; ROMALDE, J.L.; NASCIMENTO, M.S. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. **Food Microbiology**, v. 28, p. 936-941, 2011.

MILLER, A.D. Human gene therapy comes of age. **Nature**, v. 357, p. 455-460, 1992.

MINISTÉRIO DA PESCA E AGRICULTURA. Gabinete do Ministro. Instrução normativa nº7, de 8 de maio de 2012. Institui o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), estabelece os procedimentos para a sua execução e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 mai. 2012, p.55-59.

MORESCO, V.; VIANCELLI, A.; NASCIMENTO, M.A.; SOUZA, D.S.; RAMOS, A.P.; GARCIA, L.A.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal Waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64,p. 40-48, 2012.

NADEAU, I.; KAMEN, A. Production of adenovirus vector for gene therapy. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 475-489, 2003.

NAPPIER, S.P.; GRACZYK, T.K.; SCHWAB, K.J. Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6825-6831, 2008.

OLSON, M.R.; AXLER, R.P.; HICKS, R.E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **Journal of Virological Methods**, v. 122, p. 147-152, 2004.

ONU – Organizações das Nações Unidas. 2008. Codex alimentarius comission. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org>>, acessado em 21 de dezembro de 2013.

PHUVASATE, S.; CHEN, M.H.; SU, Y.C. Reductions of *Vibrio parahaemolyticus* in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) depuration at various temperatures. **Food Microbiology**, v. 1, p. 51-56, 2012.

PIGEOT-RÉMY, S.; SIMONET, F.; ATLAN, D.; LAZZARONI, J.C.; GUILLARD, C. Bactericidal efficiency and mode of action: A comparative study of photochemistry and photocatalysis. **Water Research**, v. 46, p. 3208-3218, 2012.

POLO, D.; ALVAREZ, C.; VILARIÑO, M.L.; LONGA, A.; ROMALDE, J.L. Depuration kinetics of hepatitis A virus in clams. **Food Microbiology**, v. 39, 103-107, 2014.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 921-928, 2002.

PREDMORE., A.; LI, J. Enhanced removal of a human norovirus surrogate from fresh vegetables and fruits by a combination of surfactants and sanitizers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 4829-4838, 2011.

REYNOLDS, K.A; MENA, K.D.; GERBA, C.P. Risk of Waterborne Illness Via Drinking Water in the United States. In: WHITACRE, D.M. **Reviews of environmental contamination and toxicology**. New York: Springer, v.192, 2008.

RICHARDS, G.P.; MCLEOD, C.; LE GUYADER, F.S. Processing strategies to inactivate enteric viruses in shellfish. **Food and Environmental Virology**, v. 2, p. 183-193, 2010.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C.K.; CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.S.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1979-1987, 2010.

RODRICK, G. E., SCHNEIDER, K.R. Molluscan Shellfish Depuration. In: VILLABOA, A., REGUERA, B., ROMALDE, J., REIS, R. (ed). **Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety**, Santiago de Compostela, Spain, 2002, june 4-8, Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos de Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2003.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; COOK, N.; RUGGERI, F.M.; SELLWOOD, J.; NASSER, A.; NASCIMENTO, M.S.; D'AGOSTINO, M.; SANTOS, R.; SAIZ, J.C.; RZEŽUTKA, A.; BOSCH, A.; GIRONÉS, R.; CARDUCCI, A.; MUSCILLO, M.; KOVAČ, K.; DIEZ-VALCARCE, M.; VANTARAKIS, A.; von BONSDORFF, C.H.; de RODA HUSMAN, A.M.; HERNÁNDEZ, M.; van der POEL, W.H. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 786-814, 2012.

SHIMIZU, H.; PHAN, T.G.; NISHIMURA, S.; OKITSU, S.; MANEEKARN, N.; USHIJIMA, H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, p. 279-284, 2007.

SIRIKANCHANA, K.; SHISLER, J.L.; MARIÑAS, B.J. Effect of exposure to UV-C irradiation and monochloramine on adenovirus serotype 2 early protein expression and DNA replication. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3774-3782, 2008.

SOUZA, D.S.; PIAZZA, R.S.; PILOTTO, M.R.; NASCIMENTO, M.A.; MORESCO, V.; TANIGUCHI, S.; LEAL, D.A.; SCHMIDT, Éd; CARGIN-FERREIRA, E.; BÍCEGO, M.C.; SASAKI, S.T.; MONTONE, R.C.; ARAUJO, R.A.; FRANCO, R.M.; BOUZON, Z.L.; BAINY, A.C.; BARARDI, C.R. Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 337-345, 2013.

