

Mariana Rangel Pilotto

**Aquisição, estabilidade e inativação de vírus entéricos em ostras
*Crassostrea gigas***

Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências, área de concentração Microbiologia e Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Célia Regina Monte Barardi

Florianópolis

2015

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

Pilotto, Mariana Rangel

Aquisição, estabilidade e inativação de vírus entéricos em
ostras *Crassostrea gigas* / Mariana Rangel Pilotto ;
orientadora, Célia Regina Monte Barardi - Florianópolis,
SC, 2015.

122 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. I. Barardi, Célia
Regina Monte. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.
III. Título.

“Aquisição, estabilidade e inativação de vírus entéricos em ostras *Crassostrea gigas*”

Por

Mariana Rangel Pilotto

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (006/BTC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

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

Banca examinadora:

Dr(a) Jônatas Santos Abrahão (ICB/UFMG)

Dr(a) Afonso Celso Bainy (BQA/CCB/UFSC)

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

Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2015.

Dedico esse trabalho à minha mãe e ao meu falecido pai.

AGRADECIMENTOS

Nessa jornada que passei para chegar até aqui, cruzei com pessoas maravilhosas com quem pude contar para me ajudar a finalizar esse trabalho, e a quem devo meus agradecimentos.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, professora Célia Barardi, por tudo que me ensinou nesses 5 anos de convivência. Graças a você, descobri aquilo que realmente gosto, e o encantamento que a nem-sempre-perfeita ciência me causa. Obrigada por ter sido uma companheira todos esses anos e por ter me estimulado a chegar até aqui.

Agradeço ao meu querido LVA por ter sido o melhor lugar do mundo para se trabalhar. Todos vocês são pessoas maravilhosas, e tornaram todos esses anos cheios de diversão e companheirismo. A parte mais difícil de tudo até agora será deixá-los. Agradeço a professora Cláudia Simões pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório. Em especial, agradeço aos meus amigos da “ambiental” Vanessa, Gis, Elisabet, Abu, Nat, Camila e Mahdy, por terem me ajudado a concluir esse exigente e longo trabalho. Sozinha eu não teria conseguido.

Também agradeço à todos os amigos do terceiro andar pelas risadas, reagentes, problemas e confusões compartilhados.

Agradeço aos membros da banca examinadora dessa dissertação, professores Jônatas Abrahão, Rafael da Rosa, Afonso Bains e Thaís Sincero. Os seus nomes foram escolhidos com carinho e sem dúvida alguma de que seriam uma banca examinadora super competente. Vocês são todos profissionais pelos quais tenho grande admiração e respeito. Muito obrigada por me auxiliarem na finalização dessa dissertação.

Às minhas queridas “divas” Iris, Roni, Danna, Mari, Adara, Biba por terem me acompanhado por todas as aulas. Tudo teria sido muito mais boring sem vocês!

À minha mãe Christina, por ter me apoiado e me fornecido condições para que eu chegasse até aqui, e por ser a mulher pela qual tenho mais admiração e respeito.

Ao meu namorado, meu Bobby, companheiro de todas as horas e que sempre segurou a barra nos muitos momentos de aflição e dúvida. Sem você, teria sido muito mais difícil chegar até aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação e a todos os professores da pós pelos ensinamentos dentro e fora da sala de aula.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos que me manteve durante todo o trabalho.

E à todos os amigos e familiares que de uma forma ou de outra colaboraram para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

Com a criação do Programa de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves pelo governo brasileiro em 2012, o processo de purificação de moluscos pelo método da depuração passou a ser exigido quando há a detecção de patógenos bacterianos nos animais. Entretanto, não é fornecida a forma ou eficácia desse método. Mais estáveis e prevalentes em amostras ambientais que bactérias, os vírus entéricos são comumente associados a surtos de gastroenterites relacionados ao consumo de moluscos contaminados. Porém, sua detecção em geral é baseada em métodos de detecção de genoma, sem relação com a infecciosidade viral. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar a aquisição de patógenos virais por ostras *Crassostrea gigas* artificialmente contaminadas, a estabilidade desses patógenos frente a condições controladas de temperaturas e a eficácia do processo de depuração na inativação desses micro-organismos. Foram utilizados como modelos virais o adenovírus humano tipo 2 (AdVH-2) e o norovírus murino tipo 1 (NVM-1) e metodologias de detecção de vírus infecciosos. O comportamento entre os dois modelos virais foi diferente no processo de bioacumulação artificial pelas ostras, com o AdVH-2 atingindo o ápice de concentração viral no tecido digestivo após 8h, e o NVM-1 após 24h. Os dois modelos virais se mostraram estáveis por até 96h em ostras resfriadas a 4°C, porém foram inativados em amostras de ostras cozidas "ao bafo" na temperatura de 100°C por até 6 min. A depuração se mostrou eficiente para a inativação do AdVH-2 utilizando a metodologia de placa de lise de detecção de vírus infecciosos, e o uso da lâmpada U.V. acelerou o processo. Após 24h de depuração com luz U.V., 2,92 log de redução foram encontrados (correspondendo a mais de 99% de inativação viral), não sendo mais detectado nenhum vírus infeccioso após esse período. E com 48h de depuração no tanque controle, 2,65 log de redução foram detectados. O uso de métodos de desinfecção (como a luz U.V.) em sistemas de depuração fechados é exigido pelas agências reguladoras internacionais, uma vez que a permanência de patógenos na água do tanque pode re-contaminar os animais, e o descarte irregular dessa água pode levar à contaminação ambiental. As análises da depuração do NVM não puderam ser concluídas, pois as amostras de ostras foram coletadas durante o período reprodutivo dos animais, e o estresse causado pela coleta e contaminação artificial levou os animais a desovarem e morrerem.

Dessa forma, novos experimentos serão conduzidos no inverno para complementar os dados do atual trabalho.

Palavras-chave: Ostras *Crassostrea gigas*, Adenovirus Humano, Norovirus Murino, Bioacumulação Viral, Estabilidade térmica, Depuração.

ABSTRACT

The process of shellfish purification through depuration started to be required by the Brazilian government with the establishment of the Hygienic Control Program of Bivalve mollusks in 2012, but recommendation on how it should be performed or on its efficiency has not been suggested. More stable and prevalent in environmental samples than bacteria, enteric viruses are generally related to gastroenteritis outbreaks associated with the consumption of contaminated oysters. However, virus detection methods are usually based on genome detection rather than infectious virus. Therefore, this work aimed at evaluating the accumulation of viral pathogens on oysters *Crassostrea gigas* artificially contaminated; the stability of these pathogens maintained in controlled conditions of temperature and the depuration efficiency in inactivating these microorganisms. Human adenovirus type 2 (ADVH-2) and the murine norovirus type 1 (NVM-1) were used, as well as detection methodologies of infectious viruses. The behavior of the two viruses were different in the oyster's artificial bioaccumulation process, with the AdvH-2 reaching its peak of viral concentration after 8h, and the NVM-1 in 24h. The two viruses were stable for 96 hours in oysters maintained under 4°C, but they were completely inactivated in steamed oyster samples cooked for up to 6 minutes in 100°C. The depuration process was efficient in inactivating the AdvH-2, evaluated by the plaque assay for infectious virus detection, and the U.V. light accelerated the process. After 24h of depuration with U.V. light, a reduction of 2,92 log was found (which represents an inactivation of more than 99% of the viruses), with no infectious virus being detected after this period. After 48h in the tank without U.V. light, a reduction of 2,65 log was found. The use of disinfection methodologies in closed depuration systems is required by international regulation agencies, once these pathogens can re-contaminate other animals, and the irregular discharge of the tank water can lead to environmental contamination. The NVM-1 depuration assays could not be concluded because the oysters samples were collected during the reproductive period of the animals, and the stress caused by the collection and artificial contamination lead the animals to spawn and die. Thereby, new experiments will be conducted in the winter to complete this work data.

Key-words: oysters *Crassostrea gigas*, human adenovirus, murine norovirus, viral bioaccumulation, stability, depuration.

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1. Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina entre os anos 1990 e 2013 em toneladas. Fonte: Epagri, 2014a.</p>	22
<p>Figura 2. Produção de ostras comercializadas em 2013, por município (t). Fonte: Epagri, 2014.</p>	23
<p>Figura 3. Esquema da anatomia interna de uma ostra. Adaptado de http://imgkid.com/. Acesso 15 de janeiro de 2015.</p>	24
<p>Figura 4. Adenovírus.....</p>	30
<p>Figura 5. Norovírus.</p>	33
<p>Figura 6. Representação dos dois tipos celulares utilizados, sendo A) Células A549 e B) células RAW 264.7. Imagens adaptadas do site do banco de células ATCC (www.atcc.org). Barra = 100 µm</p>	47
<p>Figura 7. Fotos ilustrativas de cavidades de um ensaio de placa de lise para o NVM-1 (A) e de um ensaio de placa de lise para o AdvH-2 (B). Fonte: própria autora.</p>	52
<p>Figura 8. Cozimento das ostras “ao bafo” no laboratório. Fonte: própria autora.....</p>	61
<p>Figura 9. Esquema do tanque de depuração utilizado neste trabalho. Adaptado de Souza (2014).</p>	63
<p>Figura 10. Recuperação da técnica de eluição-concentração em ostras artificialmente contaminadas e capacidade de recuperação de cada uma das técnicas de detecção utilizadas para cada vírus. Os resultados plotados no gráfico representam a média das três repetições realizadas. A) AdvH-2. B) NVM-1.</p>	67
<p>Figura 11. Equivalência entre cada uma das técnicas de detecção utilizadas para o AdvH-2 e o NVM-1.</p>	70

Figura 12. Comportamento temporal da bioacumulação dos vírus em ostras *Crassostrea gigas*. A) O AdvH-2 atingiu o seu pico de concentração viral após 8h e 12h de bioacumulação, e houve uma eliminação viral após esse período. B) Para o NVM-1, a concentração viral no interior dos tecidos das ostras foi aumentando com o tempo de bioacumulação, atingindo seu ápice após 24h de bioacumulação..... 72

Figura 13. Comportamento temporal da bioacumulação dos vírus AdvH-2 (A) e NVM-1 (B) em ostras *Crassostrea gigas*. 75

Figura 14. Resultado da estabilidade dos modelos virais AdvH-2 (A) e NVM-1 (B) em ostras estocadas a 4°C. 76

Figura 15. Decaimento de AdvH-2 em ostras submetidas ao processo de depuração analisados pela técnica de placa de lise. A lâmpada U.V. foi capaz de reduzir 2,92 logs de vírus infecciosos presentes nas ostras. No tanque sem U.V., foram necessárias 48h de depuração para inativar 2,65 logs. Após esses períodos, não houve mais detecção de vírus infecciosos no interior do tecido das ostras. 81

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Comparação dos três modelos de desinfecção em depuradoras de moluscos bivales mais utilizados.....	38
Quadro 2: Iniciadores e Sondas utilizados para a detecção de AdvH-2 e NVM-1.....	54
Tabela 1. Resultado da estabilidade viral em ostras cozidas “ao bafo”.	76

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

A549 Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano

AdVH-2 adenovírus humano tipo 2

CG cópias genômicas

cDNA DNA complementar

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA Ácido desoxirribonucléico

dNTP desoxirribonucleotídeos

EPAGRI Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

ICC-RT-qPCR Cultura Celular Integrada a Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real precedida de transcrição Reversa

L litro

mL mililitro

min minutos

mRNA RNA mensageiro

NVM-1 norovírus murino tipo 1

ORF Open Reading Frames

PNCMB Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves

RAW 264.7 macrófagos murinos

RNA ácido ribonucleico

Seg segundos

SFB soro fetal bovino

UFP unidade formadora de placa de lise

U.V. ultravioleta

W Watts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.2 <i>Legislação Brasileira</i>	26
1.3 <i>Patógenos Humanos Relacionados ao consumo de moluscos bivalves</i>	27
1.3.1 <i>Adenovírus</i>	28
1.3.2 <i>Norovírus</i>	31
1.4 <i>Purificação de moluscos bivalves</i>	36
1.5 <i>Detecção viral em amostras ambientais</i>	40
2 HIPÓTESE	43
3 OBJETIVO	43
3.1 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	43
4. METODOLOGIA	45
4.1 <i>Obtenção das amostras de ostras e preparo de extratos de glândula digestiva</i>	45
4.2 <i>Linhagens celulares e modelos virais</i>	46
4.2.1 <i>Produção dos estoques virais</i>	48
4.2.2 <i>Determinação do título infeccioso dos fluidos virais</i>	49
4.3 <i>Extração dos ácidos nucleicos</i>	49
4.4 <i>Ensaio de citotoxicidade de concentrados dos tecidos de ostras nas respectivas linhagens celulares</i>	50
4.5 <i>Ensaio de detecção de AdvH-2 e NVM-1</i>	50
4.5.1 <i>Ensaio de Formação de Placas de Lise para AdvH-2 e NVM-1</i> 50	
4.5.2 <i>ICC-RT-qPCR para AdvH-2</i>	53
4.5.3 <i>qPCR para NVM-1</i>	56

4.6	<i>Ensaio de bioacumulação, estabilidade, e depuração</i>	58
4.6.1	<i>Ensaio 1: Padronização do tempo ideal de bioacumulação viral nos tecidos das ostras</i>	58
4.6.2	<i>Ensaio 2: Análise da estabilidade de vírus em ostras estocadas a 4°C</i> 60	
4.6.3	<i>Ensaio 3: Análise da estabilidade de vírus em ostras cozidas “ao bafo”</i>	60
4.6.4	<i>Ensaio 4: Análise da inativação viral em ostras submetidas à depuração</i>	62
4.7	<i>Análises estatísticas</i>	64
5.	RESULTADOS	65
1.1.	<i>Determinação do título infeccioso das suspensões virais por placa de lise</i>	65
1.2.	<i>Recuperação da técnica de eluição de patógenos virais do tecido das ostras</i>	65
1.3.	<i>Citotoxicidade das amostras de tecido de ostras frente às linhagens celulares utilizadas</i>	68
1.4.	<i>Equivalência entre as técnicas de detecção utilizadas nas amostras de tecido de ostras</i>	68
1.5.	<i>Ensaio de bioacumulação dos patógenos virais pelas ostras</i> ...	70
1.6.	<i>Ensaio de estabilidade viral em ostras resfriadas a 4°C</i>	76
1.7.	<i>Estabilidade dos vírus em ostras cozidas “ao bafo”</i>	78
1.8.	<i>Inativação viral pela técnica da depuração com luz U.V.</i>	80
2.	SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS	99
3.	CONCLUSÕES	101
4.	PERSPECTIVAS	103
5.	REFERÊNCIAS	105

11. ANEXOS: Trabalhos científicos publicados durante a realização do mestrado	119
11.1. Anexo 1	119
11.2. Anexo 2	120
11.3. Anexo 3	121

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), para alimentar o mundo até 2050, a geração de alimentos, seja oriunda de plantações, pecuária ou pesca, incluindo aquicultura, precisa aumentar cerca de 60% (FAO, 2014). Atingir essa meta é um enorme desafio para a comunidade internacional considerando que um número alarmante de pessoas ainda sofre com a fome e a pobreza (SUBASINGHE, 2014). Dessa forma, a busca por formas de aliviar a pobreza e aumentar a geração e a segurança alimentar é vital. Alimentos oriundos de recursos aquáticos desempenham um importante papel na cadeia de fornecimento de alimentos, promovendo uma ligação entre ecossistemas saudáveis, desenvolvimento econômico e bem-estar humano (SUBASINGHE, 2014).

A produção aquícola mundial cresceu mais de 60% nos últimos anos e fornece, atualmente, cerca de 50% de todo o pescado comercializado no mundo (FAO, 2011). A produção de moluscos, ou malacocultura, ocupa a segunda posição na porcentagem de grupos de espécies produzidas, perdendo somente para a produção de peixes (FAO, 2013).

No Brasil, o cultivo de ostras e mexilhões é a fração mais importante da malacocultura, sendo mais desenvolvida nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo e Santa Catarina, que é o maior produtor nacional (FERREIRA et al., 2006). A malacocultura surgiu em Santa Catarina no final da década de 80, após tentativas frustradas de cultivo da ostra nativa *Crassostrea rhizophorae*. Com a entrada no Brasil da ostra japonesa *Crassostrea gigas*, e seu sucesso de

cultivo em Cananéia (SP), a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) iniciou seu cultivo no estado em parceria com a EPAGRI (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) (FERREIRA & NETO, 2006).

A produção anual de moluscos no estado vem aumentando consideravelmente nas últimas duas décadas (Figura 1), e o volume de produção de moluscos em 2013 proporcionou uma movimentação financeira bruta estimada em R\$ 55.441.700,00 para o Estado, valor que vem sofrendo um aumento nos últimos anos, o que demonstra a importância dessa atividade na economia catarinense (EPAGRI, 2014a). O município que mais contribui para essa produção é Florianópolis (Figura 2), onde se destaca o cultivo de ostras da espécie *C. gigas* (EPAGRI, 2014a). *C. gigas* é a principal espécie de bivalve marinho cultivada e consumida no mundo, sendo também uma das mais estudadas (FAO, 2011).

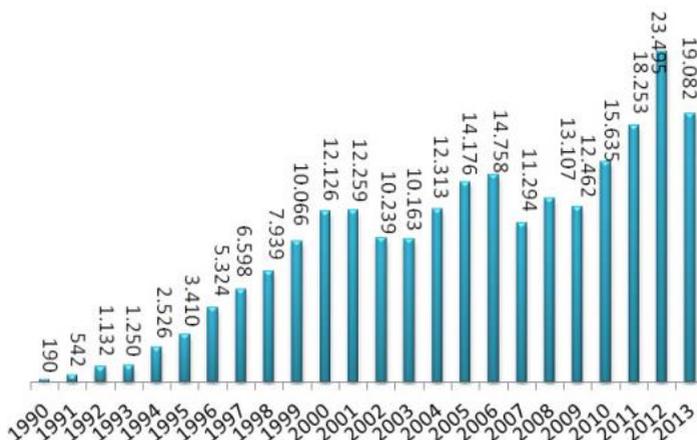


Figura 1. Evolução da produção de moluscos comercializados em Santa Catarina entre os anos 1990 e 2013 em toneladas. Fonte: Epagri, 2014a.

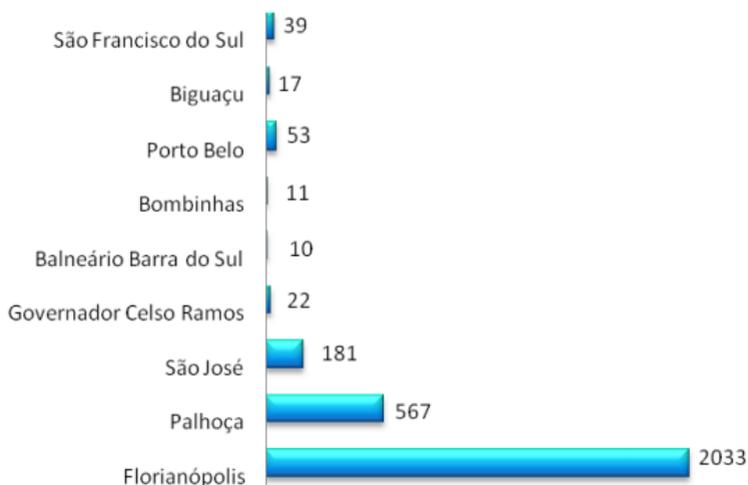


Figura 2. Produção de ostras comercializadas em 2013, por município (t). Fonte: Epagri, 2014.

