

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

Adriana de Abreu Corrêa

**VÍRUS ENTÉRICOS EM MOLUSCOS BIVALVES:
ESTUDOS SOBRE A DESINFECÇÃO DE OSTRAS E ÁGUA DO
MAR EM UM SISTEMA DE DEPURAÇÃO**

Florianópolis

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

Adriana de Abreu Corrêa

**VÍRUS ENTÉRICOS EM MOLUSCOS BIVALVES:
ESTUDOS SOBRE A DESINFECÇÃO DE OSTRAS E ÁGUA DO
MAR EM UM SISTEMA DE DEPURAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia - Área de Concentração: Biotecnologia Ambiental

Orientação: Prof. Dr. Célia Regina Monte Barardi

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

C824v Corrêa, Adriana de Abreu

Vírus Entéricos em Moluscos Bivalves [tese] : estudos sobre a desinfecção de ostras e água do mar em um sistema de depuração / Adriana de Abreu Corrêa ; orientadora, Célia Regina Monte Barardi. - Florianópolis, SC, 2010.
164 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Moluscos Bivalves. 3. Vírus entéricos. 4. Água do mar. 5. Cloro Livre. 6. Depuração. I. Barardi, Celia Regina Monte. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

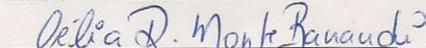
CDU 577.23

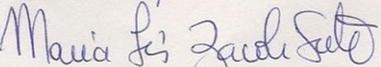
**“Vírus entéricos em moluscos bivalves: Estudo sobre a
desinfecção de ostras e água do mar em um sistema de
depuração”.**

POR

Adriana de Abreu Corrêa

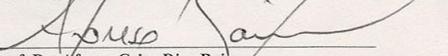
Tese julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e
membros da Comissão Examinadora.

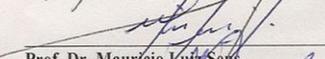
Orientador: 
Prof. Dr. Célia Regina Monte Barardi
MIP/CCB/UFSC

Comissão Examinadora: 
Prof. Dr. Maria Inês Zanoli Sato
CETESB/SP


Prof. Dr. Verônica Rajal
INIQUI/Universidad Nacional de Salta/Argentina


Prof. Dr. Thais Cristine Marques Sincero
CIF/CCS/UFSC


Prof. Dr. Afonso Celso Dias Bainy
BQA/COB/UFSC


Prof. Dr. Mauricio Luiz Sens
ESA/CTC/UFSC


Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia/CCB/UFSC
Florianópolis, Outubro de 2010

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, aos meus familiares, em especial os meus pais e a minha irmã, pelo apoio à minha escolha pela vida acadêmica. Não tenho palavras suficientes para agradecer, mas acima de tudo, obrigada, pelo carinho e amor incondicionais.

À minha querida orientadora Dra. Célia Regina Monte Barardi, por todo o aprendizado, pela amizade e confiança adquiridos ao longo destes anos de convivência no Laboratório de Virologia Aplicada. Agradeço pela grande oportunidade e pela minha pessoal satisfação nesta Tese.

A todos os colegas e professores do terceiro andar do MIP e Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, pela forte amizade construída. Em especial à Professora Cláudia e aos Professores Edmundo e Mário, por todas as conversas e ensinamentos valiosos para minha formação.

Às Dras. Sílvia Bofill-Mas e Rosina Gironés Llop pela orientação e possibilidade de realizar o estágio de doutorando, durante um ano, no Laboratório de Vírus Contaminantes de Águas e Alimentos, da Universidade de Barcelona. Este estágio abriu novas perspectivas de pesquisa, as quais trouxeram um efeito positivo para este trabalho.

Aos meus amigos da Espanha, do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona: Chus, Byron, Ayalkibet, Néstor, Anna, Marta, Silvinha, Alejandra, Sarah, Laura, Maru e Ivania. Obrigada pelo companheirismo, pelas conversas e cafés ao final da tarde, por todos os almoços compartilhados, por todas as expressões espanholas que aprendi e também por todas as correções. *Yo, de verdad, les echo de menos...*

Um agradecimento mais que especial às minhas grandes amigas “Carolines”: à *Carol Rigotto* pela forte amizade construída desde 2006, apesar da distância destes últimos anos, continuamos muito próximas; à *Carou Bauer*, minha amiga historiadora, por tudo que passamos juntas desbravando Barcelona em 2009, pelo companheirismo e apoio. A amizade de vocês duas não tem preço.