SUFFREDINI, E.; MAGNABOSCO, C.; CIVETTINI, M.; ROSSETTI, E.; ARCANGELI, G.; CROCI, L. Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 686-692, 2012.

TATSIS, N.; ERTL, H.C. Adenoviruses as vaccine vectors. **Molecular Therapy**, v. 10, p. 616-629, 2004.

TERIO, V.; MARTELLA, V.; MOSCHIDOU, P.; Di PINTO, P.; TANTILLO, G.; BUONAVOGLIA, C. Norovirus in retail shellfish. **Food Microbiology**, v. 27, p. 29-32, 2010.

UMESHA, K.R.; BHAVANI, N.C.; VENUGOPAL, M.N.; KARUNASAGAR, I.; KROHNE, G.; KARUNASAGAR, I. Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 279-286, 2008.

WANG, J.; DENG, Z. Detection and forecasting of oyster norovirus outbreaks: Recent advances and future perspectives. **Marine Environmental Research**, v. 80, p. 62-69, 2012.

WEAVER, L.S.; KADAN, M.J. Evaluation of adenoviral vectors by flow cytometry. **Methods**, v. 21, p. 297-312, 2000.

WESTRELL, T.; DUSCH, V.; ETHELBERG, S.; HARRIS, J.; HJERTQVIST, M.; JOURDAN-DA SILVA, N.; KOLLER, A.; LENGLET, A.; LISBY, M.; VOLD, L. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. **Euro Surveillance**, v. 15, s/p., 2010.

WETZ, J.J.; LIPP, E.K.; GRIFFIN, D.W.; LUKASIK, J.; WAIT, D.; SOBSEY, M.D.; SCOTT, T.M.; ROSE, J.B. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 698-704, 2004.

WIGGINTON, K.R.; PECSON, B.M.; SIGSTAM, T.; BOSSHARD, F.; KOHN, T. Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 12069-12078, 2012.

WOLD, W.S.M.; HORWITZ, M.S. Adenoviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**, 5 ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

WONG, K.; MUKHERJEE, B.; KAHLER, A.M.; ZEPP, R.; MOLINA, M. Influence of inorganic ions on aggregation and adsorption behaviors of human adenovirus. **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 11145-11153, 2012.

APÊNDICE A – Artigo referente a padronização do uso de rAdV-GFP, submetido ao Virology Journal

Recombinant Adenovirus as surrogate for persistence and disinfection studies of adenovirus in water matrices

Mariana A Nascimento*, Lucas AT Garcia*, Célia RM Barardi[§]

Laboratório de Virologia Aplicada, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

*These authors contributed equally to this work

[§]Corresponding author

Email addresses:

MAN: mari_aln@hotmail.com

LATG: lucasabu@gmail.com

CRMB: celia.barardi@ufsc.br

Abstract**Background**

Water quality has been affected by the presence of pathogenic microorganisms, mainly enteric viruses. Based on that, it is important to choose a viral model to study persistence in environment as well efficiency of disinfection processes. Human adenoviruses (HAdVs) is an important pathogen that can be transmitted by water consumption and may be chosen as indicator of fecal contamination. Recombinant human adenovirus (rAdV) that express green fluorescent protein (GFP) can be used as surrogate for studies of human and animal adenoviruses persistence and decontamination in environmental samples. HEK 293A cells infected with rAdV provides a novel reporter for assays of viral infectivity, allowing the use of flow cytometry and fluorescence microscopy as rapid and quantitative methods to monitor GFP expression in individual cells. The aim of this study was to determine methods based on GFP-fluorescence able to detect recombinant adenovirus in environmental matrices.

Methods

Kinetics of rAdV GFP-expression was measured by UV-spectrophotometer. Virus titer was determined by flow cytometry (FC) and fluorescence microscopy (FM). Drinking water and filtered seawater sample were collected and the detection limit of FC and FM using water samples and virus stock performed. Plaque Assay (PA) was done in order to compare with FC and FM.

Results

Kinetics of rAdV GFP-expression was determined and it was shown that GFP fluorescence could be early measured by UV-spectrophotometer, flow cytometry (FC) or by fluorescence microscopy (FM) during the first cycle of viral replication (24h post-infection). Virus titer was determined by FC and FM and was 1.4×10^9 GFU/mL and 8.5×10^7 FFU/mL respectively. FC was able to detect GFP expression until 10^{-4} virus dilution while FM could detect until 10^{-6} dilution. Plaque assay (PA) showed similar results than FM, however taking 7 days to read the plaques. Drinking water and seawater were spiked with rAdV and these matrices did not interfere with fluorescence measurement.