Santa Catarina possui um litoral caracterizado por diversas baías e enseadas, o que confere excelentes condições para o cultivo de organismos marinhos (FERREIRA & NETO, 2006). Apesar disso, esses ambientes são ecossistemas muito sensíveis a modificações, pois são áreas semi-fechadas que podem receber uma forte pressão antrópica (VINATEA ARANA, 2000). A qualidade das águas dos locais de cultivo tem um impacto direto na qualidade dos moluscos ali cultivados (BOSCH; ABAD; PINTÓ, 2005; SOUZA et al., 2012).

1.1 Hábito alimentar das ostras

As ostras pertencem ao filo Mollusca, classe Bivalvia, Ordem Ostreoida e família Ostreidae. A figura 3 apresenta um esquema da anatomia interna de uma ostra. Seu corpo é protegido por duas conchas calcárias que se mantêm unidas por ligamento tipo dobradiça em uma das extremidades, e possui um músculo adutor responsável por ligar o corpo às conchas. Possuem brânquias bem desenvolvidas, responsáveis pela respiração e pela filtração de alimentos (FARIAS, 2008).

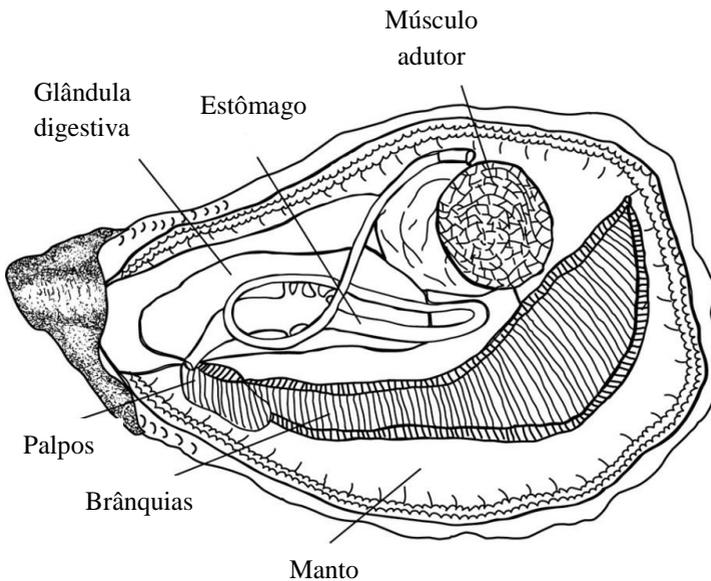


Figura 3. Esquema da anatomia interna de uma ostra.
Adaptado de <http://imgkid.com/>. Acesso 15 de janeiro de 2015.

O mecanismo de alimentação das ostras é um processo de separação ativa, onde partículas orgânicas de diferentes tamanhos são ingeridas, e o que não serve de alimento, rejeitado. As partículas são retiradas da água pelo processo de filtração, selecionadas nos palpos labiais e absorvidas no estômago. As partículas rejeitadas são envoltas em muco e eliminadas como pseudofeces (BEECHAM, 2008).

Em média, uma única ostra é capaz de filtrar 10 L de água por hora (PEREIRA et al., 2006). Servem de alimento ao animal partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos (WARD, 1996).

As ostras, por serem animais filtradores, podem filtrar e acumular em seus tecidos eventuais patógenos humanos e outros contaminantes presentes nas águas onde são cultivadas (CARTER, 2005). Com o aumento da população próximo aos locais de cultivo, como é o caso de Florianópolis, e o conseqüente aumento do descarte de esgoto não tratado ou ineficientemente tratado nas águas litorâneas, tem crescido a detecção de patógenos bacterianos e virais tanto nas águas de cultivo como nos próprios animais (SOUZA et al., 2012). Além disso, a concentração de micro-organismos patogênicos ao homem pode ser muito maior no tecido das ostras do que nas águas de cultivo e, portanto, a ausência de contaminação na água de cultivo num dado momento pode não corresponder à ausência de contaminação nas ostras ali cultivadas (LENOCH, 2003; BUTT et al., 2004).

1.2 Legislação Brasileira

Até o ano de 2012, não havia na legislação brasileira a previsão para um tratamento específico aos moluscos bivalves previamente ao seu consumo e/ou comercialização; os moluscos eram assim incluídos em legislações mais abrangentes. A qualidade das águas destinadas ao cultivo dos moluscos bivalves é regulamentada pela resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que prevê que a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes seja de no máximo 43 por 100 mL (BRASIL, 2005). A resolução nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que trata sobre os padrões microbiológicos para alimentos, exige a pesquisa de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus coagulase* positiva em moluscos “in natura”, resfriados ou congelados (BRASIL, 2001).

Em maio de 2012, o Ministério de Aquicultura e Pesca, através na Instrução Normativa Interministerial número 7, instituiu o Programa Nacional de Controle Higiénico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB), que possui a finalidade de estabelecer requisitos mínimos necessários para a garantia da inocuidade e qualidade dos moluscos bivalves destinados ao consumo humano, bem como monitorar e fiscalizar o atendimento desses requisitos (BRASIL, 2012). O PNCMB prevê o monitoramento de biotoxinas produzidas por algas marinhas e de micro-organismos contaminantes, sendo o último estabelecido por meio da estimativa da densidade média de *Escherichia coli* em 100g da parte comestível dos moluscos bivalves (NMP/100g).

De acordo com esse monitoramento, a retirada de moluscos bivalves é definida como liberada (< 230 NMP *E. coli*), liberada sob

condição (> 230 e < 46.000 NMP *E. coli*), e suspensão (> 46.000 NMP *E. coli*). A legislação define que os moluscos bivalves procedentes das áreas de cultivo liberadas sob condição podem ser comercializados após: i) depuração, ii) processamento térmico que permita eliminar os micro-organismos patogênicos ou iii) remoção de vísceras e gônadas conforme a espécie processada (BRASIL, 2012). Entretanto, não é fornecido nenhum detalhamento da forma que esses processamentos deve ser realizados, ou de suas eficácias.

1.3 Patógenos Humanos Relacionados ao consumo de moluscos bivalves

Gastroenterites associadas com o consumo de moluscos bivalves tem sido reconhecidas por centenas de anos, muitas dessas relacionadas à contaminação fecal nos locais de cultivo (FAO, 2008). As principais bactérias de origem fecal envolvidas na contaminação dos moluscos bivalves pertencem aos gêneros *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia*. Entretanto, tais micro-organismos são facilmente inativados por procedimentos de tratamento de efluentes, ou seja, um número aceitável dessas bactérias, como consta na atual legislação brasileira, não assegura a inexistência de outros patógenos resistentes à inativação (ORTEGA et al., 2009). Diversos estudos realizados enfatizam a falta de correlação entre as presenças de bactérias, protozoários e vírus no ambiente aquático (LEES, 2000; WYN-JONES et al., 2011).

Dentre os vírus humanos de transmissão fecal-oral que podem contaminar o meio ambiente aquático destacam-se os adenovírus, enterovírus, norovírus, rotavírus e vírus da hepatite A. Esses são comumente excretados em altas concentrações nas fezes e/ou outras secreções de humanos infectados, sendo capazes de contaminar direta ou indiretamente a água do mar e moluscos bivalves. Estes vírus são bastante estáveis nesses ambientes e possuem uma baixa dose infecciosa, podendo ocasionar surtos de doenças em indivíduos susceptíveis (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2012).

Dessa forma, para a realização do presente trabalho, dois modelos virais foram selecionados para estudar-se a estabilidade e infecciosidade devido a sua capacidade de infectarem células *in vitro* e por serem extremamente prevalentes e causadores de doenças na população humana: o adenovírus humano tipo 2 (AdVH-2), como um modelo para os diversos sorotipos de adenovírus humanos, e o norovírus murino tipo 1 (NVM-1), como modelo para os norovírus humanos.

1.3.1 Adenovírus

Os adenovírus fazem parte da família Adenoviridae, que é dividida em cinco gêneros, sendo o gênero *Mastadenovirus* o responsável por causar doenças em humanos. Mais de 60 tipos de adenovírus humanos (AdVH) já foram descritos até o presente momento, sendo que a maior parte dos novos subtipos são recombinações homólogas entre o mesmo gênero, gerando novos vírus com patogenicidades diferentes (HUANG & XU, 2013).

Os adenovírus são vírus não envelopados, possuem o material genético de natureza DNA dupla fita e possuem replicação nuclear. Seu capsídeo possui formato icosaédrico, é composto de 252 capsômeros, sendo destes 240 hexons e 12 pentons (Figura 4). Em cada penton existe uma projeção de uma única fibra, que varia de tamanho de acordo com os sorotipos, com a exceção dos sorotipos 40 e 41, que possuem duas fibras projetadas em cada penton. As fibras possuem um importante papel na adsorção dos vírus às células hospedeiras (MENA & GERBA, 2009).

Os AdvH são responsáveis por uma variedade de doenças, como faringites, pneumonias, febres, conjuntivites, cistites e gastroenterites. Eles podem ser transmitidos através da inalação de aerossóis, contato pessoa-pessoa e via fecal-oral, através de ingestão de água e/ou alimentos contaminados (MENA & GERBA, 2008). Acredita-se que todos os sorotipos podem se replicar no trato gastro-intestinal, sendo liberados em altas concentrações na fezes de indivíduos infectados (10^8 - 10^{13} partículas/ grama) mesmo em indivíduos assintomáticos (BÁNYAI et al., 2009).

Pela característica de não serem envelopados e possuírem o genoma de DNA dupla fita, os adenovírus apresentam uma grande estabilidade e resistência às diversas condições ambientais, permanecendo viáveis por longos períodos de tempo no ambiente, além de serem resistentes à diversos modos de desinfecção (FONG & LIPP, 2005; MENA & GERBA, 2008). Dessa forma, diversos estudos relataram sua presença em águas contaminadas por fezes humanas e de animais, sendo também detectado em altas concentrações em amostras de ostras cultivadas em águas contaminadas (LE GUYADER et al.,

2000; MUNIAIN-MUJIKA et al., 2002; RIGOTTO et al., 2010; MORESCO et al., 2012; SOUZA et al., 2012; MING et al., 2014).

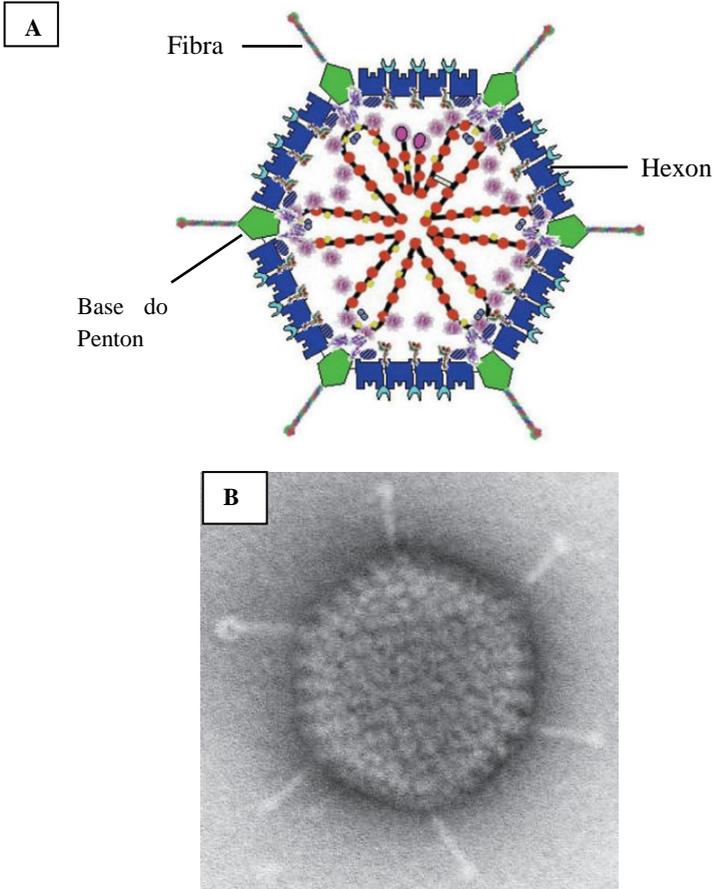


Figura 4. Adenovírus

A) Descrição esquemática de uma partícula viral. As proteínas do capsídeo estão identificadas. Fonte: RUSSEL, 2009.

B) Microscopia eletrônica de uma partícula viral. Adaptado de <https://gryllosblog.files.wordpress.com/2013/01/adenovirus2>. Acesso dia 17 de janeiro de 2015.

Métodos de detecção de AdVH em amostras ambientais são amplamente descritos na literatura, sendo constantemente aprimorados para aumentar suas sensibilidades. As metodologias comumente encontradas vão desde ensaios de detecção de genoma viral (PCR convencional e quantitativa) (ALLARD et al., 1992; HERNROTH et al., 2002), até uma variedade de ensaios celulares, usados para detecção de partículas virais íntegras e infecciosas (KO et al., 2003; CROMEANS et al., 2008; CALGUA et al., 2011; FONGARO et al., 2013). Os sorotipos 2 e 41 estão entre os adenovirus humanos mais prevalentes em amostras ambientais, e são comumente utilizados em trabalhos de contaminação artificial de amostras ambientais para avaliação de estabilidade e eficácia de desinfecção (CALGUA et al., 2011). Porém, estudos que avaliem a estabilidade e desinfecção de ostras contaminadas com adenovirus são mais escassos.

1.3.2 Norovírus

Os Norovírus pertencem à família Caliciviridae, e são os principais causadores de gastroenterites não bacterianas em todo o mundo, estimando-se 23 milhões de casos por ano nos Estados Unidos da América, sendo transmitidos pela via fecal-oral e por aerossóis (GENTRY, VINJÉ & LIPP, 2009).

Os norovírus não possuem envelope lipídico, possuem o capsídeo icosaédrico contendo 180 cópias da proteína estrutural majoritária VP1 (SCIPIONE et al., 2008) (Figura 5). Eles apresentam genoma formado por RNA fita simples de senso positivo, contendo 3 fases abertas de leitura (ORFS open reading frames). A ORF1 codifica para um grande poliproteína que é clivada em outras seis proteínas importantes, envolvidas na replicação viral, como a polimerase viral. A ORF 2 codifica para a proteína estrutural VP1 e a ORF 3 para a proteína VP2 (ATMAR, 2010).

O sequenciamento completo do genoma com o estudo das sequências gênicas codificadoras do capsídeo viral, permitiu a classificação dos Norovírus em cinco genogrupos (G): os que infectam humanos (GI, GII e GIV), bovinos (GIII), murino (GV), porcino (GII) e felinos (GVI). Devido à grande taxa de recombinação durante o processo de replicação viral, foi proposta uma subdivisão abaixo do nível de gênero por Zheng et al. (2006), sendo que dentro dos cinco genogrupos foram identificados outros 33 genotipos baseados nas sequências aminoacídicas da proteína do capsídeo VP1: 9 para o GI, 19 para o GII, 2 para o GIII, 2 para o GIV e 1 para o GV (ATMAR, 2010).

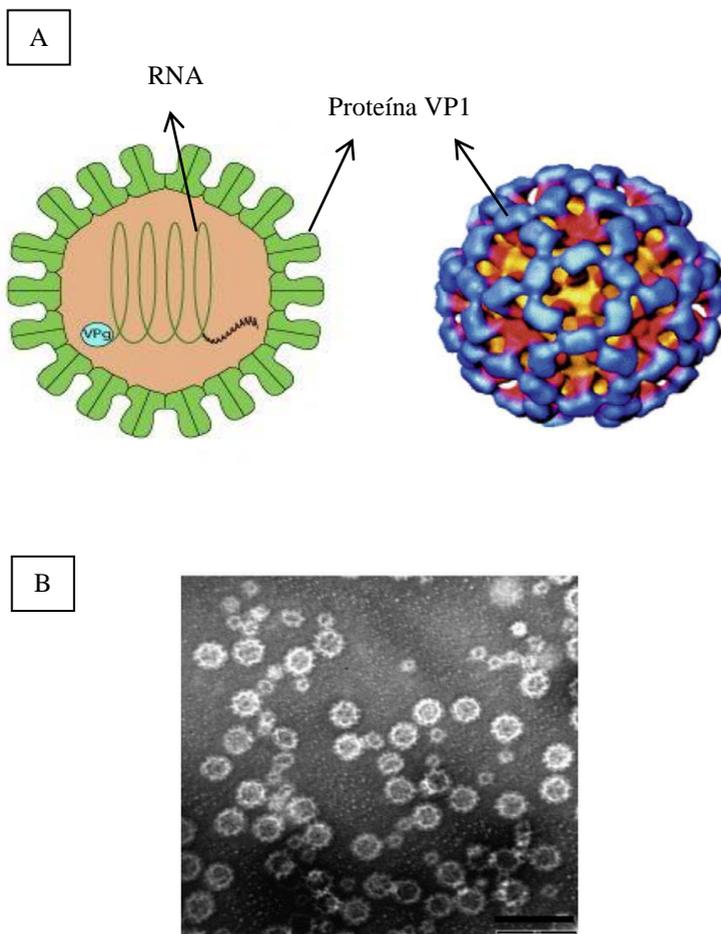


Figura 5. Norovírus.

A) Descrição esquemática de uma partícula viral, com ênfase para a proteína estrutural majoritária VP1. Adaptado de <http://viralzone.expasy.org/>. Acesso dia 31 de janeiro de 2015.

B) Microscopia eletrônica de várias partículas virais. Barra: 100nm. Adaptado de FENG et al., 2011.

Dentre os genogrupos de norovírus que infectam humanos, o GII é o mais prevalente, detectado em mais de 90% das amostras de fezes colhidas de pacientes, sendo o genótipo GII.4 o mais frequente, cerca de 70% das detecções (LE GUYADER et al., 2012). Epidemias globais de gastroenterites agudas, desde os anos 90, são associadas ao surgimento de variantes antigênicos do genótipo GII.4 (EDEN et al., 2013).

O GI é o genogrupo mais associado às gastroenterites virais vinculadas ao consumo de moluscos bivalves (LE GUYADER et al., 2009). Os genogrupo GI e GII.4 têm a capacidade de se ligar fortemente a antígenos presentes somente nas células dos tecidos digestivos das ostras, ausentes em tecidos mais externos dos animais. Estes antígenos são semelhantes aos antígenos presentes em células humanas, denominados antígenos do grupo sanguíneo ABH e Lewis. Em decorrência dessa similaridade, os norovírus GI e GII permanecem ligados aos tecidos das ostras, dificultando que sejam removidos durante os processos de purificação de moluscos bivalves, como por exemplo, a depuração (LE GUYADER et al., 2006).

Até o final de 2014, várias tentativas frustradas haviam sido realizadas a fim de se descobrir um modelo de cultivo celular adequado para estudos *in vitro* dos norovírus humanos, razão pela qual os modelos de detecção desse vírus eram restritos a modelos de detecção de genoma (PCR e suas variações.). Em novembro de 2014, foi publicado na revista Science o trabalho de Jones et al., descrevendo a replicação do norovírus humano *in vitro* em linfócitos B com a presença de bactérias entéricas que expressam antígenos HBGA (*histo-blood group antigen* – antígenos do grupo sanguíneo). Neste trabalho foi utilizada a cepa chamada GII.4-

Sydney, considerada a cepa dominante circulante no mundo. Até o presente momento, foi o trabalho mais promissor na padronização de uma metodologia de replicação *in vitro* do norovírus humano.