Aos companheiros do Laboratório de Virologia Aplicada: Fran, Naira, Iza, Jéssica, Ariadne, Mari Lúcia, Anne, Jadel, Thiago; e em especial à turma dos “Patógenos Ambientais”: Dóris, Ana Paula, Nicésio, Lucas, Mari Rangel, Mari Nascimento, Aline e aos meus

“eternos ICs” (agora Pós-Graduandos): Vanessa, Jonas e Cristian. Agradeço por todos os momentos juntos e por não sermos somente colegas de trabalho, e sim grandes amigos!

A todos os amigos das aulas de dança, em especial a Elena, Álvaro, Paulo César, Cauê, Elaine, Lara e Renzo. Obrigada pelos ótimos momentos e por me mostrarem como dançar faz muito bem para o corpo e para a mente!

Aos meus grandes amigos porto-alegrenses: Aline, Allan, Ane, Cairu, Andréa, Rodrigo, Lika, Ilana e Cris. Muito obrigada pelos mais de 15 anos de amizade e carinho; mesmo a quilômetros de distância, vocês são imprescindíveis na minha vida!

Ao Engenheiro Agrônomo Adriano Luiz Teixeira, pelo apoio logístico, caronas e ajuda em toda a parte técnica envolvida na realização dos experimentos de depuração.

Ao Dr. Carlos Rogério Poli, da empresa *Blue Water Aquaculture* Ltda. pela oportunidade oferecida ao desenvolvimento deste trabalho, disponibilizando todos os recursos para a construção da depuradora comercial testada, bem como os moluscos utilizados nos experimentos.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de estudo que permitiram a dedicação plena a este trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

Patógenos virais humanos têm sido associados a muitos episódios de gastroenterites, bem como a doenças relacionadas ao consumo de moluscos contaminados. O risco pode ser reduzido por um tratamento destes moluscos visando sua auto-limpeza previamente a sua comercialização. A depuração de moluscos reduz os níveis de microrganismos presentes na carne, diminuindo a chance de uma potencial infecção associada ao seu consumo *in natura*. Em um sistema de depuração, a água do mar pode ser recirculada pelo menos por 24 horas e, durante este ciclo, a água é tratada química ou fisicamente para eliminar a contaminação por microrganismos. Neste trabalho, um sistema fechado de depuração de moluscos foi testado para eliminar os patógenos virais em ostras. Além disso, a capacidade do cloro livre em inativar esses vírus, bem como a estabilidade viral em água do mar, com e sem radiação U.V. foram investigadas. Para os ensaios de depuração, ostras (*Crassostrea gigas*) foram artificialmente contaminadas em aquários, contendo água do mar semeada com Vírus da Hepatite A (HAV) e Adenovírus Humano (HAdV5). Em seguida, as ostras foram colocadas no tanque de depuração, e foram analisadas após 48h, 72h e 96h. Em cada amostragem, o trato gastrointestinal das ostras foi homogeneizado e processado visando a eluição das partículas virais. Para os estudos de desinfecção pelo uso do cloro, água do mar natural e artificial foram semeadas com Norovírus Murino 1 (MNV-1), HAdV2 e Poliomavírus JC (JCPyV) e tratadas com uma concentração inicial de cloro livre de 2,5 mg/l, por 60min. Para os ensaios de estabilidade viral em água do mar e desinfecção viral por luz U.V., 300L de água do mar foram semeadas com o HAV, MNV-1 e HAdV2 e tratados com U.V. (36W), em um mini-tanque de depuração, com recirculação por 120h. Um litro de água do mar foi coletado a cada 24h em até 120h e as amostras de água foram tratadas pelo método de floculação com leite acidificado para adsorção e concentração das partículas virais. O monitoramento viral nos tecidos das ostras e água do mar foi avaliado por métodos moleculares (PCR e q(RT)-PCR), e por métodos de cultura celular associados a métodos moleculares ou imunológicos (ICC-PCR, RT-PCR ICC, IFA, Citometria de Fluxo e Ensaio de Placas de Lise). A detecção por PCR, em amostras de ostras, mostrou que o genoma de HAdV5 foi detectado em todos os períodos de amostragem, e o genoma do HAV foi detectado até 72 h. Os testes envolvendo viabilidade viral por ICC-PCR, demonstraram uma inativação viral progressiva, nas ostras, ao longo das 96h de recirculação de água do mar tratada com luz