Conclusion

rAdV can be feasible and rapidly detected by flow cytometry and fluorescence microscopy including in environmental matrices. rAdV can be used as an excellent model for study on persistence in environment as well efficiency of disinfection process.

Keywords

Recombinant adenovirus, environmental matrices, UV-spectrophotometer, flow cytometry, fluorescence microscopy.

Background

Water quality has been affected by the presence of pathogenic microorganisms originated from incorrect disposal of treated, partially treated or untreated sewage in watercourses. Constituting the group of pathogenic microorganisms present in environmental water are the enteric viruses, the main causal agent of gastroenteritis worldwide [1]. They are excreted in high concentrations in feces and are less efficiently removed by primary treatment of drinking water (coagulation and filtration) than other pathogens (bacteria and protozoa) [2, 3]. According to Fong et al. [4], there are hundreds of different types of human viruses present in human sewage, which, if improperly treated, can become a source of contamination in drinking and recreational water.

Based on that, it is important to choose a viral model to study persistence in environment as well efficiency of disinfection processes, such as chlorine, ozone and UV-treatment. Human adenoviruses (HAdVs) is on the USEPA (United States Environmental Protection Agency) Contaminant Candidate List (CCL) as they are important human pathogens that can be transmitted by water consumption and spray (aerosols) [5]. Also, several studies have proposed HAdV as indicator of human fecal contamination [6-10]. HAdVs are nonenveloped and icosahedral viruses containing linear double-stranded DNA. They are included in Adenoviridae family, Mastadenovirus genera and there are 52 serotypes organized in subgroups A-G. Disease symptoms from adenovirus infection in humans include respiratory illness, gastroenteritis, and conjunctivitis [11].

As an alternative, recombinant adenoviruses (rAdV) can be used as a viral model to study persistence and disinfection efficiency of different treatments. rAdV are defective in their replication since they lack the early gene E1. Early gene products, such as E1, are generally involved in viral gene transcription, DNA replication, host immune suppression and inhibition of host cell apoptosis [12]. Thus, rAdV replication is weakened in this condition, unless the replication occurs in permissive cell lines that express E1 gene products, such as Human Embryonic Kidney (HEK) 293A cells [13]. So, rAdV replication can be directly monitored by fluorescent methods based on green fluorescence protein (GFP) expression encoded by a gene incorporated into the viral DNA. The plaque assay has long been considered as a standard method because of the inherent accuracy and reproducibility, but it is extensively time consuming [14]. HEK 293A cells infected with rAdV provides a novel reporter for assays of viral infectivity, allowing the use of flow cytometry and fluorescence microscopy as rapid and quantitative methods to monitor GFP expression in individual cells [15].

The aim of this study, was to standardized methods based on GFP-fluorescence, such as UV-spectrophotometer, flow cytometry and fluorescence microscopy assays were in order to detect rAdV in environmental matrices. Detection limits and water matrices interference on fluorescence measurements were also determined.

Results

Kinetics of GFP expression

The kinetics of GFP-expression is shown in Figure 1. The onset of cytopathic effect at MOI 10, 1.0 and 0.5 was observed 20 h p.i. After 40 h p.i. there was no attached cells at MOI 10, and at MOI 1.0 and 0.5, 100% of cytopathic effect was observed. The statistical analysis showed that, at MOI 10 and 1.0, there was a significant increase of fluorescence between 18 and 20h p.i. ($P < 0.05$). Thus, the 24h p.i. period was chosen to perform flow cytometry and fluorescence microscopy assays, ensuring the achievement of the fluorescence peak for detection as well the first cycle of viral replication.

Detection limits

This study aimed to determine the rAdV limit of detection by flow cytometry assay and fluorescence microscopy when compared with plaque assay. The use of the same virus stock and dilutions for both techniques was important to allow a direct comparison among the techniques. The 24h p.i. period was used for flow cytometry and microscopy assays in accordance to kinetics GFP-expression results. In order to compare, plaque assay showed virus stock titer of 4.0×10^7 PFU/mL and the limit detection was 10^6 dilution.