Até a publicação desse trabalho, dos genogrupos existentes, o norovírus murino (NVM) era o único norovírus que apresentava capacidade de replicação *in vitro* em cultura de células (WOBUS; THACKRAY; HERBERT, 2006). Dessa forma, esta cepa de norovírus é apontada como modelo para substituir os norovírus humanos nos estudos de estabilidade, infecciosidade e quantificação *in vitro*, utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7 permissivos à infecção por estes vírus (BAERT, et al., 2008). Do ponto de vista molecular, o NVM compartilha muitas características genéticas com norovírus humanos, sendo que a análise do genoma de NVM (RNA fita-simples de aproximadamente 7.5 kb) identificou 3 fases abertas de leitura (ORF) características comuns aos norovírus humanos e Vesivirus, também da família Caliciviridae. Em relação à patogenicidade, o NVM também compartilha com os norovírus humanos a capacidade de ser excretado pela via fecal-oral sendo que altas concentrações de partículas virais são encontradas nas fezes do animal infectado (WOBUS; THACKRAY; HERBERT, 2006). Dessa forma, para este trabalho, o NVM foi selecionado como modelo substituto dos norovírus humanos, patógenos altamente relacionados a surtos de gastroenterites por ostras contaminadas no mundo todo.

1.4 Purificação de moluscos bivalves

Grandes mercados produtores de moluscos, como a União Europeia e Estados Unidos da América, tem se utilizado da purificação de moluscos pelo método da depuração previamente à venda como forma de se evitar doenças associadas ao consumo de moluscos contaminados. Depuração é o processo no qual os moluscos bivalves são mantidos em tanques de água salgada limpa em condições em que a atividade natural de filtração dos animais seja mantida, o que resulta na expulsão de possíveis micro-organismos patogênicos presentes em seus tecidos, podendo ou não ser associado a um método de desinfecção (CARTER, 2005; FAO, 2008). O processo de depuração foi originalmente desenvolvido como parte das medidas adotadas durante o surto de febre tifóide relacionada ao consumo de moluscos bivalves nos países europeus e nos Estados Unidos da América no final do século 19 (FAO, 2008; LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010).

Os sistemas de depuração podem ser do tipo aberto ou semi-aberto, quando o fluxo de água é contínuo ou substituído em intervalos regulares, respectivamente, ou do tipo fechado com recirculação de água (LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010). Os sistemas abertos e semi-abertos requerem a presença de uma vasta fonte de água salgada de boa qualidade próxima impossibilitando seu uso em locais distantes da costa. Os sistemas fechados suprem essa desvantagem, mas requerem que a água do tanque seja submetida a um processo de desinfecção para evitar recontaminações dos animais.

Hoje existem diversas opções de desinfecção da água recirculante nos sistemas de depuração. Uma comparação entre as

principais delas é feita no quadro 1. A cloração foi a primeira forma de desinfecção utilizada nos processos de depuração, possuindo alta capacidade desinfetante (LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010). Entretanto, o uso do cloro possui diversas desvantagens dependendo da concentração usada, como poder causar um efeito inibitório na atividade de filtração das ostras, deixar gosto e alterar a textura dos animais depurados e a possibilidade de gerar sub-produtos carcinogênicos (LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010). Dessa forma, a desinfecção por cloro foi abandonada na maior parte dos países (JACKSON & OGBURN, 1999; LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010).

Outra opção de desinfecção da água nos tanques de depuração é o ozônio, que é um forte agente oxidativo que reage com matéria orgânica e é utilizado comercialmente em alguns sistemas de depuração na França e Espanha (JACKSON & OGBURN, 1999). O ozônio possui vantagem em relação à cloração uma vez que não altera gosto, odor ou a aparência dos animais (LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010). O ozônio precisa ser produzido no local de uso e é mais comumente gerado através de uma corrente elétrica, possuindo um alto custo de instalação (JACKSON & OGBURN, 1999). Além disso, sua eficácia pode ser influenciada por mudanças de temperatura e pH (LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010). Mais ainda, concentrações residuais de ozônio pode fazer com que os animais reduzam ou interrompam sua atividade, diminuindo a eficácia do processo de depuração (FAO, 2008).

Quadro 1. Comparação dos três modelos de desinfecção em depuradoras de moluscos bivales mais utilizados.

Condição/Operação	Luz ultravioleta	Cloração	Ozônio
Custo Inicial	Baixo	Médio	Alto
Custo de Operação	Baixo	Baixo	Alto
Instalação	Simples	Complexa	Complexa
Manutenção	Fácil	Moderada	Difícil
Turbidez da água usada	Baixa	Alta	Média
Risco de danos ao operador	Médio	Alto	Médio
Problemas na operação	Baixo	Médio	Alto
Efeito residual	Não	Sim	Sim
Efeito na ostra	Nenhum	Irritante	Oxidante

Adaptado de FAO (2008).

Desinfetantes contendo iodo em combinação com um surfactante, chamados de iodóforos, também podem ser usados em sistemas de depuração. A literatura científica é limitada sobre o uso de iodo ou iodóforos em processos de desinfecção de água em sistemas de depuração. Um trabalho de 1978 utilizou um sistema de recirculação com 0,1 a 0,4 mg de iodóforo por litro de água, e encontrou uma rápida redução bacteriana na ostra, sem ter afetado a atividade de filtração ou a

qualidade organoléptica do animal (LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010). A vantagem do uso de iodo ou iodóforos estaria na capacidade de não só promover uma desinfecção da água do tanque, mas também deixar níveis residuais baixos de iodo no trato gastrointestinal dos moluscos, o que levaria a uma ação antimicrobiana direta, inclusive contra vírus (FAO, 2008). Entretanto, não se sabe ao certo a eficácia dessa ação antiviral. Dessa forma, iodo e iodóforos não são comuns em sistemas de depuração de moluscos.

O método de purificação mais utilizado em sistemas de depuração é o emprego de radiação por luz ultravioleta (U.V.), escolhido para desenvolver este trabalho. O uso de luz U.V. se destaca das demais por apresentar o menor custo de manutenção e instalação, a melhor ação desinfetante e por não interferir na textura da carne ou sabor do animal (FAO, 2008). O sistema de U.V. em geral consiste no emprego de uma lâmpada U.V. inserida no interior de um tubo de PVC ou aço. A água é bombeada para o interior desse sistema, descontaminada, e devolvida para o tanque, sendo que essa sequência se repete por muitas vezes durante o processo de desinfecção (LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010). Porém, apenas a água que passa pela unidade contendo a lâmpada é sujeita a ação da luz U.V., e os microorganismos que permanecem adsorvidos aos animais não serão afetados, a menos que os mesmos se desprendam e sejam liberados na água do tanque, uma vez que não há ação residual como em outros métodos de desinfecção (LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010). A radiação ultravioleta causa danos nos ácidos nucleicos dos patógenos, induzindo mutações que interferem na síntese de proteínas e na replicação dos ácidos nucleicos (JACKSON & OGBURN, 1999).

Diversos estudos apontam para a eficácia da depuração com emprego da radiação U.V. na purificação de moluscos bivalves contaminados com patógenos humanos (CORREA et al., 2007; 2012; LOVE, LOVELACE & SOBSEY, 2010; SOUZA et al., 2013), porém a avaliação da persistência da infecciosidade de patógenos virais é pouco estudada.

1.5 Detecção viral em amostras ambientais

A infecciosidade viral é caracterizada pela capacidade dos vírus penetrarem nas células hospedeiras permissivas e usarem os recursos desta para sua replicação e produção de novas partículas virais infecciosas (HELENIUS, 2007). A detecção dos vírus de transmissão fecal-oral em amostras ambientais é normalmente realizada por técnicas moleculares como a amplificação gênica (PCR) e suas variações. Estas técnicas já estão bem estabelecidas e, quando comparadas com os métodos que utilizam células em cultura, são de mais rápida execução, sendo comumente utilizadas na identificação e detecção de sequências gênicas específicas de diferentes tipos de contaminantes do meio ambiente (WATZINGER, EBNER, LION, 2006). Apesar de rápidas e sensíveis, as técnicas moleculares clássicas e dissociadas da cultura celular não fornecem resultados referentes à infecciosidade viral, não podendo prever o risco de se desenvolver uma doença associada àquela amostra contaminada (CHARLES et al., 2009).

O emprego da cultura celular animal para essa finalidade, associada ou não a métodos moleculares, permite inferir com uma maior precisão e confiabilidade o real risco que estes patógenos virais representam no desenvolvimento de uma doença, quando presentes de forma viável em uma amostra ambiental. Apesar de ser uma metodologia clássica, o uso do cultivo celular com o objetivo de verificar a infecciosidade dos vírus contaminantes de uma amostra ambiental, apresenta certas desvantagens, como o fato de possuir custos mais elevados, requerer laboratórios mais equipados e, em alguns casos, não ser factível devido ao fato de alguns vírus contaminantes do ambiente aquático não serem adaptados ao cultivo celular *in vitro* (YEH, et al., 2009).

Entretanto, poucos grupos de pesquisa tanto no Brasil quanto em outros países tem se dedicado ao estudo da infecciosidade dos vírus entéricos contaminantes do meio ambiente aquático. A divulgação de dados de contaminação viral em moluscos bivalves pode comprometer seriamente o desenvolvimento sustentável dessas atividades. Laudos baseados simplesmente na detecção dos genomas virais, sem inferência sobre a infecciosidade desses vírus, podem ser alarmantes e sem real significado epidemiológico, já que os vírus podem se encontrar inativados.

Dessa forma, uso dos AdVH e NVM, modelos virais incluídos neste trabalho, ajuda a suprir a falta de dados dessa área, permitindo determinar o potencial risco que estes vírus representam no desenvolvimento de doenças ligadas à ingestão de moluscos contaminados.

2 HIPÓTESE

Os vírus entéricos apresentam cinéticas distintas de captação e eliminação dos tecidos dos moluscos bivalves e, embora sejam estáveis em temperaturas de estocagem, perdem sua infecciosidade pela radiação U.V. e pelo calor.

3 OBJETIVO

Avaliar a aquisição e a estabilidade térmica de vírus entéricos em ostras *Crassostrea gigas*, assim como a inativação desses durante o processo de depuração.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a eficácia de diferentes técnicas de detecção de partículas virais infecciosas em amostras de tecidos de ostras.
- Determinar o melhor tempo de bioacumulação para cada vírus e a concentração de vírus a ser utilizada, a reprodutibilidade do ensaio e a sensibilidade de cada uma das técnicas a serem utilizadas.
- Avaliar a estabilidade térmica viral em ostras estocadas a 4°C e submetidas à cozimento “ao bafo”.
- Quantificar o decaimento viral no processo de depuração por luz ultravioleta.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção das amostras de ostras e preparo de extratos de glândula digestiva

Ostras da espécie *Crassostrea gigas* foram adquiridas de um produtor de Santo Antônio de Lisboa, Florianópolis, dispostas em aquários de 15 L de água do mar. Esses aquários eram, depois, contaminados com concentrações pré-definidas dos vírus para bioacumulação e após, para os ensaios de depuração, acondicionadas em tanques com capacidade total de 300 L de água do mar, conectados a bomba de aeração e com lâmpada UV de ação germicida (36 W).

Em todos os experimentos que envolveram a detecção dos vírus, uma amostra de seis indivíduos foi coletada, dissecada, e suas glândulas digestivas trituradas com o auxílio de um homogenizador Ultra-Turrax (modelo T25 basic, IKA Labortechnik). A eluição e concentração dos vírus presentes nas glândulas foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Lewis e Metcalf (1988) com modificações. Em resumo, a eluição dos vírus do tecido das ostras foi realizada a partir de 2 g de amostra, pela adição de 4 mL de caldo triptose fosfato a 10% (preparado em glicina, pH 9,0). Após incubação por 30 min sob agitação constante, uma clarificação inicial foi realizada pela adição de 1 volume de clorofórmio-butanol (1:1), que após centrifugação por 10.000 \times g por 15 min, resultou em duas fases: o tecido digestivo (na fase orgânica) e as partículas virais (na fase aquosa), essa última recolhida para posterior concentração. A concentração foi realizada pela adição de polietilenoglicol (PEG 6000) a 12% de concentração final. Após

agitação por no mínimo 2h a 4°C graus, a amostra foi centrifugada a 10.000 χ g por 20 min a 4°C. O sedimento final foi ressuspendido em 3 mL de água Milli Q. Para ensaios envolvendo qPCR realizou-se ainda uma etapa de clarificação final pela adição uma concentração final de 30% de clorofórmio, centrifugado a 10.000 χ g por 10 min a 4°C, sendo que a fase aquosa foi recolhida para posterior extração dos ácidos nucleicos.

Para os ensaios de citotoxicidade e infecciosidade descritos a seguir, os extratos teciduais não clarificados foram tratados pela adição de 2% de PSA (Penicilina, Streptomina, Anfotericina). Todos os ensaios de detecção foram realizados imediatamente após o processo de eluição, não havendo estocagem das amostras antes do uso. Isso foi realizado para garantir que as possíveis alterações na infecciosidade viral fossem devidamente aferidas sem qualquer interferência que pudesse ocorrer devido ao armazenamento das amostras.

4.2 Linhagens celulares e modelos virais

Como modelo dos adenovírus humanos, foi utilizado o adenovírus humano tipo 2 (AdVH-2), e como modelo dos norovírus humanos, foi utilizado o norovírus murino tipo 1 (NVM-1). Conforme já explicado, esses modelos virais foram escolhidos, pois ambos são adaptados ao cultivo celular e podem ser detectados por técnicas que envolvem a infecção celular *in vitro* e ainda por tratarem-se de vírus

distintos constituídos por genoma DNA (AdVH-2), e genoma RNA (NVM-1).

Para os ensaios de viabilidade e para a produção dos estoques virais foram utilizadas células A549 (derivadas de carcinoma de pulmão humano) permissivas ao AdVH-2, e macrófagos da linhagem RAW264.7 (*Mus musculus*) permissivas ao NVM-1.

As células A549 (Figura 6 A) foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 75 ou 100 cm² utilizando como meio de crescimento o meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) contendo alta glicose (25 mM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco).

As células RAW 264.7 (Figura 6 B) foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma), 1% de L-glutamina 2 mM (Sigma) e 1,5% de HEPES (Sigma).

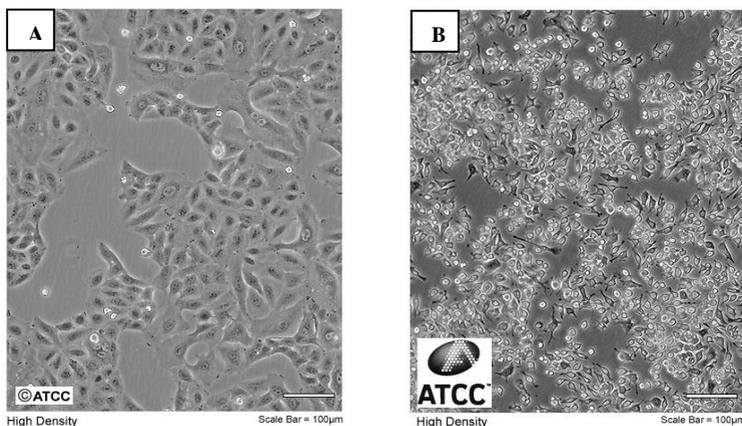


Figura 6. Representação dos dois tipos celulares utilizados, sendo A) Células A549 e B) células RAW 264.7. Imagens adaptadas do site do banco de células ATCC (www.atcc.org). Barra = 100 µm

Tanto para os cultivos celulares quanto durante as infecções as linhagens foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% CO₂.

4.2.1 *Produção dos estoques virais*

Após atingirem confluência, as monocamadas celulares foram infectadas com vírus para serem produzidos os estoques virais. Em uma garrafa de 75 cm² contendo monocamada de células A549 ou RAW 264-7, o meio foi retirado e adicionado 1,0 mL de uma suspensão viral, já disponível no laboratório. As células foram incubadas a 37°C por 1h para que ocorresse a adsorção viral. Após esse período, o inóculo viral foi removido e adicionou-se o meio de manutenção conforme descrito anteriormente, porém com uma concentração de 2% de SFB, para que a replicação celular fosse desacelerada, sem prejudicar a viabilidade celular, importante para a replicação dos vírus. As células foram observadas diariamente, em microscópio óptico invertido (Olympus), para visualização do efeito citopático característico de replicação viral. A replicação viral, em geral, causa uma modificação morfológica na célula hospedeira, e qualquer mudança detectável na célula devido à infecção é denominada de efeito citopático. Células não infectadas foram utilizadas como controles negativos. Ao se obter 100% de destruição da camada celular, as garrafas foram levadas ao freezer -80°C e após congelamento, as mesmas foram degeladas em temperatura ambiente. Esse processo se repetiu por três vezes para que possíveis células intactas e infectadas fossem rompidas. A suspensão foi centrifugada a 600 \times g por 5 min para remover restos celulares. O

sobrenadante contendo os vírus foi titulado conforme o descrito abaixo, aliquotado e mantido congelado a -80°C até o uso.

4.2.2 Determinação do título infeccioso dos fluidos virais

Os fluidos virais produzidos foram titulados utilizando as técnicas de placa de lise descritas no item 4.5.1. a seguir. A titulação de cada um dos vírus foi determinada pela média das triplicatas de três diluições dos vírus.

4.3 Extração dos ácidos nucleicos

Quando necessário, o material genético das amostras foi extraído utilizando o kit comercial RTP® Virus Mini Kit (STRATEC Molecular), de acordo com as instruções do fabricante, baseado no protocolo originalmente descrito por Boom et al. (1990). Brevemente, 200 μL de amostra foi incubado com uma solução contendo proteinase K e um tampão de lise fornecido pelo fabricante. Após, a amostra foi incubada em uma coluna de sílica, para que houvesse a adsorção dos ácidos nucleicos à sílica. Após diversas lavagens para eliminação de contaminantes, ocorreu a eluição final dos ácidos nucleicos em 60 μL de tampão de eluição. Quando necessário, a amostra era estocada a -80°C até o uso.

4.4 Ensaio de citotoxicidade de concentrados dos tecidos de ostras nas respectivas linhagens celulares

Este ensaio teve por finalidade avaliar e determinar qual a diluição das amostras teciduais de ostras seria utilizada nos ensaios realizados em cultura celular de modo que estas não apresentassem citotoxicidade frente às células A549 e RAW264.7. Dessa forma, os extratos teciduais tratados com antibióticos e antifúngico conforme descrito em 4.1 foram adicionados às monocamadas confluentes dos dois tipos celulares utilizados, em diluições seriadas, por um período de 1h. Após esse tempo, o inóculo foi removido, e o respectivo meio de manutenção para cada tipo celular foi adicionado sempre em presença dos antibióticos e antifúngico. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C e visualizadas em microscópio óptico invertido diariamente por até sete dias. Após esse tempo, o meio de cultivo foi retirado e as células foram fixadas e coradas com corante cristal violeta a 0,08%.

4.5 Ensaio de detecção de AdvH-2 e NVM-1

4.5.1 Ensaio de Formação de Placas de Lise para AdvH-2 e NVM-1

O ensaio de formação de placa de lise baseia-se na visualização da infecção viral através de placas de lise formadas pela lise de células infectadas cultivadas em monocamadas em meio contendo ágar. A

adição do ágar/agarose serve para impedir o espalhamento do vírus limitando a infecção apenas às células vizinhas àquela primariamente infectada. A placa de lise irá se formar pelo rompimento das células vizinhas à primeira célula infectada, e a visualização de áreas sem células é possível após fixação e coloração das células remanescentes nas placas.