U.V. Nos ensaios de desinfecção por cloro, após 30 minutos de tratamento de água do mar, foi observada uma redução de $\sim 2\log_{10}$ e $\sim 3\log_{10}$ para MNV-1 e HAdV2, respectivamente, com base nos resultados q(RT) PCR. Quando a infecciosidade viral foi analisada, uma redução de mais de $4\log_{10}$ foi observada para MNV-1, enquanto HAdV2 apresentou uma redução de $\sim 2.3\log_{10}$, mantendo-se infeccioso após 60 minutos. JCPyV apresentou em média uma redução de $1,6 \log_{10}$, quando avaliado por qPCR. Não houve diferenças na cinética de desinfecção viral observadas em água do mar natural e artificial. Para os ensaios de estabilidade viral em água do mar tratada ou não com luz U.V., com base nos resultados q(RT)-PCR, foram observadas cinéticas diferentes para cada vírus em 120 horas de contato. Reduções de $\sim 5\log_{10}$ e $3\log_{10}$, em 120h, para HAdV2 e HAV, respectivamente; para MNV-1, foi observada uma redução de $\sim 4,5 \log_{10}$ em 72h sob tratamento com luz U.V. Apesar da detecção do genoma, HAdV2 foi capaz de permanecer infeccioso até 72h, de acordo com resultados de ICC-RT-PCR. Ensaios envolvendo estabilidade viral sem radiação U.V. demonstraram uma redução progressiva da carga viral ao longo das 120h de recirculação de água do mar para os três vírus ($\sim 2\log_{10}$ para HAdV2; $\sim 2,5 \log_{10}$ para HAV e $\sim 3\log_{10}$ para MNV-1). Esta cinética diferente provavelmente está associada às espécies de cloro presentes, ao tempo de contato com a radiação U.V. e a características estruturais peculiares de cada um dos vírus. A diminuição natural da carga viral pode ser devido à existência de fatores ambientais, tais como força iônica e compostos encontrados naturalmente na água do mar. Este trabalho confirmou que HAdV é um patógeno viral particularmente resistente e exige mais tempo para inativação. Estes dados serão úteis para a otimização de desinfecção da água nos tanques de depuração de moluscos.

Palavras-chave: depuração, moluscos bivalves, vírus entéricos, água do mar, cloro livre, U.V.

ABSTRACT

Viruses have been linked to nearly all episodes of gastroenteritis as well as outbreaks of illnesses related to consumption of contaminated shellfish. The risk may be reduced by appropriate treatment following harvesting as well as by depuration, which is a method that reduces the levels of microorganisms present in mollusk meat, decreasing the potential for infections associated with mollusk consumption *in natura*. In a depuration system, seawater may be recirculated for at least 24h, and during this cycle, the water must be chemically or physically treated to eliminate microbial contamination. In this work, a shellfish depuration closed system was tested to eliminate viral pathogens from oysters. Moreover, the chlorine capability to inactivate these viruses, as well as the viral stability and disinfection in seawater with and without U.V. irradiation were investigated. For depuration assays, oysters (*Crassostrea gigas*) were first artificially contaminated in aquariums containing seawater seeded with Hepatitis A virus (HAV) and Human Adenovirus (HAdV5). Then, the oysters were placed into the depuration tank, and were harvested after 48h, 72h and 96h. After each sampling, the gastrointestinal tracts were homogenized and the viral particles were eluted. To chlorine disinfection assays, natural and artificial seawater were seeded with selected viruses (Murine Norovirus 1, MNV-1; HAdV2; JC Polyomavirus, JCPyV) and treated by adding initial free chlorine concentration of 2.5mg/l for up to 60min. For the stability assays, 300L of natural seawater were seeded with HAV, MNV-1 and HAdV2, and treated by 36W U.V. lamp, into the mini depuration tank, with recirculation, for up to 120h. One liter of viral seeded seawater was harvested every 24h and viral particles were concentrated by flocculation method using skimmed milk. The kinetics of viral decay in oysters and seawater was evaluated by molecular techniques (PCR and q(RT)-PCR), and by cell culture associated with molecular and immunological methods to access the viral infectivity (ICC-PCR, ICC RT-PCR, IFA, Flow Cytometry and Plaque Assay). The molecular detection by PCR for both viruses showed that the presence of HAdV5 genome was positive in all of the sampling periods, and the HAV genome was detected until 72 h. The tests involving viral viability by ICC-PCR, demonstrated a progressive viral inactivation along the 96h of seawater recirculation under U.V. light irradiation. After 30 minutes of treatment of natural seawater a $\sim 2\log_{10}$ and $\sim 3\log_{10}$ reduction were observed for MNV-1 and HAdV2, respectively, based on q(RT)PCR results. When viral infectivity was analyzed, a reduction of more than