(i) Flow cytometry assay

The detection limit of the virus stock by FC was 10^{-4} dilution, corresponding to 2.15×10^5 GFU/mL. No statistically significant differences were found between virus stock and virus diluted in drinking water and flocculated seawater ($P > 0.05$). The titer of the viral working solution was 1.43×10^9 GFU/mL.

Seawater inoculated with rAdV before flocculation had 1 log less virus, representing 10% of viable rAdV recovery (Figure 2).

Regression analysis showed that the correlation was linear, with an r^2 value of 0.9856, by plotting the normalized values in log₁₀ of rAdV inoculated in decimal dilutions ranging from 4.0×10^2 to 4.0×10^7 PFU/mL versus the viral titer by flow cytometry assay obtained at each dilution (Figure 3).

(ii) Fluorescence microscopy assay

The detection limit of the virus stock by FM was 10^{-6} dilution, corresponding to 8.5×10^1 FFU/mL (Figure 4). No statistically significant differences were found between virus stock and virus diluted in drinking water and concentrated seawater ($P > 0.05$). The titer of the viral working solution was 8.5×10^7 FFU/mL. Viable adenovirus recovery was approximately 10%, once that seawater inoculated with rAdV before flocculation had 1 log less virus.

Discussion

Recombinant adenovirus provides a versatile system for gene expression studies and therapeutic applications, including gene transfer *in vitro*, gene therapy and vaccine therapy [16,17,18]. The possibility to transfer genes to a broad spectrum of cell types not depending on active cell division, as well the high-titer preparations of adenoviruses can be readily prepared and used to achieve a high

level of transgene expression, made adenovirus the vectors of choice for these applications [16-20]. Although this well-established use, we describe herein a novel application of rAdV in environmental virology field. The current study shows methods standardized to detect rAdV in environmental matrices, such as drinking water and seawater, whereas those water matrices come into frequent contact with the majority population, representing an important vehicle of disease transmission.

Regarding the kinetics of GFP expression assay, at MOI 10 and 1.0 all cells were killed by the virus after 40h p.i., which explains the wide variation of relative fluorescence after this period. The 24h p.i. period was chosen to perform the subsequent assays, ensuring the optimal fluorescence emission for detection, but mainly ensuring the first cycle of viral replication. It is already described that HAdV replication cycle is completed after 24 to 36 h in HeLa cells [11], although viral replication can vary from cell to cell. This is important to not allow longer periods for viral replication which could overestimate the real viral titer, where at the end of one cycle, about 10^4 viral progeny particles per cell could have been produced [21].

Fluorescence microscopy can be equally compared with plaque assay, since their detection limit was the same (10^{-6} dilution), as well a similar viral titer (Figure 5). Nevertheless, the huge difference concerning the time of incubation (1 day for fluorescence microscopy versus 7 days for plaque assay) supports the choice for fluorescence microscopy assays.

A previous study [22] reported the use of flow cytometry for rAdV detection after 1 to 5 days of incubation. They report that after 3 days of incubation, fluorescent cells were detected at inoculation densities of 1 PFU/well, while in 1 day of incubation it was only possible to detect fluorescence above 100 PFU/well, also showed in this study (400 PFU/well). Therefore, it is remarkable that, when the incubation time is prolonged, the sensitivity of the assay increases but this fact masks the viral replication and the real viral titer. The viral titer by FC (1.43×10^9 GFU/mL) was higher than by FM (8.5×10^7 FFU/mL). Although, FM presented a lower detection limit, allowing seeing fluorescence in two decimal dilutions more than FC (10^{-6} and 10^{-4} , respectively) (Figure 5). The high detection limit of FC after 24h p.i. was already previously showed [22].

To our knowledge, this is the first study that uses rAdV as virus model for environmental samples. The use of this viral model is economical and practical since this detection does not require the use of antibodies obligatorily requested by detection using immunofluorescence microscopy and traditional flow cytometry. In addition, detection of fluorescence by flow cytometry with rAdV was higher when compared with immunological use of anti-hexon or anti-E1A antibodies [22]. Also, the use of rAdV decrease chances of unspecific binds and loss of cells during extensively washes. Furthermore, FM and FC is faster (1 day) than conventional methods like plaque assay (7-10 days) [15].

The seawater concentration method had approximately 10% of viable rAdV recovery. Others studies show a recovery of 40-50% [8, 23, 24] in river and

seawater, however it was available genome copies by quantitative PCR, that not infer in virus viability, as accessed in this study.