O ensaio de formação de placa lise para o NVM-1 foi baseado no descrito por Bae e Schwab (2008). Brevemente, monocamadas confluentes de células RAW 264-7 semeadas em placas de seis cavidades foram infectadas com diluições não citotóxicas das amostras a serem avaliadas. Após o período de 1h de adsorção na estufa a 37°C, o inóculo foi retirado e foi adicionado o mesmo meio de cultura de manutenção das células, porém duas vezes mais concentrado, diluído em agarose 3% (SeaPlaque Agarose de baixo ponto de fusão, Lonza, CA, USA). As células foram incubadas por 48h a 37°C. Após esse período, 1,0 mL de uma solução de 0,1% do corante vermelho neutro foi sobreposta à camada de agarose, o que possibilitou a visualização das placas de lise e sua contagem após 3h como mostra a figura 7 A.

O ensaio de placa de lise para o AdvH-2 foi realizado de acordo com Cromeans et al. (2008). Células A549 em monocamadas confluentes semeadas em placas de seis cavidades foram infectadas com diluições não citotóxicas das amostras pelo período de 1h a 37°C. Após a retirada do inóculo, foi adicionado 2,5 mL de uma solução contendo o meio de cultura de manutenção duas vezes concentrado e Bacto™-ágar 0,6% (BD). As células foram incubadas em estufa a 37°C e, após 7 dias, o meio contendo ágar foi retirado e o tapete celular corado com uma solução do corante cristal violeta 0,08% . Após 5 min o corante foi

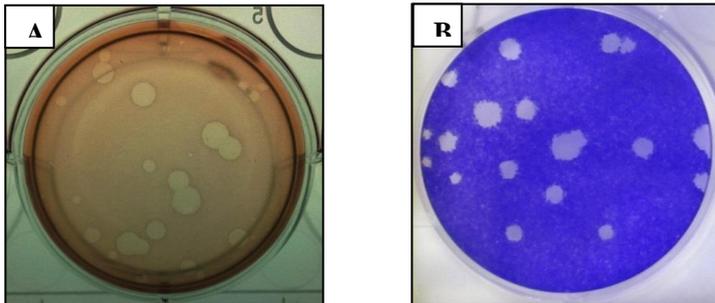
aspirado e as placas de lise puderam ser visualizadas e contadas como mostra a figura 7 B.

A quantidade de unidades formadoras de placa por mL (para suspensão viral) ou g (para amostras de tecido de ostra) foi inferida utilizando-se a fórmula:

Número de placas contadas x recíproca da diluição

Volume adicionado na cavidade

Todos os experimentos foram realizados em duplicata, contendo sempre um controle negativo que constava apenas do tapete celular confluyente sem adição de amostras ou suspensões virais, e um controle positivo contendo apenas a suspensão viral diluída.



**Figura 7. Fotos ilustrativas de cavidades de um ensaio de placa de lise para o NVM-1 (A) e de um ensaio de placa de lise para o AdvH-2 (B).
Fonte: própria autora.**

4.5.2 ICC-RT-qPCR para AdvH-2

Esse experimento teve por finalidade verificar o potencial infeccioso dos vírus nas amostras por meio da detecção de seu RNA mensageiro utilizando PCR em tempo real (qPCR) precedido de transcrição reversa do mRNA viral.

Devido ao fato do adenovírus possuir genoma DNA, após infectar a célula hospedeira, o DNA necessita ser transcrito a mRNA para que ocorra a tradução das proteínas virais. Como o ensaio está baseado no isolamento do RNA viral, o mesmo pressupõe que o vírus esteja viável e em processo de replicação no interior da célula infectada. Esse foi o primeiro trabalho a aplicar essa técnica para detecção de infecciosidade viral em amostras teciduais de ostras, e foi realizado de acordo com o descrito por Fongaro et al. (2013).

Monocamadas confluentes de células A549 foram incubadas com as amostras de tecido de ostra em concentração não citotóxica por 24h. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e o RNA total extraído de acordo com o descrito no item 4.3. O RNA extraído foi tratado imediatamente com a enzima DNase, com o objetivo de eliminar qualquer contaminante de DNA presente na amostra, ficando somente o RNA viral transcrito durante a replicação do vírus. Para tanto, 2,0 U de DNase (Sigma Aldrich®) foram adicionadas às amostras após extração dos ácidos nucleicos, seguindo-se de incubação à temperatura ambiente por 15 min. Após o período de incubação a enzima foi inativada com adição de EDTA e incubada por 10 min a 70°C.

A quantificação dos vírus viáveis foi realizada através da técnica de PCR em tempo real (qPCR), precedido por uma reação de

transcrição reversa (RT), utilizando-se hexanucleotídeos randômicos para a síntese do DNA complementar (cDNA). O material genético purificado foi previamente desnaturado a 97°C por 5min e resfriado por 2min em banho de gelo. Posteriormente o material genético foi adicionado a uma mistura de: hexanucleotídeos randômicos [20pmoles] (Promega), 0,6mM de dNTPs (deoxinucleotídeos dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1U da enzima transcriptase reversa (MMLV-Promega) e 0,5U de inibidor de RNase (RNAsin-Promega), em condições salinas adequadas. A reação ocorreu em equipamento termociclador, em ciclos de 37°C por 60 min e 65°C por 10 min.

A reação de qPCR para adenovírus foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Hernroth et al. (2002), em uma reação de 25 µL de volume final, utilizando-se 12,5 µL do kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 2x concentrada, que contém os reativos necessários para a reação de PCR, como a enzima Taq DNA Polimerase, deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) além das condições salinas adequadas. Foram acrescentados à solução de reação da qPCR os iniciadores ADF e ADR (Quadro 2) na concentração final de 0,9 µM e sonda de hidrólise TaqMan ADP1 (Quadro 2), na concentração final de 0,225 µM. Os iniciadores utilizados flaqueiam uma região conservada da primeira parte do gene hexon do adenovirus.

Para a quantificação viral, como padrão de reação, foram utilizados fragmentos de DNAs/cDNAs, previamente clonados em plasmídeos com as sequências-alvo para os respectivos iniciadores e sondas para cada tipo viral. Os clones contendo as sequências virais clonadas foram gentilmente cedidos pela Dra. Rosina Girones da Universidad de Barcelona.

Os ensaios foram realizados em duplicata em placa de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems), contendo também controles negativos, consistindo de apenas os reagentes sem adição de ácidos nucleicos provenientes das amostras. Todas as reações de qPCR foram preparadas em sala livre de DNA e em outra sala foram adicionadas as amostras de DNA (10 µL), totalizando o volume final de reação (25 µL). Em outro ambiente, destinado à manipulação com plasmídeos, foram adicionados às cavidades previamente estipuladas, onde não haviam sido adicionadas amostras de DNA, 10 µL dos DNAs padrão clonados em plasmídeos, com as sequências-alvo do vírus. Os padrões foram adicionados em diferentes e conhecidas concentrações de cópias genômicas (10^2 a 10^6 cópias genômicas, por exemplo) e em duplicata, de modo que os genomas contidos nas amostras que estavam sendo analisadas fossem quantificados com base nos parâmetros dos genomas já previamente quantificados nos padrões.

Em seguida, a placa foi devidamente selada com filme óptico (Applied Biosystems) e inserida no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O perfil de temperaturas utilizado no qPCR foi de 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C para ativação e inativação respectivamente da enzima UDG que serve como um controle de contaminação por DNA previamente presente na amostra antes da amplificação seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, e anelamento dos iniciadores e sonda e extensão ambos a 60 °C por 1 min

A quantificação dos vírus viáveis foi expressa em número de cópias genômicas/grama de tecido (CG/ g).

4.5.3 *qPCR para NVM-1*

No caso do NVM-1, optou-se por realizar o ensaio de placa de lise para verificação da infecciosidade viral nas amostras e compará-lo ao qPCR baseado na quantificação simples dos genomas virais, já que a placa de lise é o único ensaio de detecção de infecciosidade viral disponível para o NVM-1. A reação de qPCR ocorreu de acordo com o descrito por Baert et al. (2008), utilizando-se o kit comercial QuantiTect Probe RT-PCR (Qiagen) 2x concentrado, que contém os reagentes HotStartTaq DNA Polimerase, deoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), enzima transcriptase reversa (RT), necessária para que ocorra a transcrição do RNA viral da amostra para cDNA, além das condições salinas adequadas. Com a utilização desse kit, foi possível realizar a RT qPCR em um único passo.

Para um volume final de 20 μL , utilizou-se 10 μL do kit, iniciadores MNV-F e MNV-R na concentração final de 0,2 μM , e sonda de hidrólise TaqMan MNVP na concentração final de 0,2 μM , e por último a adição de 5,0 μL da amostra de RNA. A sequência dos iniciadores e sonda utilizados encontram-se no Quadro 2. Os mesmos cuidados e equipamentos foram utilizados e realizados como consta no item 4.5.2.

Quadro 2: Iniciadores e Sondas utilizados para a detecção de AdVH-2 e NVM-1.

Iniciadores e Sondas	Sequências	Referências
AdVH		HERNROTH et al. (2002)
AdF	CWTACATGCACATCKCSGG	
AdR	CRCGGGCRAAYTGCACCAG	
AdP1	6-FAM- CCGGGCTCAGGTACTCCGAG GCGTCCT-TAMRA	
NVM		BAERT et al. (2008)
F-ORF1/ORF2	CACGCCACCGATCTGTTCTG	
R-ORF1/ORF2	GCGCTGCGCCATCACTC	
MGB-ORF1/ORF2	6-FAM-CGCTTTGGAACAATG-MGBNFQ	

O perfil de temperaturas utilizado na reação foi de temperatura inicial de 50°C por 30 min para a realização da transcrição reversa, seguido de desnaturação da RT a 95°C por 10 min seguido por 40 ciclos de amplificação iniciando a 95 °C por 15 s para desnaturação e 60°C por 1 min para anelamento e extensão dos iniciadores.

4.6 Ensaio de bioacumulação, estabilidade, e depuração

4.6.1 Ensaio 1: Padronização do tempo ideal de bioacumulação viral nos tecidos das ostras

Por se tratar de um processo biológico natural dos moluscos bivalves, o processo de bioacumulação artificial de ostras com os vírus foi estudado para se determinar as condições ótimas necessárias para que uma alta concentração viral fosse encontrada nos tecidos das ostras. Para isso, as ostras adquiridas do produtor local foram lavadas no laboratório e alocadas em aquários de 15 L com água do mar filtrada. A temperatura do aquário foi mantida constante a 19°C para evitar estresses que pudessem interferir com a homeostasia fisiológica normal dos animais. Os animais foram mantidos nos aquários por pelo menos 24h antes dos experimentos para sua aclimação com o ambiente. Após esse período, foram adicionadas aos aquários concentrações conhecidas de cada um dos modelos virais. Em todos os experimentos foi utilizado um volume de 100 mL de suspensão viral para a contaminação dos

aquários. A suspensão viral foi previamente diluída em água do mar retirada do aquário e depois adicionada lentamente ao aquário, para minimizar o possível estresse causado pelo meio de cultura presente na suspensão viral, que pudesse alterar o meio em que se encontravam as ostras. Após 3h, 5h, 8h, 12h e 24h de bioacumulação, uma amostra consistindo de seis ostras, foi retirada e processada a fim de determinar a concentração de vírus presente no trato digestivo dos animais dessa amostra em cada um dos tempos de bioacumulação. Esse ensaio permitiu selecionar o tempo ideal onde a máxima concentração viral fosse detectada nos animais e norteou os ensaios subsequentes de bioacumulação viral, além de ter sido importante para comparar a taxa de bioacumulação pelas ostras dos dois vírus utilizados como modelo no presente trabalho.

Nesse ensaio, e em todos os subsequentes, diversos controles foram realizados a fim de garantir, da melhor forma possível, a reprodutibilidade dos resultados. Uma amostra de ostra processada imediatamente após a aquisição dos animais e uma amostra mantida em aquário com água salina não contaminada foram utilizadas como controles negativos em cada repetição realizada. Além disso, uma alíquota do homogenato de uma amostra negativa foi artificialmente contaminada com 100 μ L de suspensão viral para que a eficácia do processo de eluição fosse medida em cada ensaio. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, com amostras de ostras coletadas em momentos diferentes. Os ensaios para cada um dos modelos virais foi realizado separadamente, e em triplicatas.

4.6.2 *Ensaio 2: Análise da estabilidade de vírus em ostras estocadas a 4°C*

As ostras foram bioacumuladas com cada um dos modelos virais pelo tempo ideal estipulado no item 4.5.1. Após esse período, uma amostra de seis indivíduos foi retirada no tempo 0h, e o restante foi estocado a 4°C pelos tempos de 6h, 12h, 48h, 72h e 96h. A temperatura de 4°C foi selecionada por ser a temperatura de refrigeração normalmente utilizada no comércio e nas residências para estocagem dos animais antes da venda ou consumo. Ao final desses tempos, as ostras foram abertas e os extratos teciduais preparados para os ensaios de detecção de acordo com o item 4.5. Os ensaios para cada um dos modelos virais foi realizado separadamente, e em triplicata.

4.6.3 *Ensaio 3: Análise da estabilidade de vírus em ostras cozidas “ao bafo”*

As ostras foram bioacumuladas com cada um dos modelos virais pelo tempo ideal estipulado no item 4.6.1. A estabilidade viral foi em seguida analisada em ostras submetidas a cozimento “ao bafo”. O cozimento “ao bafo” é a segunda forma mais popularmente utilizada para se consumir ostras, perdendo somente para o consumo "in natura". Ele permite um cozimento rápido e brando dos animais. Para isso, ostras bioacumuladas com vírus foram adicionadas em uma panela contendo água fervendo a 100°C de modo que apenas metade do corpo dos animais ficasse submerso, como mostra a figura 8. O cozimento foi

realizado até que todos os animais tivessem as conchas abertas. A temperatura interna dos animais foi medida logo após serem retirados da panela. As amostras foram então processadas como descrito no item 4.1. e os métodos de detecção realizados de acordo com o item 4.5. Foi utilizado nesse experimento também um controle negativo de ostras não contaminadas. Os ensaios para cada um dos modelos virais foi realizado separadamente, e em triplicata.



Figura 8. Cozimento das ostras “ao bafo” no laboratório. Fonte: própria autora.

4.6.4 *Ensaio 4: Análise da inativação viral em ostras submetidas à depuração*

Para os ensaios de inativação viral pela depuração, dois tanques com capacidade para 300 L de água foram utilizados, um deles contendo o aparato com lâmpada U.V. de 36W, e outro sem lâmpada U.V. como controle (Figura 9). Os tanques possuíam um fluxo de 1.800 L/ h. A lâmpada U.V. aplicava uma dose aproximada de 44 mJ/ cm² por passagem da água, com uma dose acumulada por hora de 264 mJ/cm². Após a bioacumulação viral pelo tempo ideal determinado no item 4.6.1, os animais foram transferidos para os tanques de depuração e amostras foram retiradas após permanecerem nos tanques de depuração pelos períodos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. Cada tanque de depuração também estava equipado com um resfriador tipo "chiller", que promove o resfriamento da água e a manutenção constante da temperatura a 18°C. Os ensaios para cada um dos modelos virais foi realizado separadamente.

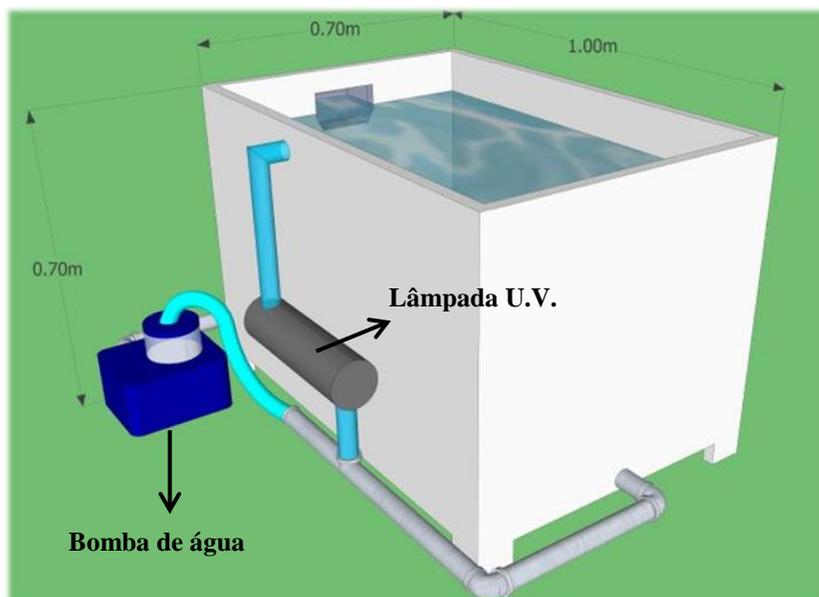


Figura 9. Esquema do tanque de depuração utilizado neste trabalho. Adaptado de Souza (2014).

4.7 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foram empregadas sempre que necessário os testes de Correlação de Pearson, regressão linear, ANOVA, 2way ANOVA e teste T de Student, seguidos sempre que necessário do teste *Bonferroni's Multiple Comparison* para análise aprofundada das diferenças significativas entre os grupos. Todas as análises foram realizadas empregando o GraphPad Prism 5.0 (USA) e os dados foram considerados estatisticamente significativos sempre que o valor de $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

1.1. Determinação do título infeccioso das suspensões virais por placa de lise

Foi utilizado para a titulação das suspensões virais os métodos de placa de lise específicos de cada vírus. O AdvH-2 teve um título de $2,0 \times 10^9$ UFP/ mL e o NVM-1 um título de $5,0 \times 10^6$ UFP/ mL. O limite de detecção do ensaio de placa de lise para AdvH-2 foi a diluição 10^{-7} , correspondente a $2,0 \times 10^2$ UFP/ mL e o de NVM-1 foi a diluição 10^{-5} , o que corresponde a $2,0 \times 10^1$ UFP/ mL.

1.2. Recuperação da técnica de eluição de patógenos virais do tecido das ostras

A porcentagem de recuperação da técnica de eluição utilizada neste trabalho foi determinada inoculando uma concentração conhecida de cada um dos modelos virais no homogenato de glândula digestiva antes do processamento. Foi adicionado 100 μ L de suspensão viral, homogeneizado, e incubado por 30 min antes de se iniciar a eluição. Os resultados obtidos encontram-se na figura 10.

A eficiência da técnica utilizada para eluição das partículas virais dos tecidos das ostras utilizando o protocolo descrito no item 4.1 foi aferida tanto por placas de lise quanto por técnicas moleculares para ambos os vírus aqui estudados. Para o AdvH-2, foi inoculada uma média de $7,70 \times 10^7$ UFP/g e recuperada $1,67 \times 10^6$ UFP/g, o que representou uma recuperação de 2,1% quando a técnica de detecção por placa de lise foi aplicada. Por ICC-RT-qPCR foi inoculado nas ostras uma média de $4,21 \times 10^9$ CG/g e detectado $4,77 \times 10^7$ CG/g perfazendo 1,3% de recuperação viral.

O NVM-1 apresentou uma melhor recuperação quando comparado ao ADVH-2. Por placa de lise, a média de recuperação foi de 23,4%, tendo sido inoculado $2,85 \times 10^5$ UFP/ g e recuperado $6,74 \times 10^4$ UFP/ g. O ensaio de detecção de genomas qPCR foi o que mostrou a melhor recuperação, já que foi inoculado $1,89 \times 10^{11}$ CG/g e recuperado $1,60 \times 10^{11}$ CG/ g , o que representa uma recuperação viral de 80,2% .).