4log₁₀ was observed for infectious MNV-1, while HAdV2 presented ~2.3log₁₀ reduction, remaining infective viruses present after 60 minutes. JCPyV presented a average reduction of 1,6 log₁₀, analysed by qPCR. No differences in the disinfection kinetics have been observed between natural and artificial seawater. Based on qPCR results, the kinetics observed were different for each virus, reaching, at 120h of contact time, ~5log₁₀ and ~3log₁₀ reduction for HAdV2 and HAV, respectively; for MNV-1, was observed a ~4,5log₁₀ reduction at 72h under U.V. treatment. Despite the genome detection, HAdV2 was able to remain infectious only up to 72h, according ICC-RT-PCR results. Assays involving viral stability without U.V. irradiation, demonstrated a progressive reduction of viral load along the 120h of seawater recirculation for three viruses (~2log₁₀ for HAdV2; ~2,5log₁₀ for HAV and ~3log₁₀ for MNV). This different kinetics is probably associated to the chlorine species present, the contact time with the U.V. radiation and structural characteristic of each virus. The natural decreasing of viral load can be due to the existence of environmental factors, such as ionic strength and compounds naturally found in seawater. This work confirmed that HAdV is a particularly a resistant viral pathogen and requires longer periods for inactivation. These data will be subsequently useful to plan water disinfection in shellfish depuration tanks.

Key-words: depuration, shellfish, enteric viruses, seawater, free chlorine, U.V. radiation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de Adenovirus Humanos.....	8
Figura 2: Estrutura do Vírus da Hepatite A.....	10
Figura 3: Eletromicrografia de Norovírus e Reconstrução gráfica de HuNoV.....	12
Figura 4: Representação de uma partícula de Poliomavirus umanos...14	
Figura 5. Estrutura de Rotavírus.....	15
Figura 1.1: Fluxograma das etapas experimentais seguidas para os experimentos de depuração viral.....	39
Figura 1.2: Sistema de Depuração Comercial de Moluscos Bivalves ...	49
Figura 1.3: Eletroforese em Gel de Agarose 1,5% de produtos de PCR e nested-PCR referentes aos limites de detecção de Rotavirus (A), Adenovirus (B) e Vírus da Hepatite A (C) em tecido digestivo de ostras experimentalmente inoculadas.....	53
Figura 1.4: Bioacumulação de RV SA11 por ostras em diferentes tempos de exposição a água do mar semeada com 3×10^3 FFU/ml sem emprego de microalgas para adsorção viral.....	54
Figura 1.5: Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de produtos de nested PCR referentes à depuração em sistema fechado.....	55
Figura 1.6: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de nested PCR referentes à avaliação da viabilidade viral por ICC-PCR de duas repetições dos diferentes períodos de depuração em sistema fechado.....	57
Figura 1.7: Imunofluorescência Indireta para HAdV5, em células A549, em extratos de ostras submetidas ao processo de depuração em sistema fechado.....	58
Figura 1.8: Redução do número de cópias do genoma de HAdV5 nos diferentes tecidos de ostras após o processo de depuração em diferentes tempos (0h, 48h, 72h e 96h).....	59
Figura 2.1: Fluxograma das etapas experimentais seguidas para os experimentos de desinfecção viral por cloro em água do mar natural e artificial.....	77
Figura 2.2: Imagens de microscópio de luz invertido de células RAW 264.7 obtidas em aumento de 400X.....	81
Figura 2.3. Imagens de microscópio de luz invertido de células A549 obtidas em aumento de 400X.....	82
Figura 2.4. Imagens de microscópio de luz invertido de células SVG-A não infectadas obtidas em aumento de 400X.....	83
Figura 2.5: Curva de decaimento do Cloro Livre em água BDF com diferentes concentrações de substâncias orgânicas e inorgânicas.....	95

Figura 2.6: Curva de Decaimento de Cloro Livre em água do mar natural.....	95
Figura 2.7: Curva de Decaimento de Cloro Livre em água do mar artificial.....	96
Figura 2.8: Formação de Placas de Lise por após a infecção de células RAW 264.7 por MNV-1.....	97
Figura 2.9: Formação de Placas de Lise em células A549 infectadas por HAdV2, em garrafas de cultivo celular de 25cm ²	98
Figura 2.10: Curva Padrão de DNA obtida com diluições seriadas na base 10 de plamideos contendo a região alvo de HAdV2 (A) e JCPyV (B)	101
Figura 2.11: Curva de decaimento de cloro livre durante os ensaios de desinfecção com água do mar natural e artificial.....	102
Figura 2.12: Curvas de decaimento viral para HAdV2 após desinfecção em água do mar natural tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre.....	105
Figura 2.13: Curvas de decaimento viral para HAdV2 após desinfecção em água do mar artificial tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre.....	106
Figura 2.14: Curvas de decaimento viral para MNV-1 após desinfecção em água do mar natural tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre.....	109
Figura 2.15: Curvas de decaimento viral para MNV-1 após desinfecção em água do mar artificial tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre.....	110
Figura 2.16: Curvas de decaimento viral para JCPyV viral após desinfecção em água do mar natural tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre.....	113
Figura 2.17: Curvas de decaimento viral para JCPyV após desinfecção em água do mar artificial tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre.....	114
Figura 3.1: Fluxograma representativo das etapas experimentais seguidas para os experimentos de depuração viral.....	130
Figura 3.2: Sistema de Depuração.....	131
Figura 3.3: Formação do precipitado pelo método da floculação orgânica.....	133
Figura 3.4: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de nested-PCR referentes à avaliação da viabilidade viral de HAdV2 por ICC- RT-PCR.....	139
Figura 3.5: Comparação do numero de placas de lise de MNV-1 quantificadas em distintas diluições seriadas de base 10, utilizando dois	