Conclusions

In conclusion, we demonstrated that FC and FM has proven to be feasible, reliable, not time-consuming and not expensive to detect viable recombinant adenovirus in environmental matrices. Drinking water and seawater did not interfere on fluorescence detection, allowing using these matrices samples and rAdV for further study on persistence in environment as well efficiency of disinfection process.

Methods

Virus and cell line

Recombinant adenovirus (rAdV) was propagated in Human Embryonic Kidney 293A cells (HEK 293A). Both, virus and cell line was kindly donate by Dr. Oscar Brunã-Romero from Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil. HEK 293A were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1X), supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% of HEPES. Virus stock was produced by host cell infection using multiplicity of infection (MOI) of 5. After 24h incubation, the flasks were freeze-thawed three times, centrifuged at $2,500 \times g$ for 5 min and the supernatant recovered and stored at -80°C .

Environmental samples

Drinking water sample was obtained from the Water Treatment Plant located at Peri Lagoon, Florianópolis, Brazil, after regular treatment and just prior to chemical disinfection. This water matrix was used without concentration methods.

Filtered seawater sample came from Barra da Lagoa beach, Florianópolis, Brazil, and concentrated by skimmed milk flocculation as previously described to 10 mL final volume [8]. To analyze the seawater matrix influence and the viral recovery after flocculation, two flasks containing 10 L of filtered seawater were inoculated with rAdV before and after the flocculation process respectively. These concentrated samples were analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy assays.

Cytotoxicity assay

To evaluate the cytotoxicity of the drinking water and the flocculated seawater on HEK 293A cells, the confluent monolayers were inoculated with 100 μL of two fold dilutions of each water matrix. Cells were incubated for 60 min at 37°C in 5% of CO_2 and, after incubation, 650 μL of maintenance medium was added (DMEM 1X, containing 2% FBS, 1% HEPES, 1% PSA [10 U/mL penicillin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 2ng/mL amphotericin]). After 48 h the cells

were stained with Amido Black (Naphthol Blue Black, Sigma), to check monolayer integrity.

Kinetics of GFP expression

This assay was performed in order to determine which period post-infection (p.i.) was more appropriated to detect GFP fluorescence, ensuring optimal fluorescence quality as well to determine the first cycle of viral replication. For this, HEK 293A confluent monolayers were incubated in 24-well plate for 24 h at 37°C in 5% CO₂. Growth medium was discarded and the monolayers were inoculated with 100 µL of distinct multiplicity of infection (MOI) of rAdV (0.01, 0.1, 0.5, 1, and 10) in triplicates. Cells were incubated for 60 min at 37°C in 5% of CO₂ and, after incubation 650 µL of fresh maintenance medium was added (DMEM 1X, 2% FSB, 1% HEPES, 1% PSA). Every 2h up to 60h p.i. the relative fluorescence was measured by UV-spectrophotometer (excitation/emission: 395/508nm) (Molecular Devices SpectraMax M2).

Flow cytometry assay (FC)

HEK 293A confluent monolayers were incubated in 24-well plate for 24 h at 37°C in 5% CO₂. Growth medium was discarded and 100 µL of decimal dilutions of virus stock and virus stock spiked in drinking water (without residual free chlorine) and concentrated seawater were inoculated in a non-cytotoxic dilution in triplicates. Cells were incubated for 60 min at 37°C in 5% of CO₂ and, after incubation, 650 µL of fresh maintenance medium was added (DMEM 1X, containing 2% FSB, 1% HEPES, 1% PSA). After 24 h p.i., the cells were harvested with trypsin, centrifuged at 2000 × g for 3 min, resuspended in 500 µL of PBS and EDTA 0.05 µM solution, and cell viability was counted at Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen™). Data from 50,000 events were measured by flow cytometry (BD Biosciences FACSCanto™ II) and were analyzed using the free software program Weasel (version 3.1). The results are shown in Green Fluorescence Unit per mL (GFU/mL).

Fluorescence Microscopy (FM)

The same procedure for cell infection described above was performed in 8-well chamber slides. After 24 h p.i., chambers were mounted in the presence of 50 µL of mounting solution (5% NaCl 5M, 40% PBS, 50% ethanol, 5% formaldehyde, 2.5% DBCO) on the coverslip. Cells were then observed under an epifluorescence microscopy with UV light (Olympus). The viral titer was determined by the following formula: (average green cells counted x reciprocal dilution)/ inoculum (mL). The results are shown in Focus Forming Unit per mL (FFU/mL).