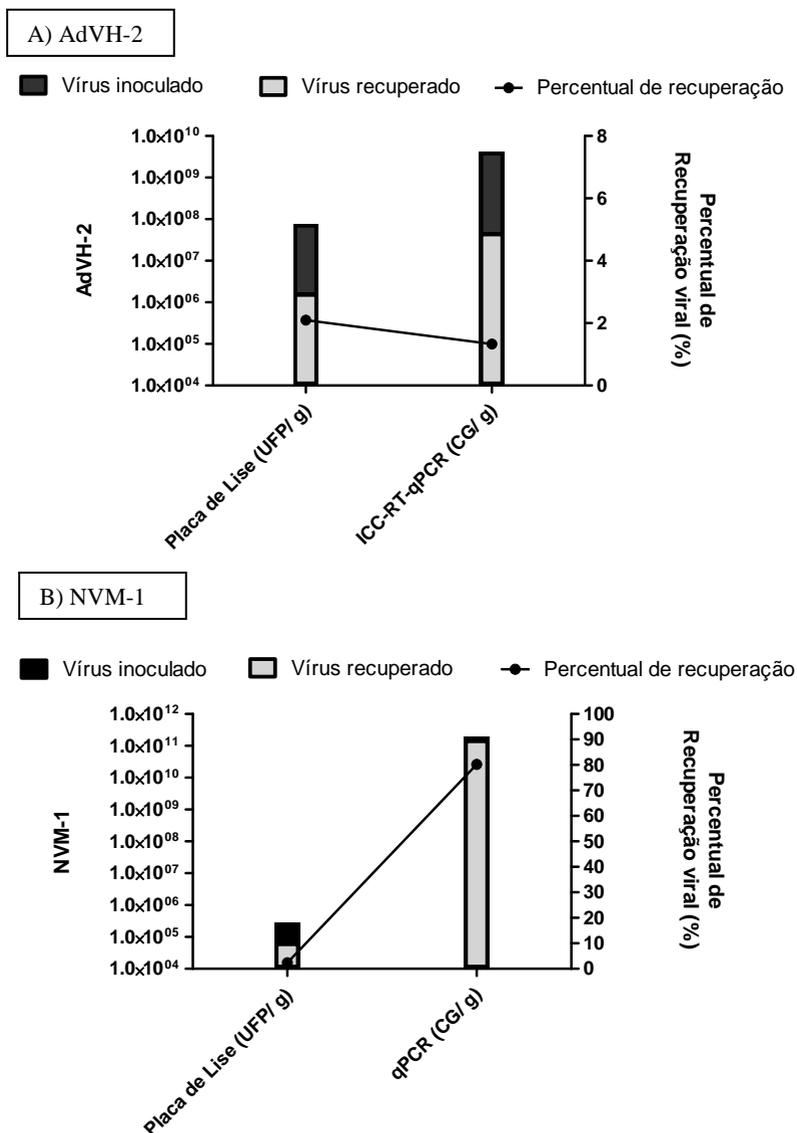


Figura 10. Recuperação da técnica de eluição-concentração em ostras artificialmente contaminadas e capacidade de recuperação de cada uma das técnicas de detecção utilizadas para cada vírus. Os resultados plotados no gráfico representam a média das três repetições realizadas. A) AdVH-2. B) NVM-1.

1.3. Citotoxicidade das amostras de tecido de ostras frente às linhagens celulares utilizadas

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para avaliar qual seria a menor diluição não tóxica das amostras de tecido de ostras para as células A549 e RAW 264-7. A amostra de tecido de ostra, processada de acordo com o descrito em métodos (item 4.1.) sabidamente negativa para os dois modelos virais foi adicionada pura e em diluições seriadas. Após 7 dias, as diluições a partir de 1:4 não apresentaram qualquer alteração morfológica nas linhagens celulares quando comparadas ao controle celular que não recebeu os inóculos dos extratos teciduais. Dessa forma, essa foi a diluição tecidual de ostras mínima utilizada em todos os experimentos envolvendo cultura celular.

1.4. Equivalência entre as técnicas de detecção utilizadas nas amostras de tecido de ostras

Foram utilizadas para cada modelo viral, duas técnicas de detecção diferentes. Para o AdvH-2, foram selecionadas as técnicas de placa de lise e ICC-RT-qPCR, que possuem abordagens diferentes para detecção de vírus infecciosos. Já para o NVM-1, foram utilizadas as técnicas de placa de lise e de qPCR, que quantificam vírus infecciosos e genomas virais, respectivamente.

A figura 11 apresenta graficamente a equivalência da quantificação entre cada uma das metodologias nas amostras de tecido de ostras. Para o AdvH-2, a equivalência de UFP/ g (placa de lise) e CG/ g (ICC-RT-qPCR) foi de $3,6 \times 10^2$ a mais em CG. Essa correlação significa que 1,0 UFP é equivalente a $3,6 \times 10^2$ CG. A correlação entre as técnicas foi positiva, com um $r^2 = 0,943$ ($p < 0,016$).

Já para o NVM-1, a diferença entre as técnicas foi maior. Neste caso, 1,0 UFP foi equivalente a $8,2 \times 10^5$ CG. Entretanto, essa diferença deve-se ao fato de a técnica de qPCR quantificar todos os genomas virais presentes na amostra, sejam esses provenientes de vírus íntegros ou danificados por qualquer processo com material genético intacto, mas que ainda preservaram o genoma, enquanto que a técnica de placa de lise quantifica somente os vírus infecciosos, ou seja, capazes de infectar e se replicar no interior de uma célula. A correlação entre as técnicas foi positiva, com um $r^2 = 0,998$ ($p < 0,05$).

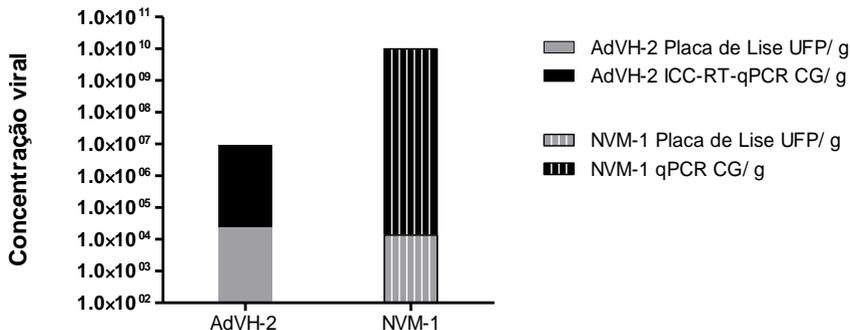


Figura 11. Equivalência entre cada uma das técnicas de detecção utilizadas para o AdVH-2 e o NVM-1.

1.5. Ensaio de bioacumulação dos patógenos virais pelas ostras

Os aquários foram semeados com concentrações conhecidas de suspensão viral para a análise do tempo ideal de bioacumulação viral pelas ostras. Optou-se por trabalhar com cada um dos vírus (AdVH-2 e NVM-1) em experimentos distintos de forma que não houvesse interferência nas dinâmicas de captação viral. Utilizou-se 100 mL de suspensão viral para cada um dos vírus estudados. Dessa forma, de acordo com o título de cada um dos vírus, foi adicionado no aquário a quantidade total de $2,0 \times 10^{11}$ UFP de AdVH-2 e $5,0 \times 10^8$ UFP de NVM-1.

O resultado da taxa de bioacumulação de cada vírus pelas ostras está representado na figura 12. O comportamento de retenção dos vírus pelos animais foi diferente para os dois modelos virais utilizados. Enquanto que o NVM-1 apresentou um aumento de concentração nos tecidos digestivos das ostras à medida que aumentava o tempo de contato dos animais com a água contaminada (figura 12B), o AdVH teve o seu pico de concentração nos tecidos digestivos nos tempos de 8h e 12h, e após isso, começou a observar-se um decaimento da concentração dos vírus nesses tecidos, demonstrando claramente que os mesmos estavam sendo liberados pelos animais (figura 12A). Esse resultado se manteve para as duas técnicas de detecção utilizadas para cada um dos vírus.

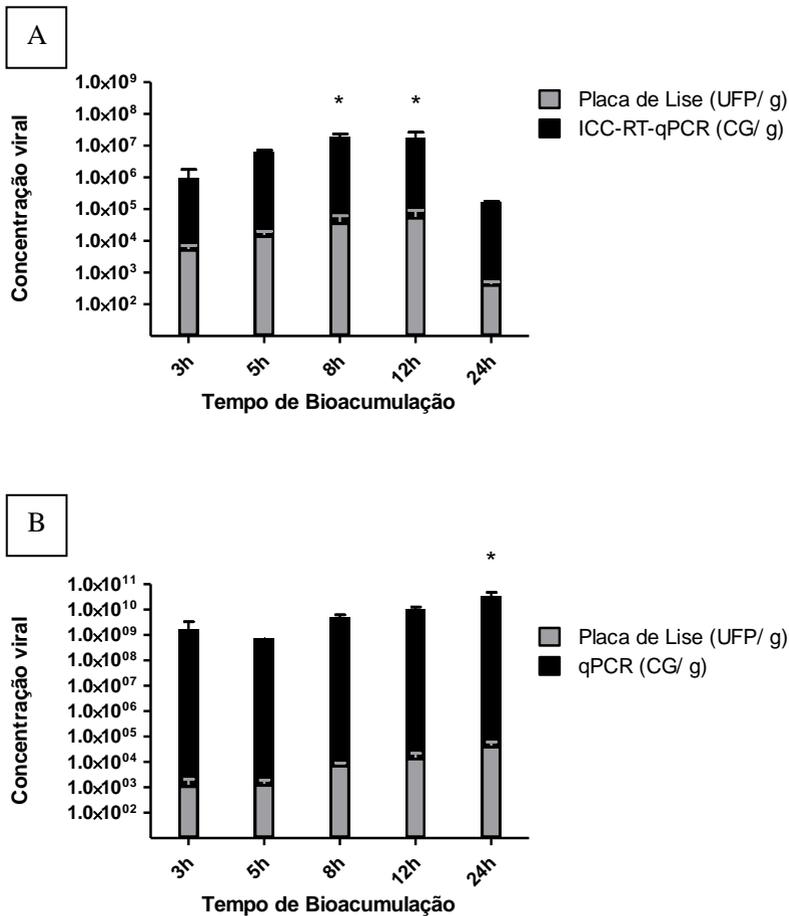


Figura 12. Comportamento temporal da bioacumulação dos vírus em ostras *Crassostrea gigas*. A) O AdVH-2 atingiu o seu pico de concentração viral após 8h e 12h de bioacumulação, e houve uma eliminação viral após esse período. B) Para o NVM-1, a concentração viral no interior dos tecidos das ostras foi aumentando com o tempo de bioacumulação, atingindo seu ápice após 24h de bioacumulação.

Os tempos de 8h e 12h de bioacumulação de AdvH-2 não apresentaram diferença significativa entre si, porém apresentaram uma diferença significativa entre os demais tempos de bioacumulação ($p < 0,01$). Ou seja, qualquer um dos dois tempos poderia ser utilizado para se alcançar a maior contaminação viral no tecido das ostras. No período de 24h, a bioacumulação foi significativamente menor que nos demais tempos testados.

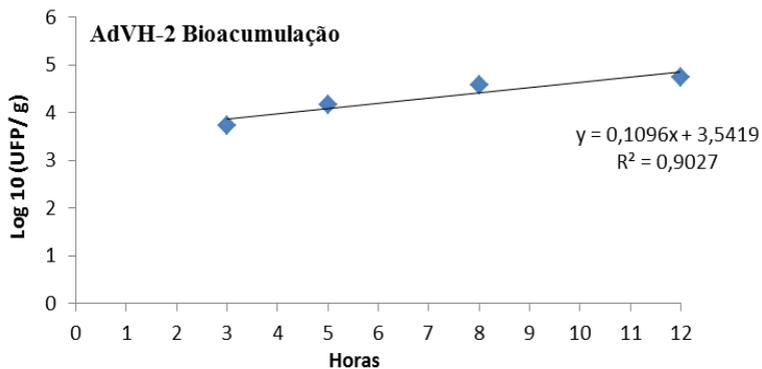
Para o NVM-1, 24h foi o tempo que observou-se a maior captação viral, sendo que esse tempo apresentou uma diferença estatística significativa frente aos demais testados ($p < 0,016$).

A eficiência do processo de bioacumulação dos vírus pelas ostras foi diferente quando se comparou os dois modelos virais. Como o título do AdvH-2 ($2,0 \times 10^9$ UFP/ mL) era maior que o NVM-1 ($5,0 \times 10^6$ UFP/ mL), esperava-se que no final de cada experimento fosse encontrado uma concentração maior de AdvH-2 do que de NVM-1 no tecido dos animais, o que não aconteceu. A técnica de placa de lise foi a técnica comum entre os dois vírus, e no tempo de maior captação de AdvH-2 (12h) encontrou-se uma média de $5,65 \times 10^4$ UFP/g , e de maior concentração de NVM-1 (24h), $4,28 \times 10^4$ UFP/g . Ao ser feita a relação da quantidade de vírus adicionada ao aquário com a encontrada no final nos animais, foi possível determinar que o NVM-1 teve uma eficiência de bioacumulação no tecido das ostras 1.000 vezes maior que o AdvH-2.

O processo de bioacumulação permitiu a detecção por todas as técnicas para os dois modelos virais de no mínimo 10^4 partículas virais/g. Esse é um importante ponto em estudos de inativação e desinfecção viral, uma vez que um decaimento viral de 4 logs significa uma inativação de 99,99% dos vírus ali presentes.

Foi realizada uma análise de tendência do aumento da concentração viral no interior dos animais (Figura 13). Até as 12h de bioacumulação o AdVH-2 apresentou um aumento com tendência linear da concentração viral, com $r^2 = 0,97$. Após 12 h houve um decaimento viral e esse tempo não foi incluído na análise. O NVM-1 também apresentou um aumento com tendência linear, porém até as 24h analisadas, com $r^2 = 0,8549$.

A) AdVH-2



B) NVM-1

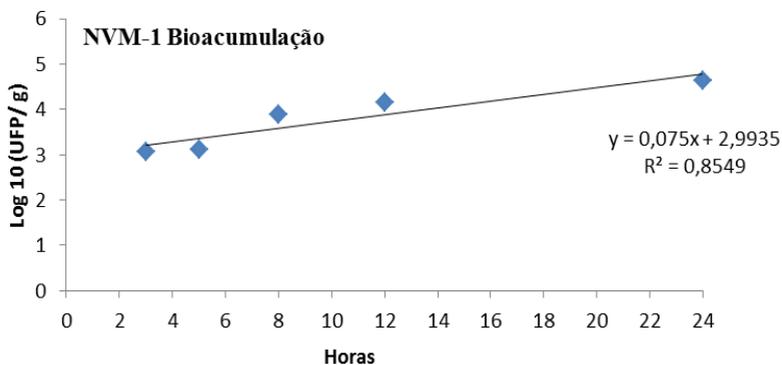


Figura 13. Comportamento temporal da bioacumulação dos vírus AdVH-2 (A) e NVM-1 (B) em ostras *Crassostrea gigas*.

1.6. Ensaio de estabilidade viral em ostras resfriadas a 4°C

A figura 14 mostra os resultados obtidos para a estabilidade dos vírus em ostras estocadas a 4°C. Não houve diferença estatística para nenhum dos vírus entre as amostras analisadas logo após serem bioacumuladas com as amostras estocadas na geladeira, mostrando uma grande estabilidade dos vírus nos tecidos das ostras. Isso comprovou que estocar as ostras a 4°C em nada interfere na estabilidade dos vírus sendo que os mesmos permanecem infecciosos. O tempo limite em que foi possível avaliar a estabilidade viral nos animais foi de 96h, que foi o período máximo de sobrevivência dos animais nessa temperatura. Após esse tempo, as ostras começavam a perder a vitalidade, abrindo as valvas. Nas amostras contaminadas com AdVH-2, apenas para uma das três repetições foi possível a avaliação até 96h; nas outras repetições, os animais sobreviveram até 72h. Tanto a detecção de genoma como a detecção de vírus infecciosos se manteve constante para o NVM-1.

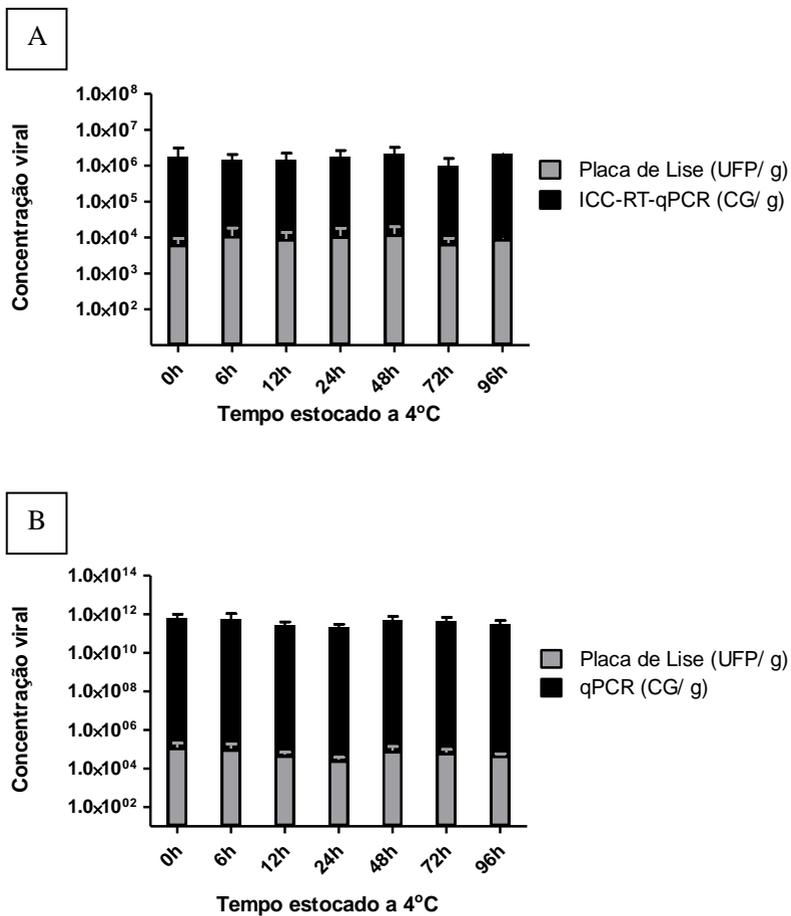


Figura 14. Estabilidade dos vírus em ostras *Crassostrea gigas* estocadas a 4°C por até 96h. Não foi observado nenhum decaimento nos dois modelos virais avaliados. A) AdVH-2 e B) NVM-1.

1.7. Estabilidade dos vírus em ostras cozidas “ao bafo”

As ostras contaminadas artificialmente com cada um dos vírus foram cozidas “ao bafo” para se avaliar a estabilidade termal dos vírus nos tecidos digestivos durante o cozimento. As ostras foram colocadas na panela com água e a temperatura da água foi medida até que chegasse a 100°C. A partir da fervura da água, foi medido quanto tempo levava para que todos os animais estivessem com as conchas abertas. O tempo de cozimento variou entre cada um dos experimentos, porém não ultrapassou os 6 min de cozimento. A temperatura interna dos animais foi medida logo após a retirada da panela. Os resultados estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Resultado da estabilidade viral em ostras cozidas “ao bafo”.