diferentes diluentes.....	140
Figura 3.6 Comparação da porcentagem de células positivas por citometria de fluxo para quantificação de HAdV2, em distintas diluições seriadas de base 10, utilizando dois diferentes diluentes.....	141
Figura 3.7: Análise do decaimento de genomas de HAdV2 em água do mar tratada e não tratada com radiação U.V. (36W).....	143
Figura 3.8 Citometria de Fluxo para análise da infecciosidade de HAdV2 em amostras de água do mar tratadas e não tratadas com radiação U.V., por um período de 72h.....	145
Figura 3.9: Análise do decaimento de genomas de MNV em água do mar tratada e não tratada com radiação U.V. (36W).....	146
Figura 3.10 Ensaio de Placas de Lise para análise da infecciosidade de MNV-1 em amostras de água do mar tratadas e não tratadas com radiação U.V., por um período de 72h).....	146
Figura 3.11 Análise do decaimento de genomas de HAV em água do mar tratada e não tratada com radiação U.V. (36W).....	147
Figura 3.12 Análise da estabilidade de genomas de HAdV2 em água do mar, por um período de 120h, por qPCR.....	150
Figura 3.13 Análise da estabilidade de HAdV2 em amostras de água do mar por um período de 120h por citometria de fluxo.....	150
Figura 3.14: Análise da estabilidade de genomas de MNV-1 em água do mar, por um período de 120h, por qRT-PCR.....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Microrganismos causadores de doenças veiculadas pelo consumo de moluscos bivalves.....	2
Tabela 1.1: Detecção de HAdV5 e HAV em hepatopâncreas de ostras e em amostras de água do mar após processo de depuração em sistema fechado, com desinfecção por U.V.....	60
Tabela 2.1: Parâmetros físico-químicos e qualidade microbiológica das amostras de água do mar natural e artificial utilizadas nos experimentos de desinfecção.....	79
Tabela 2.2: Iniciadores e Sondas utilizados para a detecção de HAdV2 e JCPyV por qPCR.....	89
Tabela 2.3: Iniciadores e Sondas avaliados para a detecção de MNV-1 por qRT-PCR.....	89
Tabela 2.4: Valores de Ct obtidos na avaliação de três kits comerciais para a amplificação de concentrações conhecidas de cópias genômicas de MNV-1.....	99
Tabela 2.5: Valores de Ct e parâmetros obtidos na análise de três diferentes curvas-padrão geradas para quantificar MNV.....	100
Tabela 2.6: Sumário dos valores de redução logarítmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para HAdV2 após desinfecção por cloro livre em água do mar natural e artificial.....	104
Tabela 2.7: Sumário dos valores de redução logarítmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para MNV-1 após desinfecção por cloro livre em água do mar natural e artificial.....	108
Tabela 2.8: Sumário dos valores de redução logarítmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para JCPyV após desinfecção por cloro livre em água do mar natural e artificial.....	112
Tabela 3.1: Valores de Temperatura e pH da água do mar durante os ensaios de desinfecção viral por radiação U.V.....	142
Tabela 3.2: Resultados obtidos por ICC-RT PCR para HAdV2 em amostras de água do mar tratadas e não tratadas com radiação U.V., por um período de 120h.....	144
Tabela 3.3: Sumário dos valores de redução logarítmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para HAdV2, HAV e MNV-1 em água do mar natural com e sem tratamento com radiação U.V., por um período de 120h.	148
Tabela 3.4: Sumário dos valores de redução logarítmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para HAdV2 e MNV-1 nos ensaios de estabilidade em água do mar natural, por um período de 120h.	151