Plaque assay (PA)

The plaque assay was performed for virus stock aiming to compare the results obtained by both fluorescence methods. The protocol was adapted from other

study [25]. Briefly, HEK 293A cells were incubated in 6-well plate for 24 h at 37°C in 5% CO₂, when confluent monolayers were achieved. Growth medium was discarded, 300 µL of decimal dilutions of virus stock was added in duplicate to the cell monolayer and the cells were incubated for 60 min at 37°C in 5% of CO₂. After this period, the inocula were removed and cell monolayers were overlaid with 0.6% Bacto-agar in high glucose DMEM 2X containing 4% FBS, 0.1 mM sodium pyruvate, 26 mM MgCl₂ and incubated at 37 °C for 7 days. After this period, the agar overlay was removed, cells were stained with 20% Gram's crystal violet and plaques were counted macroscopically once the stain was removed. The viral titer was determined by the following formula: (average plaque counted x reciprocal dilution)/ inoculum (mL). The results are shown in Plaque Forming Unit per mL (PFU/mL).

Statistical Analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 (USA). ANOVA test, Student's t test, regression and linear correlation were performed and all significant differences are quoted for $P < 0.05$.

Competing interests

No conflict of interest declared.

Authors' contributions

MAN, LATG and CRMB designed the research. MAN and LATG carried out the kinetic of GFP expression study, the detection limit of fluorescence microscopy and flow cytometry assays with virus stock. MAN carried out the collection of drinking water sample, the cytotoxicity assay and the detection limit of fluorescence microscopy and flow cytometry assays using drinking water sample, and performed the statistical analysis. LATG carried out the collection and concentration of seawater sample, the cytotoxicity assay and the detection limit of fluorescence microscopy and flow cytometry assays using seawater sample, as well the plaque assay with virus stock. CRMB conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Oscar Brunã-Romero from Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil, for kindly donate virus and cell line. We thank Ms. Carlos Guillermo Quiroz Carrillo for statistic assistance. Financial support for this research was provided by National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

APÊNDICE B – Trabalhos científicos publicados durante a realização do mestrado

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22 (2012) 225–230



Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Thaís Moreira Osório^a, Franco Delle Monache^b, Louise Domeneghini Chiaradia^c, Alessandra Mascarello^c, Taisa Regina Stumpf^c, Carlos Roberto Zanetti^d, Douglas Bardini Silveira^d, Célia Regina Monte Barardi^e, Elza de Fatima Albino Smânia^a, Aline Viancelli^e, Lucas Ariel Totaro Garcia^e, Rosendo Augusto Yunes^c, Ricardo José Nunes^c, Artur Smânia Jr.^{a,*}

Research in Veterinary Science 93 (2012) 1520–1524



Culturing and molecular methods to assess the infectivity of porcine circovirus from treated effluent of swine manure

A. Viancelli^a, L.A.T. Garcia^a, M. Schiochet^b, A. Kunz^b, R. Steinmetz^b, J.R. Ciacci-Zanella^b, P.A. Esteves^b, C.R.M. Barardi^{a,*}



Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

Stability of human enteric viruses in seawater samples from mollusc depuration tanks coupled with ultraviolet irradiation

A. de Abreu Corrêa, D.S.M. Souza, V. Moresco, C.R. Kleemann, L.A.T. Garcia and C.R.M. Barardi

Research in Veterinary Science 93 (2012) 538–543



Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems

A. Viancelli^a, L.A.T. Garcia^a, A. Kunz^b, R. Steinmetz^b, P.A. Esteves^b, C.R.M. Barardi^{a,*}

Marine Pollution Bulletin 64 (2012) 40–48



Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil

V. Moresco, A. Viancelli, M.A. Nascimento, D.S.M. Souza, A.P.D. Ramos, L.A.T. Garcia, C.M.O. Simões, C.R.M. Barardi *

Surveillance of human and swine adenovirus, human norovirus and swine circovirus in water samples in Santa Catarina, Brazil

L. A. T. Garcia, A. Viancelli, C. Rigotto, M. R. Pilotto, P. A. Esteves, A. Kunz and C. R. M. Barardi

Molecular and Cell Culture Methods: Viral Contamination in Environmental Samples Using Human Adenoviruses as Model

Gislaine Fongaro

Vanessa Moresco

Lucas Ariel Totaço Garcia

Elmahdy Mohamed Elmahdy

Doris Sobral Marques Souza

Mariana de Almeida do Nascimento

Mariana Rangel Pilotto

Célia Regina Monte Barardi

*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil.*