AdVH-2						
	Tempo cozimento	Média Temp. interna	Placa de Lise (UFP/ g)		ICC-RT-qPCR(CG/ g)	
			Pré cozimento	Pós cozimento	Pré cozimento	Pós cozimento
1ª repetição	6 min.	90°C	$2,1 \times 10^4$	ND	$7,3 \times 10^5$	ND
2ª repetição	2 min. 5 seg.	85°C	$9,2 \times 10^4$	ND	$3,7 \times 10^6$	ND
3ª repetição	5 min. 12 seg.	92,5°C	$1,0 \times 10^4$	ND	$1,4 \times 10^6$	ND

NVM-1						
	Tempo cozimento	Média Temp. interna	Placa de Lise (UFP/ g)		qPCR (CG/ g)	
			Pré cozimento	Pós cozimento	Pré cozimento	Pós cozimento
1ª repetição	6 min. 15 seg.	93,25°C	$1,4 \times 10^5$	ND	$3,0 \times 10^{11}$	$1,0 \times 10^8$

*ND: Não Detectado.

Os resultados do experimento de cozimento “ao bafo” demonstram que, em todos os experimentos realizados, o procedimento de cozinhar as ostras foi eficiente em inativar todos os vírus presentes nos tecidos dos animais. Só foi possível realizar uma repetição do experimento com o NVM-1, e esse resultado demonstra a importância de se utilizar métodos que infiram a infecciosidade viral sobre métodos de detecção de genoma, uma vez que ainda foi possível se detectar o genoma viral mesmo quando não se havia mais vírus infecciosos presentes nas amostras.

1.8. Inativação viral pela técnica da depuração com luz U.V.

Inicialmente, os experimentos de inativação pela técnica de depuração com luz U.V. foram realizados com os tempos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. Esses tempos foram baseados em outro estudo do laboratório que avaliou a inativação viral através exclusivamente de técnicas de detecção de genoma (qPCR) e não de vírus infecciosos (SOUZA et al., 2013). Neste momento, utilizou-se a técnica de placa de lise para avaliar eficiência da depuração para o AdVH-2, resultado que se encontra na figura 15. Os dois tanques utilizados no trabalho, com e sem luz U.V. foram eficientes para inativar os vírus infecciosos rapidamente. Entretanto, em 24h de depuração, o tanque com luz U.V. teve uma redução de 2,92 logs (aproximadamente 99,9%) de vírus infecciosos, e em 48h não houve mais detecção de partículas infecciosas. Para o tanque sem U.V., 48h de depuração foi necessária

para inativar 2,65 logs e após esse período não foi detectado mais vírus infecciosos. Utilizando o teste estatístico 2way ANOVA, foi possível comprovar que a redução viral foi significativa, com $p < 0,001$.

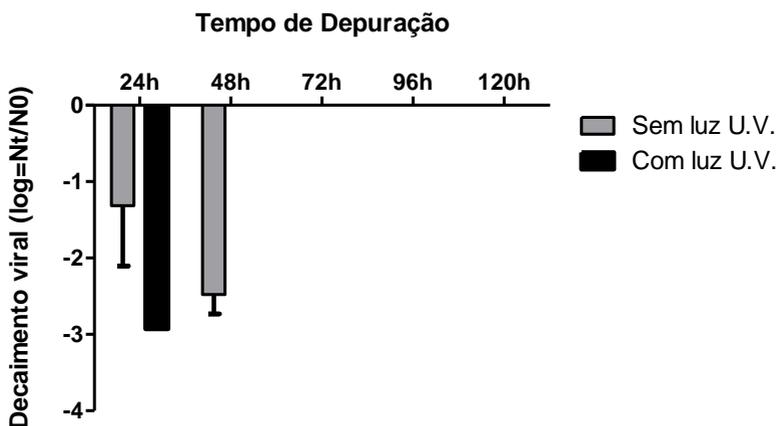


Figura 15. Decaimento de AdvH-2 em ostras submetidas ao processo de depuração analisados pela técnica de placa de lise. A lâmpada U.V. foi capaz de reduzir 2,92 logs de vírus infecciosos presentes nas ostras. No tanque sem U.V., foram necessárias 48h de depuração para inativar 2,65 logs. Após esses períodos, não houve mais detecção de vírus infecciosos no interior do tecido das ostras.

Com o rápido decaimento apresentado pelo AdvH-2 no processo de depuração, decidiu-se repetir os experimentos de depuração reduzindo os tempos avaliados para 6h, 12h, 24h, 36h, 48h e 72h de depuração. Entretanto, devido a problemas técnicos e logísticos do laboratório, os ensaios de depuração só puderam ser reiniciados no final de outubro de 2014. O ano de 2014 teve um inverno brando, e já na primavera a temperatura ambiente estava elevada. Dessa forma, é possível que as ostras coletadas já estivessem entrando em período reprodutivo. Ostras em período reprodutivo tendem a ficar mais sensíveis a estresses e variações ambientais. Apesar de terem sido realizadas incontáveis tentativas de realização da depuração, nenhum experimento teve sucesso, uma vez que em todos os experimentos as ostras entraram em processo de desova. Na maioria das tentativas, a desova ocorria no momento da contaminação artificial dos aquários com a suspensão viral, e os animais morriam ao serem transferidos para os tanques de depuração. Quando a bioacumulação ocorria com sucesso, as ostras desovavam logo após serem alocadas nos tanques de depuração. Nem sempre ocorria a morte de todos os animais, porém ostras que desovam no tanque não podem ser consideradas depuradas, uma vez que toda sua fisiologia encontra-se alterada e não há garantia que o resultado seja confiável (FAO, 2008). Dessa forma esses animais também eram descartados. Diante desse fato, não foi possível realizar a repetição dos ensaios de depuração para os AdvH-2, e a depuração para os NVM-1 em tempo hábil para serem incluídos neste trabalho.

6. DISCUSSÃO

O uso de técnicas que infiram a infecciosidade viral em contaminantes do meio ambiente tem se tornado cada vez mais importante, uma vez que patógenos virais vem sendo detectados em amostras de moluscos destinados ao consumo humano, e a liberação de dados baseados somente na detecção do genoma podem ser alarmantes e comprometer o desenvolvimento dessa atividade. Acreditamos que os dois modelos virais que foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho podem ajudar a suprir a escassez de dados referentes à infecciosidade dos vírus detectados bem como a real eficiência dos sistemas de desinfecção, uma vez que, para ambos os vírus, existem metodologias bem padronizadas de cultura celular *in vitro* que visam a detecção desses vírus somente quando os mesmos forem capazes de infectar células e eventualmente serem responsáveis por disseminar doenças.

Estudos que utilizam técnicas de detecção de vírus infecciosos nas amostras ambientais devem ter o cuidado de realizar os ensaios imediatamente após as etapas de concentração e eluição dos mesmos, para que seja evitada a possível perda da infecciosidade viral devido à estocagem das amostras. Olson, Axler e Hicks (2004) avaliaram a estabilidade do bacteriófago MS2 em amostras de esgoto tratadas e não tratadas em diversas temperaturas. Os resultados que eles obtiveram mostram que há perda de infecciosidade em qualquer temperatura de estocagem por todos os tempos avaliados. Se houver a necessidade de estocagem por períodos de até uma semana, a temperatura na qual menos partículas infecciosas são perdidas é de 4°C. Já a temperatura de

-80°C é a melhor para estocagens mais longas. A formação de cristais de gelo que rompem os capsídeos virais é a principal razão para a perda inicial de viabilidade viral, o que é agravado em amostras estocadas a -20°C. Dessa forma, este trabalho teve o cuidado de nunca estocar as amostras antes dos ensaios de detecção, para impedir que fatores externos àqueles planejados nos experimentos influenciassem nos resultados finais.

Por possuírem técnicas confiáveis de detecção de vírus infecciosos *in vitro*, os vírus AdvH-2 e NVM-1 foram selecionados para o desenvolvimento desse trabalho. Foram comparadas duas técnicas envolvendo infecção celular *in vitro*: placa de lise e PCR integrado à cultura celular (ICC-RT-qPCR) para o AdvH-2, e as técnicas de placa de lise e de detecção de genomas por qPCR para o NVM-1, nesse último caso comparando-se uma técnica exclusivamente celular com uma exclusivamente molecular.

Na avaliação do AdvH-2, a técnica de ICC-RT-qPCR apresentou uma maior capacidade de detectar vírus infecciosos do que a técnica de placa de lise para amostras de tecidos de ostras, sendo que encontrou-se uma média de $3,6 \times 10^2$ a mais em CG do que UFP. Fongaro e colaboradores (2013), que padronizou a técnica de ICC-RT-qPCR utilizada neste trabalho, encontrou um resultado similar ao comparar as duas técnicas para amostras de recuperação viral em água de consumo. O ICC-RT-qPCR é um método que combina a alta sensibilidade da cultura celular com a alta especificidade da PCR, e minimiza as deficiências da cultura celular de baixa especificidade e longos períodos de incubação (FONGARO et al., 2014). Essa técnica baseia-se na utilização do mRNA viral que foi transcrito durante a

replicação do vírus no interior da célula infectada, minimizando o período de incubação para verificação de efeito citopático ou lise celular e ainda garantindo que apenas o mRNA de vírus efetivamente em estágio de replicação intracelular seja reversamente transcrito. Além disso, a placa de lise é subjetiva por ser dependente do olho do leitor, já que a contagem das placas é feita a olho nu, podendo ocorrer falhas de contagem e placas muito pequenas para serem visualizadas. Já a técnica de ICC-RT-qPCR amplifica o resultado para que o equipamento possa detectar todos os sinais emitidos. Entretanto, os custos da técnica são mais elevados quando comparados ao ensaio de placa de lise, uma vez que, além de uma estrutura física de cultura celular, é necessária a estrutura de equipamentos e salas que a técnica de PCR requer (FONGARO et al., 2014)

Para as técnicas utilizadas na detecção do NVM-1, a técnica de qPCR apresentou uma diferença muito maior quando comparada à técnica de placa de lise, sendo que 1 UFP foi equivalente à $8,2 \times 10^5$ CG. Essa diferença era esperada, uma vez que a técnica de qPCR quantifica todos os genomas presentes nas amostras, e a placa de lise apenas os vírus infecciosos. Esse resultado comprovou a importância em não se emitir laudos de detecção de contaminação viral somente baseados em técnicas moleculares, uma vez que os resultados podem ser alarmantes e sem real importância epidemiológica. Além disso, trabalhos que analisem a eficácia de metodologias de inativação viral podem ter seus resultados subestimados uma vez que o genoma viral pode permanecer nas amostras quando não há mais vírus infecciosos. Porém, em caso de vírus que não são adaptados ao cultivo *in vitro*, como por exemplo os norovírus humano (que apenas recentemente teve

cultura celular estabelecida e ainda não é rotina nos laboratórios), os rotavírus humanos e os adenovírus entéricos do grupo F, as técnicas moleculares acabam sendo a única opção disponível. Estudos baseados na detecção de genoma viral também possuem relevância em saúde pública, uma vez que indicam que houve contaminação do meio ambiente por esgoto doméstico e que isso pode significar um risco para a saúde da população.

Entretanto, metodologias moleculares são altamente importantes em investigações epidemiológicas para se descobrir a fonte de um surto de doenças. Um surto de hepatite A foi investigado na França em 2007 e análises de genotipagem e filogenética puderam concluir que todos os casos foram contraídos a partir de ostras contaminadas originadas da mesma fazenda no litoral do país, e medidas de prevenção puderam ser tomadas (GUILLOIS-BECCEL et al., 2009). O mesmo pode ser realizado em surtos de gastroenterites causados por norovírus através do consumo de ostras contaminadas no país de Gales em 2012 (FITZGERALD et al., 2014), em uma casa de saúde na França em 2012 (LOURY et al., 2015), em um restaurante nos Estados Unidos em 2009 (ALFANO-SOBSEY et al., 2012) e diversos outros. Apesar da ausência de metodologias de vírus infecciosos, esses estudos puderam vincular a fonte de contaminação com o surto. Dessa forma, de acordo com o objetivo do estudo, técnicas moleculares ou de detecção de vírus infecciosos podem ser utilizadas.

Para os ensaios de contaminação artificial das ostras em laboratório, foi necessário estudar e comparar o comportamento de bioacumulação dos dois modelos virais uma vez que não se encontrou na literatura dados que servissem de base para este trabalho. Trabalhos

que incluem a contaminação artificial de moluscos com vírus, em geral, utilizam os tempos padrões de 1h e 24h de bioacumulação. A literatura carece de informações sobre as diferentes dinâmicas de captação viral pelos moluscos bivalves. Nappier, Graczyk e Schwab (2008) compararam a eficiência de bioacumulação por 24h de diversos vírus entéricos. Grodzki e colaboradores (2014) bioacumularam vírus da hepatite E por 24h em diferentes espécies de moluscos. Maalouf e colaboradores (2010) deixou as ostras em contato com os norovírus humanos GI e GII também por 24h. O mesmo grupo comparou a bioacumulação por 1h e 24h entre norovirus humanos GI.1, GII.3 e GII.4, e em todos os experimentos encontrou uma concentração maior de vírus após 24h que após 1h de bioacumulação (MAALOUF et al., 2011). Dessa forma decidiu-se, no presente trabalho, otimizar uma curva de bioacumulação do AdvH-1 e NVM-1 para se estudar mais cuidadosamente a cinética de captação e concentração desses vírus nos tecidos das ostras. Além disso, como posteriormente seriam realizados ensaios de estabilidade e inativação viral seria necessário garantir que as ostras estariam contaminadas com pelo menos 4 logs de concentração viral o que permitiria verificar posteriormente a eficiência de desinfecção através da diminuição de 1, 2, 3 ou 4 logs (equivalendo a 90, 99, 99,9 ou 99,99% de inativação respectivamente). Assim, foram avaliados os tempos de 3h, 5h, 8h, 12h e 24h de bioacumulação viral pelas ostras com os respectivos vírus em experimentos distintos.

Como era esperado, o comportamento do AdvH-2 e do NVM-1, vírus de genoma DNA e RNA, respectivamente, foi diferente quando em contato com as ostras (Figura 12). Sabe-se que diferentes vírus podem ter diferentes dinâmicas de bioacumulação em ostras

artificialmente contaminadas (NAPPIER, GRACZYK e SCHWAB, 2008). A maior concentração de AdvH-2 foi encontrada nos tempos de 8h e 12h, sendo esses tempos estatisticamente diferentes dos demais ($p < 0,01$), e o NVM-1 teve sua maior concentração encontrada após 24h, também significativamente diferente dos demais ($p < 0,016$).

Além disso, a capacidade das ostras de acumularem em seus tecidos os vírus disponíveis na água do aquário foi diferente para os dois modelos virais. Foi adicionado no aquário 3 logs a mais de AdvH-2 que de NVM-1, mas isso não teve um reflexo na concentração encontrada nos animais. A concentração encontrada nos tempos ideais de bioacumulação (8h e 12h para o AdvH-2 e 24h para o NVM-1) foi semelhante entre os vírus: $5,65 \times 10^4$ UFP/g para o AdvH-2 e $4,28 \times 10^4$ UFP /g para o NVM-1. É provável que esses modelos virais tenham comportamentos diferentes em relação à interação da partícula viral com o tecido das ostras, porém existem poucos trabalhos na literatura sobre esse assunto.

Aparentemente a captação do AdvH-2 pelos animais ou é um ato passivo realizado pelos moluscos, ou seja, as partículas virais são captadas pelo processo de filtração, passam pelo trato digestivo e são eliminadas junto com as pseudofeces dos animais sem interação com ligantes dos tecidos dos animais; ou possui uma ligação fraca com esses antígenos. Em humanos, os adenovírus, usam o carboidrato sulfato de heparana como co-receptor para se aderirem à membrana da célula (LE PENDU et al., 2006). O sulfato de heparana já foi encontrado em tecidos de outras espécies de moluscos, *Pomacea* sp (lesma), *Tagelus gibbus* (marisco) e *Anomalocardia brasiliiana* (berbigão), e sua semelhança com os presentes em mamíferos foi comprovada (NADER

et al., 1999). Em *A. brasiliiana*, esse receptor e outros similares estão presentes em maior concentração em tecidos mais externos do animal, como o manto, pé e as brânquias, do que em tecidos internos como o tecido digestivo (NADER et al., 1999). Se o mesmo ocorrer em ostras, isso poderia explicar porque mesmo disponibilizando uma concentração maior de adenovírus do que de norovírus às ostras, a concentração encontrada na glândula digestiva dos animais foi semelhante. Os adenovírus poderiam estar se ligando a outros tecidos dos animais além do digestivo. Entretanto, não há estudos que indiquem a presença desses receptores ou de receptores similares nas ostras, ou se há uma ligação entre esse tipo de vírus e o tecido da ostra.

Sabe-se que os adenovírus possuem a capacidade de se agregarem em partículas presentes na água, permanecendo protegidos da inativação por fatores estressantes do meio ambiente (BOSH, 1998). Nesse caso, as partículas virais podem ter permanecido agregadas às pseudofezes das ostras e terem sido, dessa maneira, decantadas no fundo do aquário, ficando indisponíveis para re-captura pelos animais. Dessa forma, ao liberar os vírus de volta para o aquários, as ostras não foram capazes de bioacumulá-los novamente, o que explicaria a baixa concentração de vírus encontrada nos tecidos das ostras em relação à quantidade adicionada no aquário. Entretanto, como não foi avaliada a presença de adenovírus nas pseudofezes decantadas no fundo do aquário, não se pode afirmar que isso tenha efetivamente ocorrido.

Com relação aos norovírus, sabe-se que resíduos de ácido siálico possuem um importante papel na ligação do NVM à célula hospedeira (TAUBE et al., 2009), e que resíduos semelhantes estão presentes no sistema sanguíneo Lewis em humanos e são utilizados

como antígenos pelos norovírus humanos na infecção celular (LE GUYADER et al., 2006; 2012). Porém, não há estudos que indiquem em quais receptores os NVM poderiam se ligar no tecido da ostra. Possivelmente, a semelhança da ligação entre os norovírus humanos e os murinos em seus respectivos hospedeiros pode significar uma ligação também semelhante ao tecido das ostras, porém mais estudos são necessários para se confirmar esta hipótese.

O que pode-se confirmar a partir dos experimentos realizados nesse trabalho é que mesmo disponibilizando-se uma quantidade superior de AdvH-2 às ostras, essas não foram capazes de bioacumular mais desses patógenos quando comparados aos NVM-1. Além disso, foi confirmada a importância de se determinar o tempo ideal de bioacumulação dos dois modelos virais uma vez que o resultado entre eles foi diferente, sendo 8h e 12h os tempos ideais de bioacumulação para os AdvH-2 e 24h para os NVM-1.

Os vírus entéricos possuem a característica comum de serem resistentes em amostras ambientais sujeitas às mais diversas situações adversas, como variações de pH, temperatura e incidência de luz solar (MENA & GERBA, 2009). As ostras são mantidas refrigeradas no comércio até o momento da venda, e nas residências até o seu consumo para que sejam mantidas frescas e vivas. A avaliação da estabilidade dos vírus nas ostras mantidas nessas condições foi realizada com o objetivo de se confirmar essa alta estabilidade viral ao longo do tempo quando os animais são estocados a 4°C. Nenhum decaimento de vírus infecciosos foi observado nessas amostras, e os genomas de NVM-1 também se mostraram estáveis ao longo do tempo.