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE OS IMPACTOS DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NA AQUICULTURA	1
1.2 DEPURAÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES	3
1.3 VÍRUS HUMANOS TRANSMITIDOS PELO MEIO HÍDRICO.5	5
1.3.1 ADENOVÍRUS HUMANOS (HADV)	6
1.3.2 Vírus da Hepatite A (HAV)	8
1.3.3 Norovírus Humano (HuNoV) e Murino (MNV).....	10
1.3.5 Rotavírus (RV)	14
1.4 ESTABILIDADE DE PARTÍCULAS VIRAIS NO MEIO AMBIENTE	16
REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	34
DINÂMICA DE DEPURAÇÃO DE OSTRAS (CRASSOSTREA GIGAS) ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS COM VÍRUS DA HEPATITE A E ADENOVÍRUS.....	35
1.1 JUSTIFICATIVA	36
1.2.1 Objetivo Geral	38
1.2.2 Objetivos Específicos.....	38
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
1.3.1 Delineamento Experimental.....	39
1.3.2 Vírus e Células.....	40
1.3.3 Estoques Virais.....	40
1.3.4 Titulação dos Estoques Virais.....	41
1.3.5 Ostras.....	42
1.3.6 Dissecção das ostras	43
1.3.7 Preparação de extratos teciduais	43
1.3.8 Extração dos ácidos nucléicos totais a partir dos extratos teciduais	44
1.3.9 Amplificação Gênica	45
1.3.10 Avaliação da citotoxicidade do extrato de ostras	46
1.3.11 PCR integrado ao Cultivo Celular (ICC-PCR).....	47
1.3.12 Imunofluorescência Indireta para HADV5	48
1.3.13 Sistema de depuração comercial.....	48
1.3.15 Depuração viral pelas ostras C. gigas	50
1.3.16 Análise da água do mar utilizada nos ensaios de depuração	51
1.4 RESULTADOS	51
1.4.1 Otimização do método de concentração viral a partir de	

<i>amostras de ostras</i>	51
1.4.2 <i>Estabelecimento das condições de bioacumulação viral</i>	54
1.4.3 <i>Ensaio de depuração viral por ostras C. gigas</i>	54
1.5 DISCUSSÃO	61
1.6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS CAPÍTULO 1	67
ESTUDO DA DESINFECÇÃO DE NOROVÍRUS MURINO, ADENOVÍRUS HUMANO E POLIOMAVÍRUS HUMANO EM ÁGUA DO MAR NATURAL E ARTIFICIAL TRATADAS COM CLORO LIVRE	73
2.2 OBJETIVOS	75
2.2.1 <i>Objetivo Geral</i>	75
2.2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	75
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	76
2.3.1 <i>Delineamento Experimental</i>	76
2.3.2 <i>Reagentes e Vidrarias</i>	78
2.3.3 <i>Água do Mar</i>	78
2.3.4 <i>Estudo Preliminar do Decaimento de Cloro livre em contato com Água do mar</i>	79
2.3.5 <i>Armazenamento das Amostras</i>	80
2.3.6 <i>Extração dos Ácidos Nucléicos</i>	80
2.3.7 <i>Células RAW 264.7 e produção de MNV-1</i>	81
2.3.8 <i>Células A549 e produção de HAdV2</i>	81
2.3.9 <i>Células SVG-A e produção de JCPyV</i>	82
2.3.10 <i>Ensaio de Citotoxicidade</i>	83
2.3.12 <i>Ensaio de Placa de Lise para MNV-1</i>	85
2.3.13 <i>Ensaio de Placas de Lise para HAdV2</i>	86
2.3.14 <i>qPCR para HAdV2 e JCPyV</i>	86
2.3.15 <i>qPCR para MNV-1</i>	87
2.4 RESULTADOS	94
2.4.1 <i>Estudos Preliminares de Decaimento de Cloro Livre em Água do Mar Natural e Artificial</i>	94
2.4.2 <i>Métodos de Cultivo Celular para Quantificação de HAdV2, MNV-1 e JCPyV infecciosos após os ensaios de desinfecção por cloro</i>	96
2.4.3 <i>Estabelecimento de um Protocolo para Detecção Molecular de MNV-1</i>	98
2.4.4 <i>Detecção Molecular de HAdV2 e JCPyV</i>	100
2.4.5 <i>Ensaio de Desinfecção por Cloro Livre</i>	101
2.6 CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS CAPÍTULO 2	121