DiGirolamo, Liston e Matches (1970) estudaram a sobrevivência de poliovírus em ostras *Ostrea lurida* resfriadas. *O. lurida* continuou a ser avaliada mesmo após a morte dos animais. Após 5 dias (máximo de tempo que os animais são mantidos refrigerados comercialmente, segundo os autores), 75% dos vírus ainda estavam viáveis em *O. lurida*. Após 15 dias, mesmo os animais já em processo de decomposição, 40% do vírus ainda foram detectados. E após 30 dias, com as ostras altamente decompostas, 13% dos vírus ainda estavam viáveis. Greening, Dawson e Lewis (2001) também avaliaram a estabilidade de poliovírus, em mexilhões *Perna canaliculus*. Após 2 dias a 4°C, 81% dos vírus ainda estavam infecciosos.

Apesar da alta estabilidade viral durante a estocagem dos vírus em baixas temperaturas, os dois modelos virais utilizados neste trabalho não apresentaram resistência à temperaturas elevadas, como foi mostrado no experimento conduzido de cozimento das ostras “ao bafo”. Todos os vírus infecciosos presentes nas amostras foram inativados, restando apenas genomas do NVM-1 detectados por RT-qPCR nas amostras. Souza (2014) avaliou o decaimento de rotavírus em mexilhões cozidos em um prato típico francês pela técnica de placa de lise e qPCR, e encontrou resultados semelhantes ao do NVM deste trabalho. Após 4 min. de cozimento, nenhum vírus infeccioso foi mais detectado, enquanto o genoma viral ainda persistia na amostra.

O processamento de amostras de ostras por meio de tratamento térmico é recomendado em diversos países previamente ao consumo, constando inclusive no atual PNCMB. Logo após a apresentação da nova legislação aos maricultores em 2013, a EPAGRI realizou um evento envolvendo pesquisadores brasileiros e europeus da área. Foram

discutidas as medidas que o governo brasileiro deveria adotar para, no futuro, possibilitar a exportação de moluscos bivalves à Europa. Desse encontro, foi gerado um documento intitulado “Medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Européia” (EPAGRI, 2014b). Nesse documento consta o tratamento térmico atualmente recomendado pelos países europeus para inativação de patógenos em moluscos bivalves. A recomendação é que os animais sejam imersos em água fervente tempo suficiente para que sua temperatura interna não fique abaixo de 90°C, e que o cozimento seja realizado entre 3 a 5 minutos. Neste trabalho, apenas em uma réplica realizada, a temperatura interna dos animais ficou abaixo dos 90°C, e mesmo esse tempo foi capaz de inativar os vírus presentes nas ostras.

DiGirolamo, Liston e Matches (1970) avaliaram o decaimento de poliovírus em ostras *C. gigas* artificialmente contaminadas e cozidas no vapor. Amostras foram retiradas a cada 5 min por até 30 min. Após 5 min, com a temperatura no interior do animal de 38,4°C, houve 1 log de decaimento viral, e após 30 min, com a temperatura interna de 93,7°C, apenas 7% dos vírus ainda estavam viáveis. O mesmo trabalho também avaliou o decaimento de poliovírus em um prato de cozido de ostras em leite, e após 8 min de cozimento, ainda se encontrou 10% de vírus viáveis.

Slomka e Appleton (1998) comparou a inativação do calicivírus felino (outro modelo viral do norovírus humano) e o vírus da hepatite A em berbigões submersos em água a 100°C. Após 1 min de cozimento, não se detectou mais vírus infecciosos na amostra, e após 2 min, o RNA viral também deixou de ser detectado.

Todos esses estudos e mais o presente experimento realizado neste trabalho comprovaram a eficácia do cozimento na inativação de patógenos virais de moluscos bivalves previamente ao consumo.

A desinfecção dos moluscos bivalves previamente ao consumo também pode ser realizada pela técnica de depuração. Essa técnica visa fornecer um produto fresco e livre de contaminações ao consumidor, minimizando o risco de doenças relacionadas ao seu consumo. O PNCMB possui a exigência de depuração de animais quando há a detecção de *E. coli* em níveis medianos (> 230 e < 46.000 NMP *E. coli*), porém não é fornecida uma descrição do protocolo a ser adotado nesse caso.

Estudos já demonstraram a eficácia da depuração para a inativação de patógenos bacterianos (CORRÊA et al., 2007; LOVE, LOVELACE & SOBSEY, 2010), e inclusive, o processo de depuração de molusco foi desenvolvido como um dos métodos na prevenção da transmissão por ostras da bactéria *Salmonella typhi*, causadora da febre tifóide, no final do século 19 (LEES, YOUNGER & DORÉ, 2010). Entretanto, alguns trabalhos demonstram que ocorre uma eliminação diferencial e preferencial de patógenos bacterianos em relação à patógenos virais (DORÉ & LEES, 1995; MARINO et al., 2005).

Um estudo prévio realizado no Laboratório de Virologia Aplicada analisou a dinâmica de depuração de ostras provenientes de diferentes locais da Grande Florianópolis, artificialmente contaminadas no laboratório com AdvH-2 e NVM-1, porém utilizando somente técnicas de detecção de genoma viral. O genoma de AdvH-2 foi detectado até o final do ensaio (7 dias), e o genoma de NVM-1 sofreu uma redução de mais de 2 logs (99%) já no quarto dia de depuração

(SOUZA et al., 2013). Como já foi discutido previamente, a detecção de genomas não infere sobre a infecciosidade viral e a real capacidade destes patógenos de causarem uma doença. Portanto, houve a necessidade de se avaliar o real comportamento desses patógenos durante a depuração no que se refere à sua real inativação.

Dessa forma, primeiramente avaliou-se a eficácia da radiação U.V. na inativação de patógenos virais semeados na água do mar contaminada com AdvH e NVM em depuradoras de moluscos bivalves sem animais (GARCIA et al., 2014). O tanque acoplado com lâmpada U.V. se mostrou altamente eficiente para inativar os dois vírus, mostrando uma inativação de 4 logs (99,99%) em 24h de tratamento. Neste trabalho, mesmo a ausência de radiação U.V. também mostrou inativação viral de 4 logs, porém em períodos mais longos (48h).

Dessa forma, no presente trabalho, verificou-se qual seria o comportamento desses vírus agora no interior dos moluscos bivalves nesses tanques de depuração na ausência e na presença da radiação U.V. Os resultados encontrados para o AdvH-2 mostraram que o processo de depuração foi eficiente para inativar esse patógeno quando o mesmo era eliminado dos animais durante o processo de filtração. A passagem da água através da lâmpada U.V. teve uma eficácia de inativação de 2,92 log do AdvH-2 em 24h (Figura 15). Mesmo a ausência da radiação U.V. também mostrou eficácia de inativação do AdvH-2, porém numa proporção menor. Essa desinfecção pode ter sido consequência da simples eliminação desses patógenos pelas ostras na água, uma vez que as mesmas estavam em um ambiente controlado com água limpa e filtrada. Os vírus provavelmente foram eliminados pelos animais e permaneceram na água do tanque. Apesar desse resultado, de forma

nenhuma se recomenda o emprego de sistemas de depuração fechados desprovidos de um sistema de desinfecção, uma vez que pode haver não só a contaminação cruzada de animais no interior do tanque, mas também a contaminação do ambiente uma vez que essa água é descartada ao final do processo (FAO, 2008).

Esse trabalho forneceu evidências que comprovam a alta eficácia do processo de depuração, uma vez que os AdvH são relatados como sendo um dos patógenos virais mais resistentes à radiação U.V. quando comparados a outros vírus de genoma DNA ou RNA de dupla fita (MENA & GERBA, 2009). Corrêa e colaboradores (2012) comparou a inativação de AdvH-5 e o vírus da hepatite A em tanques de depuração com luz U.V. Foi encontrado AdvH-5 infecciosos até 72h de depuração e sua total inativação aconteceu após 96h de depuração, ao passo que o vírus da hepatite A foi inativado após 24h de tratamento, mostrando a maior resistência do AdvH-5, vírus de genoma DNA, sobre o vírus da hepatite A, vírus de genoma RNA. O tanque de depuração empregado pelos autores tinha a capacidade de 1.000L de água e 200 dz de ostras, ao passo que o tanque empregado no presente trabalho tinha a capacidade de 300L de água e 50 dz de ostras. Portanto, isso demonstra que, apesar da radiação U.V. ser eficiente na completa inativação dos patógenos no processo de depuração, esse tempo deve ser otimizado de acordo com a capacidade do tanque e também do número de animais alocados nos mesmos.

Como, no presente trabalho, ocorreu a completa inativação do AdvH-2 após 24h de depuração, decidiu-se verificar a eficiência do processo em tempos menores de depuração, para que pudesse se estabelecer um modelo matemático de decaimento viral. Além disso,

essa informação é importante para a indústria e para os restaurantes, uma vez que a demanda de consumo dos animais, principalmente na época de alto fluxo de turistas, é muito alta e, quanto menor o tempo necessário para o processo de depuração ser eficiente, melhor. Entretanto, as repetições só puderam ser realizadas no final da primavera, período em que a temperatura da água dos locais de cultivo já se encontrava alta, o que estimula os animais a entrarem em período reprodutivo. Durante esse período, as ostras se tornam mais sensíveis a variações e estresses causados pela relocação e manipulação ao longo dos experimentos, e esse estresse estimula os animais a desovarem. Nas inúmeras tentativas realizadas, as ostras desovaram, ou no momento da contaminação dos aquários com fluido viral, ou ao serem transferidas dos aquários para os tanques de depuração.

Dentre inúmeros fatores, a variação da temperatura parece ser o fator que mais influencia no ciclo reprodutivo das ostras. Esse ciclo obedece a um padrão sazonal, com i) início da gametogênese no inverno quando a temperatura da água é baixa, ii) fase ativa da gametogênese (estágio de crescimento) durante a primavera com o aumento da temperatura, iii) maturidade e desova no verão e iv) período de reabsorção no outono quando a temperatura da água volta a diminuir (estágio de degeneração) (FABIOUX et al., 2005). O momento do período reprodutivo das ostras *C. gigas* que ocorre no verão é considerado um dos períodos mais críticos do ano durante a produção, e eventos de mortalidades maciças são registrados em todo o mundo (LI et al., 2009). As “mortalidade de verão”, como são chamadas, são causadas por uma combinação de fatores de estresse biológicos e ambientais agindo em combinação com patógenos microbianos (SAMAIN et al.,

2007). Na França, a produção de ostras sofre com “mortalidades de verão” periódicas no decorrer dos últimos 20 anos (LI et al., 2009). Atualmente, as “mortalidades de verão” se tornaram uma séria ameaça para a sustentabilidade econômica do cultivo de ostras (SCHMITT et al., 2011). Ainda não há registro de eventos que possam ser considerados “mortalidades de verão” nos cultivos brasileiros, entretanto esse período é considerado crítico pelos produtores e requer cuidados.

Com o intuito de reduzir a perda econômica que as “mortalidades de verão” geram em todo o mundo, as vantagens de desenvolver ostras triplóides (naturalmente inférteis) estão recentemente sendo exploradas. A produção comercial de ostras triplóides começou em 1985 na América do Norte, e em 2000 representou mais de 30% de todas as ostras *C. gigas* lá cultivadas (NELLY, 2002). A triploidia pode ser produzida de duas formas: i) pela indução por tratamentos físicos ou químicos que retêm um corpo polar no início da divisão celular do ovo fertilizado, resultando em núcleos com um par a mais de cromossomos, ou ii) no cruzamento de machos tetraplóides (que são férteis) com fêmeas diplóides (GAGNAIRE et al., 2006). *C. gigas* triplóides apresentam um desenvolvimento das gônadas reduzido durante a primavera e verão, o que significa que mais energia é disponível para o crescimento somático (NELLY, 2002). O custo energético do metabolismo de ostras triploides é menor, tornando-as mais resistentes à condições estressantes, o que pôde ser comprovado por um estudo realizado em campo que encontrou uma menor mortalidade de ostras triplóides quando comparadas com ostras diplóides durante um surto de mortalidade na França (GAGNAIRE et al., 2006). Os autores assumem

que, durante o período reprodutivo, o gasto energético de ostras diplóides é voltado para a produção de gametas, ficando o sistema de defesa desses animais prejudicado. Como ostras triplóides não produzem gametas, há mais energia disponível para mecanismos de defesa e atividade de hemócitos. Dessa forma, ostras triplóides crescem mais rápido e além de serem maiores que ostras diplóides, podem ser depuradas em qualquer época do ano, sem risco de morte ou ovulação.

A produção de ostras triplóides no Brasil ainda é pequena. Em Florianópolis, a empresa Blue Water Aquaculture, que auxiliou na criação dos tanques de depuração utilizados neste trabalho, já vende sementes de ostras triplóides, mas seu valor ainda é considerado alto pelo mercado.

Com o intuito de finalizar os experimentos de depuração deste trabalho, novos experimentos serão realizados a partir do outono desse ano para complementar os dados de depuração do AdvH-2 e determinar a eficiência da depuração para o NVM-1. Como há estudos que relatam que diferentes vírus podem apresentar diferentes taxas de eliminação pelos moluscos bivalves (LEES, 2000; CORRÊA et al., 2012), e como a interação entre os modelos virais deste trabalho com o tecido das ostras parece ser diferente, possivelmente haverá diferenças na inativação entre o AdvH-2 e o NVM-1.

2. SUMÁRIO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

1. Os dois modelos virais tiveram comportamentos diferentes ao serem acumulados artificialmente pelas ostras no laboratório, e apresentaram tempos ideais de bioacumulação diferentes. A técnica de ICC-RT-qPCR foi capaz de detectar mais AdvH-2 infecciosos que a técnica de placa de lise, e houve uma grande diferença entre a técnica de detecção de genomas qPCR e de vírus infecciosos placa de lise para o NVM-1.

2. Os dois modelos virais apresentaram alta estabilidade em amostras de ostras estocadas a 4°C, não havendo decaimento de vírus infecciosos ou de genomas virais por até 96h.

3. Ambos os vírus foram inativados no processo de cozimento das ostras “ao bafo”, o que reforça a eficácia do cozimento na prevenção de doenças.

4. O AdvH-2 teve um decaimento de 2,92 logs de vírus infecciosos no processo de depuração de ostras com uso da luz U.V., e após 48h não houve mais detecção viral. Após 48h de depuração no tanque sem luz U.V., houve uma redução de 2,65 logs vírus infecciosos, e após esse tempo não foi mais detectado vírus infeccioso.

3. CONCLUSÕES

A criação de um plano nacional de controle de moluscos bivalves pelo governo brasileiro representa um avanço para a atividade no Estado de Santa Catarina. Entretanto, este plano ainda apresenta falhas e uma delas é a de não incluir a exigência de detecção de patógenos virais, altamente relacionados a epidemias de gastroenterites e hepatites veiculadas pelo consumo de moluscos consumidos *in natura*. A outra falha é exigir o processo de depuração de animais contaminados, mas não fornecer um protocolo que padronize essa técnica entre os produtores. O uso de técnicas de cultura celular de detecção de patógenos virais no acompanhamento de amostras de ostras asseguram laudos confiáveis e de real importância na prevenção de doenças e no desenvolvimento sustentável dessa atividade.

A padronização dos ensaios de contaminação artificial de ostras com vírus possui grande importância nos estudos de inativação e estabilidade viral, uma vez que os ensaios realizados neste trabalho demonstram diferenças entre os dois modelos virais utilizados.

Além disso, esse trabalho comprovou a estabilidade dos vírus em amostras de ostras mantidas em condições usualmente utilizadas por estabelecimentos comerciais e residências previamente ao consumo, o que demonstra a importância de ingerir ostras *in natura*. O cozimento das ostras “ao bafo” se mostra como uma alternativa confiável na inativação de patógenos virais, uma vez que foi capaz de inativar todos os vírus presentes nas amostras.

Esperamos que esse trabalho auxilie a fornecer resultados que complementem a literatura e a legislação brasileira no uso dos processos de depuração de ostras

4. PERSPECTIVAS

Uma vez finalizados os experimentos de depuração para inativação dos vírus adenovírus humano e norovírus murino, pretende-se avaliar a cinética de bioacumulação e depuração em outros animais. Uma vez que a produção e comercialização de ostras triplóides tem crescido em todo o mundo, comparar o comportamento desses animais com relação aos animais naturais diplóides frente a contaminantes e processos de inativação torna-se de grande importância. Além disso, também pretende-se iniciar no laboratório trabalhos de pesquisas com outros moluscos bivalves consumidos e produzidos na Grande Florianópolis, como por exemplo os berbigões.

5. REFERÊNCIAS

ALFANO-SOBSEY, E.; SWEAT, D.; HALL, A.; et al. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. **Epidemiology and Infection**, v. 140, p. 276-282, 2012.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B. & WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v.37, p.149-157, 1992.

ATMAR, R. L. Noroviruses – State of the Art. **Food and Environmental Virology**, v. 2, p. 117-126, 2010.

BAE, J. & SCHWAB, K.J. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.477-484, 2008.

BAERT, L.; WOBUS, C.E.; COILLIE, E.V.; THACKRAY, L.B.; DEBEVERE, J.; UYTENDAELE, M. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.543-546, 2008.

BÁNYAI, K., MARTELLA, V., MELG, E.; KISFALI, P., PÉTERFI, Z., BENKÖ, M., MELEGH, B.; SZUCS, G. Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary. **New Microbiologic**, v.32, p.185-188, 2009.

BEECHAM, J. A Literature review on particle assimilation by molluscs and crustaceans. **Cefas Environment Report UK**, CEFAS, 2008.

BOOM, R.; SOL, C.J.A; SALIMANS, M.M.M., et al. Rapid and Simple Method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BOSCH, A.; XAVIER ABAD, F.; PINTÓ, R.M. Human pathogenic viruses in the marine environment. In: Belkin; Colwell (Eds). **Ocean and health: Human pathogenic viruses in the marine environment**. New York: Springer, p.109-131, 2005.

BOSH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **International Microbiology**, v. 1, p. 191–196, 1998.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. CONAMA, **Ministério do Meio Ambiente**, Governo Federal, Brasil, 2005.

BRASIL. Resolução n ° 12, de 2 de janeiro de 2001. ANVISA, **Ministério da Saúde**, Governo Federal, Brasil., 2001.

BRASIL . Instrução Normativa Interministerial Nº 7, 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. **Ministério da Pesca e Aquicultura**, Governo Federal, Brasil, 2012.

BUTT, A. A.; K. E. ALDRIDGE & C. V. SANDERS. Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, p. 201-212, 2004.

CALGUA, B.; BARARDI, C.R.M.; BOFILL-MAS, S.; et al. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC

polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. **Journal of Virological Methods**, v. 171, p. 1-7, 2011.

CARTER, M.J. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1354-1380, 2005.

CHARLES, K.J.; SHORE, J.; SELLWOOD, J.; LAVERICK, M.; HART, A.; PEDLEY, S. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1827-1837, 2009.

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.; SOUZA, D.S.M.; MORESCO, V.; et al. Stability of human enteric viruses in seawater samples from mollusc depuration tanks coupled with ultraviolet irradiation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1554-1563, 2012.

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

DIGIROLAMO, R.; LISTON, J. & MATCHES J.R. Survival of virus in chilled, frozen, and processed oysters. **Applied Microbiology**, v. 20, p. 58-63, 1970.

DORÉ, W.J. & LEES, D.N. Behavior of Escherichia coli and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2830-2834, 1995.

EDEN, J.S.; TANAKA, M.M.; BONI, M.F. et al. Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage. **Journal of Virology**, v. 87, p. 6270-6282, 2013.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI). Síntese Informativa da Produção de Moluscos 2013, 7 p., 2014a.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI). Moluscos Bivalves: Medidas de controle microbiológico para atender às exigências da União Européia. Florianópolis, 48 p., 2014b.

FABIOUX, C.; HUVET, A.; LE SOUCHU, P.; LE PENNE, M., POUVREAU, A. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. **Aquaculture**, v. 25, p. 458-470, 2005.

FARIAS, H. Qualidade higiênico-sanitária na cadeia produtiva de ostras, *Crassostrea* sp., cultivadas na Baía de Guaratuba, PR, Brasil. **Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, 2008.

FERREIRA, J. F. and F. M. D. O. NETO. Cultivo de moluscos em Santa Catarina. SC, Brasil, UFSC, 2006.

FITZFERALD, T.L.; ZAMMIT, A.; MERRIT, T.D.; et al. An outbreak of norovirus genogroup II associated with New South Wales oysters. **CDI**, v. 38, p. E9-E15, 2014.

FONG, T.T.& LIPP, E.K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

FONGARO, G.; NASCIMENTO, M.A.; RIGOTTO, C. et al. Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays. **Virology Journal**, v. 10, p. 166-175, 2013.

FONGARO, G; MORESCO, V.; GARCIA, L.A.T. et al. Molecular and Cell Culture Methods for evaluation of viral contamination in environmental samples using human adenovirus as model. **Epidemiology II - Theory, Research and Practice**. iConcept Press, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. **Fisheries Technical Paper**, Rome, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fisheries and Aquaculture Technical Paper 500/1, **World Aquaculture 2010**. Roma, Itália, 106 p., 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fisheries and Aquaculture Department has published the Global Aquaculture Production Statistics for the year 2011. Fisheries and Aquaculture Department. e-Bulletin, Food and Drug Organization. Roma, Itália, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The state of world fisheries and aquaculture. Roma, Itália, 223 p., 2014.

GAGNAIRE, B.; SOLECHNIK, P.; MADEC, P.; et al. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. **Aquaculture**, v. 254, p. 606-616, 2006.

GARCIA, L.A., NASCIMENTO, M.A & BARARDI, C.R.M. Effect of UV light on the inactivation of recombinant human adenovirus and murine norovirus seeded in seawater in shellfish depuration tanks. **Food and Environmental Virology**, 2014.

GENTRY, J., J. VINJÉ and E. K. LIPP (2009). A rapid and efficient method for quantitation of genogroups I and II norovirus from oysters and application in other complex environmental samples. **Journal of Virological Methods** 156: 59-65.

GREENING, G.E.; DAWSON, J. & LEWIS, G. Survival of poliovirus in New Zealand green-lipped mussels, *Perna canaliculus*, on refrigerated and frozen storage. **Journal of Food Protection**, v. 6, p. 759-906, 2001.

GRODZKI, M.; SCHAEFFER, J.; PIQUET, J.C.; et al. Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of Hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 4269-4276, 2014.

GUILOOIS-BÉCEL, Y.; COUTURIER, E.; LE SAUX, J.C.; et al. An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. **Eurosurveillance**, v. 12, 6 p., 2009.

HELENIUS, A. Virus entry and uncoating. In: Knipe DM, H. P. (Eds). **Fields Virology**. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, p. 100-118, 2007.

HERNROTH, B.E.; CONDEN-HANSSON, A.C.; REHNSTAM-HOLM, A.S.; GIRONES, R.; ALLARD, A.K. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4523-4533, 2002.

HUANG, G.H. & XU, W.B. Recent advance in new types of human adenovirus. **Chinese Journal of Virology**, v. 29, p. 342-348, 2013.

JACKSON, K.L & OGBURN, D.M. Review of Depuration and its Role in Shellfish Quality Assurance. FRDC Project No. 96/355, **NSW Fisheries Final Report Series**, 1999.

JONES, M.K.; WATANABE, M.; ZHU, S. et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. **Science**, v. 346, p. 755-759, 2014.

KO, G., CROMEANS, T.L., SOBSEY, M.D. Detection of Infectious Adenovirus in Cell Culture by mRNA Reverse Transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7377-7384, 2003.

LEES, D. Viruses and bivalve shellfish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 81-116, 2000.

LEES, D.; YOUNGER, A. & DORE, B. Depuration and Relaying. Safe Management of Shellfish and Harvest Areas, **WHO**, p. 145-181, 2010.

LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, R.; DUBOIS, E.; POMMEPUY, M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3248-3248, 2000.

LE GUYADER, F.; BON, F.; DEMEDICI, D.; et al. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. **Journal of Clinical Microbiology**, p.3878-3882, 2006.

LE GUYADER, F.; PARNAUDEAU, S.; SCHAEFFER, J.; BOSCH, A.; LOISY, F.; POMMEPUY, M.; ATMAR, R.L. Detection and quantification of norovirus in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.618-624, 2009.

LE GUYADER, F.S., R. L. ATMAR & J. L. PENDU. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. **Current Opinion in Virology**, v. 2, p.103-110, 2012.

LENOCH, R. Saúde pública e os moluscos marinhos cultivados. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária** v. 29, p. 65-70, 2003.

LE PENDU, J.; RUVOEN-CLOUET, N.; KINDBERG, E.; SVENSSON, L. Mendelian resistance to human norovirus infections. **Seminars in Immunology**, v. 18, p. 375-386, 2006.

LEWIS, G.D.; METCALF, T.G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1983-1988, 1988.

LI, Y.; QIN, J.G.; LI, X.; BENKENDORFF, K. Spawning-dependent stress response to food deprivation in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Aquaculture**, v. 286, p. 309-317, 2009.

LOURY, P.; LE GUYADER, F.S.; LE SAUX, J.C.; et al. A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January 2012. **Epidemiology and Infection**, v. 8, p. 1-8, 2015.

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.

MAALOUF, H.; ZAKHOUR, M.; LE PENDU, J.; et al. Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 5621-5630, 2010.

MAALOUF, H.; SCHAEFFER, J.; PARNAUDEAU, S.; et al. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 3189-3196, 2011.

MARINO, A.; LOMBARDO, L.; FIORENTINO, C. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-o1 and *Enterococcus durans* by,

and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 281-286, 2005.

MENA, K.D.; GERBA, C.P. Waterborne Adenovirus. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.198, p.133-167, 2009.

MING, H.; FAN, J.; Wu, L.; YUE, L.; Gao, X.; LIANG, Y. Contamination of typical human enteric viruses in economic shellfish along the Chinese coast. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 54, p. 69-79, 2014.

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

MUNIAIN-MUJIKA, I., R. GIRONES, G. Tofiño-Quesada, et al. Depuration dynamics of viruses in shellfish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 125-133, 2002.

NADER, H.B.; CHAVANTE, S.F.; DOS SANTOS, E.A.; et al. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 529-538, 1999.

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.

NELL, J.A. Farming triploid oysters. **Aquaculture**, v. 210, p. 69–88, 2002.

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.

ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H.M.; ABDELZAHER, A., et al. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical Estuary. **Marine Pollution Bulletin**: 1-8, 2009.

PEREIRA, M. A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; et al. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3656-3660, 2006.

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

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., COOK, N., RUGGERI, F.M., et al. Virus hazards from food, water and other contaminates environments. **Federation of European Microbiology Societies**, v. 36, p. 786-814, 2012.

RUSSEL, W.C. Adenoviruses: update on structure and function. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1-20, 2009.

SAMAIN, J.F.; DEGREMONT, L.; SOLETSCHNIK, P.; et al. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. **Aquaculture**, v. 268, p. 227-243, 2007.

SCHMITT, P.; DUPERTHUY, M.; MONTAGNANI, C.; BACHÈRE, E.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. Immune Responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: an overview with focus on summer mortalities. **Oysters**, chapter 9, Nova Science Publishers, 2011.

SCIPIONI, A.; MAUROY, A.; VINJÉ, J.; THIRY, E. Animal noroviruses. **The Veterinary Journal**, v. 178, n.1, p. 32-45, 2008.

SLOMKA, M.J. & APPLETON, H. Feline calicivirus as model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish. **Epidemiology and Infection**, v. 121, p. 401-407, 1998.

SOUZA, D.S.M.; RAMOS, A.P.D.; NUNES, F.F.; et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.76, p. 153-161, 2012

SOUZA, D. S. M., R. S. PIAZZA, M. R. PILOTTO, et al. Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 337-345, 2013.

SOUZA, D.S.M. Aquisição e eliminação de contaminantes em tecidos de moluscos bivalves. **Tese de doutorado**, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

SUBASINGHE, R.P. Aquaculture future: an analysis. **FAO Aquaculture Newsletter**, v. 52, p. 19-23, 2014.

TAUBE, S.; PERRY, J.W.; YETMING, K.; et al. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. **Journal of Virology**, v. 83, p. 4092-4101, 2009.

VINATEA ARANA, L. A. Modos de apropriação e gestão patrimonial de recursos costeiros: estudo de caso sobre o potencial e os riscos do cultivo de moluscos marinhos na Baía de Florianópolis, Santa Catarina. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Filosofia e Ciências Humanas, 2000.

WARD, J. E. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: Particle capture, processing, and fate. **Invertebrates Biology**, v. 115, p. 218-231, 1996

WATZINGER, F.; EBNER, K. & LION, T. Detection and monitoring of viruses infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 254-298, 2006.

WYN-JONES, A.P.; CARDUCCI, A.; COOK, N.; et al. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Research**, v.45, p.1025–1038, 2011.

WOBUS, C.E.; THACKRAY, L.B.; HERBERT, W. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. **Journal of Virology**, v.80, p.5104-5112, 2006.

YEH, H.Y.; YATES, M.V.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Real-time molecular methods to detect infectious viruses. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.20, p.49-54, 2009.

ZHENG, D. P., T. ANDO, R. L. FANKHAUSER, et al. (2006). Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology** 346: 312-323.

11. ANEXOS: Trabalhos científicos publicados durante a realização do mestrado

11.1. Anexo 1

Arch Virol
DOI 10.1007/s00705-014-2257-2

BRIEF REPORT

Oysters as hot spots for mimivirus isolation

Kétyllen R. Andrade · Paulo P. V. M. Boratto · Felipe P. Rodrigues · Lorena C. F. Silva · Fábio P. Dornas · Mariana R. Pilotto · Bernard La Scola · Gabriel M. F. Almeida · Erna G. Kroon · Jônatas S. Abrahão

Received: 8 August 2014 / Accepted: 11 October 2014
© Springer-Verlag Wien 2014

Abstract Viruses are ubiquitous organisms, but their role in the ecosystem and their prevalence are still poorly understood. Mimiviruses are extremely complex and large DNA viruses. Although metagenomic studies have suggested that members of the family *Mimiviridae* are abundant in oceans, there is a lack of information about the association of mimiviruses with marine organisms. In this work, we demonstrate by molecular and virological methods that oysters are excellent sources for mimiviruses isolation. Our data not only provide new information about the biology of these viruses but also raise questions regarding the role of oyster consumption as a putative source of mimivirus infection in humans.

Viruses are ubiquitous organisms that are found in any environment where life is present. Viruses infect almost all known living organisms, from bacteria to whales, and even other viruses. It has been estimated that there are 10^{31} viral

particles in the oceans, which cause the death of approximately 20 % of the marine biomass daily [31]. Despite this, little is known about the role of the viruses in most ecosystems [13, 25]. The members of one particular group of viruses, the nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV), have a wide host range, infecting a variety of hosts, including eukaryotic algae (*Phycodnaviridae*), protists (*Mimiviridae*), and metazoans (*Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Mimiviridae*) [11, 15, 32, 35, 37]. The family *Mimiviridae* is included in the NCLDV group, with *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV) as its prototype [17, 20, 22, 23]. APMV was first found to be associated with amoebas in a water sample collected from a cooling tower of a hospital in England. APMV has a diameter of about 700 nm and a double-stranded DNA genome of ~1.2 megabases encoding proteins not previously observed in other viruses [17, 18, 20, 34].

After the discovery of APMV, several mimiviruses from different environments were isolated, including *Acanthamoeba castellanii* mamavirus, which was also isolated from a water sample from a cooling tower [5]; megavirus chilensis, which was recently isolated from seawater [1]; *Cafeteria roenbergensis* virus, which can infect unicellular algae [12]; and lentille virus, isolated from contact lens fluids from a patient with keratitis [8]. More recently, studies have shown tangible evidence of an association between giant viruses and animals, vertebrates and invertebrates, and mimiviruses have been isolated from bronchoalveolar lavage and stool samples from pneumonia patients [2, 4, 9, 23, 26, 29].

Due to the filtration methods previously used for virus isolation, giant viruses were trapped, and their discovery was therefore delayed. Some of the data on these viruses were obtained through metagenomic studies [16, 19]. Metagenomic studies of samples of marine origin have

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-014-2257-2) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. R. Andrade · P. P. V. M. Boratto · F. P. Rodrigues · L. C. F. Silva · F. P. Dornas · G. M. F. Almeida · E. G. Kroon · J. S. Abrahão (✉)
Laboratório de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brazil
e-mail: jonatas.abraha@gmail.com

M. R. Pilotto
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

B. La Scola
URMITE CNRS UMR 6236, IRD 3R198, Aix Marseille
Université, Marseille, France

11.2. Anexo 2.

International Journal of Food Microbiology 167 (2013) 337–345



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters



Doris Sobral Marques Souza ^{a,*}, Rômi Sharon Piazza ^{d,1}, Mariana Rangel Pilotto ^a, Mariana de Almeida do Nascimento ^a, Vanessa Moresco ^a, Satie Taniguchi ^{b,2}, Diego Averaldo Guiguet Leal ^{c,3}, Éder Carlos Schmidt ^{e,4}, Eduardo Cargin-Ferreira ^f, Márcia Caruso Bicego ^{b,2}, Sílvia Tarou Sasaki ^{b,2}, Rosalinda Carmela Montone ^{b,2}, Rafael Alves de Araujo ^{g,5}, Regina Maura Bueno Franco ^{c,3}, Zenilda Laurita Bouzon ^{e,4}, Afonso Celso Dias Bainy ^{d,1}, Célia Regina Monte Bardadi ^{a,6}

^a Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Laboratório de Virologia Aplicada, Florianópolis, Santa Catarina CEP: 88040-970, Brazil

^b Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, Laboratório de Química Orgânica Marinha, Praça do Oceanográfico, 191, São Paulo, SP 05508-120, Brazil

^c Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Animal, Laboratório de Protozoologia, Rua Monteiro Lobato Nº 255, Campinas, São Paulo PO Box: 6109 CEP: 13083-970, Brazil

^d Universidade Federal de Santa Catarina, Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola, Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Florianópolis, Santa Catarina CEP: 88034-257, Brazil

^e Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Florianópolis, SC CEP 88049-900, Brazil

^f Laboratório de Marcadores Histológicos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Campus Garopaba, SC, Brazil

^g Universidade Federal de Santa Catarina, Grupo de Concepção e Análise de Dispositivos Eletromagnéticos, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2013

Received in revised form 24 September 2013

Accepted 26 September 2013

Available online 5 October 2013

Keywords:

Oyster

Virus

Protozoan

Biomarkers

Ultraviolet irradiation

Depuration

ABSTRACT

Aims: (1) Evaluate the dynamic of the depuration process of *Crassostrea gigas* oysters using different ultraviolet doses with different amounts of contaminants (virus, protozoa and organic contaminants) and (2) investigate the morphological changes in the oysters' tissues produced by the depuration procedures.

Methods: The oysters were allocated in sites with different degrees of contamination and analyzed after 14 days. Some animals were used as positive controls by artificial bioaccumulation with HAdV2 and MNV1 and subjected to depuration assays using UV lamps (18 or 36 W) for 168 h. The following pollutants were researched in the naturally contaminated oysters, oysters after 14 days in sites and oysters during the depuration processes: virus (HAdV, HAV, HuNoV, Gi/GII and JCPyV), by (RT) qPCR; protozoa (*Cryptosporidium* and *Giardia* species), by immunomagnetic separation and immunofluorescence; and organic compounds (AHs, PAHs, LABs, PCBs and organochlorine pesticides—OCs), by chromatography. Changes in the oysters' tissues produced by the depuration processes were also evaluated using histochemical analysis by light microscopy. In the artificially bioaccumulated oysters, only HAdV2 and MNV1 were investigated by (RT) qPCR before the depuration procedures and after 96 and 168 h of these procedures.

Results: At 14 days post-allocation, HAdV was found in all the sites (6.2×105 to 4.4×107 GCg⁻¹), and *Giardia* species in only one site. Levels of PCBs and OCs in the oyster's tissues were below the detection limit for all samples. AHs (3.5 to $4.4 \mu\text{g g}^{-1}$), PAHs (11 to 191 ng g^{-1}) and LABs (57 to 751 ng g^{-1}) were detected in the samples from 3 sites. During the depuration assays, we found HAdV, *Giardia* and *Cryptosporidium* species until 168 h, independent of UV treatment. AHs, PAHs and LABs were found also after 168 h of depuration (36W and without UV lamp). The depuration procedures did not produce changes in the oysters' tissues. In the artificially bioaccumulated and depurated oysters, we detected HAdV until 168 h and MNV1 until 96 h of depuration.

Conclusion: The applied depuration treatments were unable to eliminate the protozoa or to degrade the HAdV genomes but were able to degrade the MNV1 genomes. Similarly, the UV water treatment was not efficient for aliphatic hydrocarbons, PAHs and LABs, as their concentrations were equivalent or higher to the concentrations of the control samples and samples from depuration tanks without UV treatment.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +55 48 37215207; fax: +55 48 37219258.

E-mail address: dorissms@hotmail.com (D.S.M. Souza).

¹ Tel.: +55 48 3721 6412.

² Tel.: +55 11 3091 6570.

³ Tel.: +55 19 35216285.

⁴ Tel.: +55 48 3721 5149.

⁵ Tel.: +55 48 3721 9649.

⁶ Tel.: +55 48 3269 8624.

11.3. Anexo 3.

Molecular and Cell Culture Methods for evaluation of Viral Contamination in Environmental Samples Using Human Adenoviruses as Model (Accepted. Waiting for Copy Editing) (Downloaded: 94)

Gislaine Fongaro, Vanessa Moresco, Lucas Garcia, Elmahdy Mohamed Elmahdy, Doris Souza, Mariana Nascimento, Mariana Pilotto and Celia Barardi

Fongaro, G., Moresco, V., Garcia, L., Mohamed Elmahdy, E., Souza, D., Nascimento, M., Pilotto, M. & Barardi, C. (). Molecular and Cell Culture Methods for evaluation of Viral Contamination in Environmental Samples Using Human Adenoviruses as Model. *Epidemiology II - Theory, Research and Practice*. iConcept Press. Retrieved from <http://www.iconceptpress.com/books/054-2-1/epidemiology-ii-theory-research-and-practice/>

Molecular and Cell Culture Methods for evaluation of Viral Contamination in Environmental Samples Using Human Adenoviruses as Model

Gislaine Fongaro

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

Vanessa Moresco

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

Lucas Ariel Totaro Garcia

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

Elmahdy Mohamed Elmahdy

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

Doris Sobral Marques Souza

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

Mariana de Almeida do Nascimento

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

Mariana Rangel Pilotto

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

Célia Regina Monte Barardi

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