ESTUDO DA ESTABILIDADE DE ADENOVÍRUS HUMANO TIPO 2, NOROVÍRUS MURINO TIPO 1 E VÍRUS DA HEPATITE A EM ÁGUA DO MAR NATURAL COM E SEM TRATAMENTO POR RADIAÇÃO ULTRA-VIOLETA	126
3.1 JUSTIFICATIVA	127
3.2.1 <i>Objetivo Geral</i>	129
3.2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	129
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	130
3.3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	130
3.3.2 <i>Depuradoras e Água do Mar</i>	131
3.3.4 <i>Concentração Viral em Amostras de Água do Mar pelo Método da Floculação Orgânica</i>	133
3.3.5 <i>Vírus e Células</i>	134
3.3.6 <i>ICC- RT-PCR para HAdV2</i>	134
3.3.7 <i>Citometria de Fluxo para HAdV2</i>	135
3.3.9 <i>qPCR para HAV</i>	137
3.3.10 <i>qPCR para HAdV2 e qRT-PCR para MNV-1</i>	138
3.4 RESULTADOS	138
3.4.1 <i>Padronização do ICC RT-PCR para HAdV2</i>	138
3.4.2 <i>Sensibilidade do Ensaio de Placa de Lise para MNV-1</i>	139
3.4.3 <i>Padronização da Citometria de Fluxo para HAdV2</i>	140
3.4.3 <i>Ensaio de Desinfecção de água do mar por Radiação U.V.</i> 141	
3.4.4 <i>Ensaio de Estabilidade</i>	149
3.6 CONCLUSÕES	157
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	159
REFERÊNCIAS CAPÍTULO 3.....	160

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE OS IMPACTOS DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL NA AQUICULTURA

As águas oceânicas são fontes importantes de proteína animal e parte integrante de muitas atividades econômicas. No entanto, os efeitos cumulativos destas atividades, bem como as alterações climáticas, podem alterar a composição da água do mar (FLEMING et al., 2006). A contaminação microbiológica, por bactérias, vírus e protozoários relacionada direta e indiretamente à atividade humana e animal, está afetando cada vez mais a qualidade sanitária dos alimentos produzidos nestas águas, bem como o uso comercial e recreativo de águas costeiras. De forma geral, mais de um bilhão de pessoas tem os alimentos de origem marinha como sua principal fonte de proteína animal, como por exemplo, moluscos bivalves, provenientes das atividades de aquicultura (LETSON, 2008).

Os moluscos bivalves habitam ecossistemas aquáticos, sejam eles marinhos ou de água doce e devido à contaminação de seu hábitat, estes organismos atuam como bioindicadores de contaminação fecal provenientes de seres humanos e de outros animais (LEAL; FRANCO, 2008). Estes moluscos, devido ao aumento da poluição destas águas, são causas de doenças veiculadas pelo meio hídrico, incluindo a contaminação por patógenos humanos e a contaminação química (FLEMING et al., 2006).

Tradicionalmente, bactérias coliformes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* têm sido usados como indicadores da qualidade microbiológica dos moluscos e das águas de cultivo (MENA; GERBA, 2009). No entanto, tem sido claramente demonstrado que um controle sanitário baseado em parâmetros bacterianos nem sempre indicam a presença de vírus em moluscos (SOBSEY; DAVIS; RULLMAN, 1987; KINGSLEY; RICHARDS, 2001; MCLEOD et al., 2009;). Problemas de saúde humana associados ao consumo de moluscos bivalves são bem descritos e contaminantes virais têm sido associados a quase todos os episódios de gastroenterites (LE GUYADER et al., 2000; LEE et al., 2003; LE GUYADER et al., 2008), considerando que estes moluscos são na maioria das vezes consumidos crus, ou relativamente cozidos. A Tabela 1 descreve os principais patógenos humanos implicados em doenças veiculadas pelo consumo destes produtos.

Microrganismo	Período de Incubação	Duração	Principais Sintomas	Principais fontes de contaminação em moluscos bivalves
Bactérias				
<i>Salmonella typhi</i>	3 semanas	Até 4 semanas	Mal-estar, cefaléia, febre, tosse, náuseas, vômitos, constipação, dor abdominal, manchas vermelhas, sangue nas fezes	Fezes Humanas e Esgoto
<i>Campylobacter sp.</i>	2 a 7 dias	3–6 dias	Diarréia, dor abdominal intensa, febre, mal-estar, cefaléia, vômitos	Fezes de Animais/lodo
<i>Shigella sp.</i>	24 a 72 horas	5–7 dias	Dor abdominal, diarréia, sangue e fezes mucosas, febre	Fezes Humanas e Esgoto
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2 a 48 horas	2–14 dias	Dor abdominal, diarreia, náuseas, vômitos, febre, calafrios, dor de cabeça	Ambiente Marinho
<i>Vibrio vulnificus</i>	<24 horas	2–3 dias	Mal-estar, calafrios, febre, lesões cutâneas	Ambiente Marinho
<i>Vibrio cholerae</i>	1–5 dias	2–5 dias	Diarréia aquosa, vômitos, desidratação	Fezes Humanas e Esgoto
Vírus				
Norovirus	1–3 dias	20 a 72 horas	Diarréia, náuseas, vômitos, dor abdominal,	Fezes Humanas e Esgoto
Hepatite A	10 a 50 dias	10 a 30 dias	Febre, mal estar, náuseas, dor abdominal, icterícia	Fezes Humanas e Esgoto
Astrovirus	1 a 2 dias	48 a 72 horas	Diarreia, acompanhada por sinais ou sintomas entéricos	Fezes Humanas e Esgoto

Tabela 1: Microrganismos causadores de doenças veiculadas pelo consumo de moluscos bivalves. (Fonte: FAO, 2008)

Patógenos virais humanos chegam ao ambiente marinho através de diferentes rotas, as quais incluem o descarte direto de efluentes tratados e não tratados, descarte de resíduos rurais e industriais e resíduos descartados por embarcações (BOSCH; LE GUYADER, 2010). As práticas atuais de tratamento de água são incapazes de prover efluentes tratados livres de vírus, como consequência, patógenos virais humanos são rotineiramente introduzidos em águas marinhas e de estuários. Durante o processo de alimentação e sob condições hidrográficas favoráveis, os moluscos bivalves filtram contaminantes de águas poluídas e os acumulam em seus tecidos (RODRICK; SCHNEIDER, 2003).

1.2 DEPURAÇÃO DE MOLUSCOS BIVALVES

Muitos procedimentos de produção, como a depuração, podem reduzir microrganismos contaminantes em moluscos (RICHARDS, 1988, RODRICK; SCHNEIDER, 2003). A depuração permite a eliminação de contaminantes dos tecidos das ostras pelas atividades naturais de filtração, digestão e excreção em água do mar de boa qualidade microbiológica (CORRÊA et al., 2007). A depuração de moluscos bivalves é um processo no qual estes organismos são mantidos em um tanque de água do mar limpa, sob condições que maximizam a atividade natural de filtração destes, resultando na expulsão do conteúdo intestinal, diminuindo ou eliminando contaminantes de seus tecidos (FAO, 2008). Este processo foi originalmente desenvolvido como um dos métodos para resolver o problema de inúmeros surtos de febre tifóide (causada pela bactéria *Salmonella typhi*), associados ao consumo de moluscos, em muitos países europeus e nos Estados Unidos, no final do século XIX e princípio do século XX (RODRICK; SCHNEIDER, 2003).

Embora existam diferentes tipos de vírus humanos transmitidos entericamente, estudos epidemiológicos têm mostrado que os moluscos são responsáveis somente por alguns destes (LE GUYADER et al., 2008). Surtos de doenças causadas por Norovirus Humanos (HuNoV) e Vírus da Hepatite A (HAV) têm sido frequentemente associados ao consumo destes animais, enquanto que surtos relacionados com Vírus da Hepatite E (HEV), Astrovirus, Poliovirus, Adenovirus e Rotavírus são menos reportados, apesar de que estes vírus serem comumente detectados em moluscos (FORMIGA-CRUZ et al., 2002, 2003; KOIZUMI et al., 2004; MYRMEL et al., 2004).

A contaminação de moluscos bivalves com HuNoV (causador de gastroenterites) e HAV é reconhecida como um dos maiores riscos

para a saúde humana associados com o consumo de moluscos contaminados por matéria fecal (LEES, 2010). Muitos surtos destas doenças relacionados ao consumo de moluscos têm sido reportados nos últimos 10 anos (BOSCH et al., 2001; DOYLE et al., 2004; SIMMONS et al., 2007; LE GUYADER et al., 2008; LOWTHER et al., 2010; WESTRELL et al., 2010). A maioria das notificações apresenta natureza gastro-entéricas e são causados por HuNoV; já surtos causados por HAV são reportados com menos frequência, mas a doença causada por este vírus é mais severa (PINTÓ et al., 2010). Provavelmente, os surtos reconhecidos são somente uma pequena parte do total de doenças em muitos países, devido aos altos índices de subnotificação (LEES, 2010).

Pesquisas sobre depuração de ostras e mexilhões indicaram que ocorre uma eliminação diferencial e preferencial de patógenos bacterianos, como *E. coli*, em relação a patógenos virais (MURPHREE, TAMPLIN, 1991; CROCI et al., 2002; MARINO et al., 2005). De acordo com Doré e Lees (1995), em uma depuração, visando a eliminação de *E. coli* e bacteriófago F+ de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*Mytilus edulis*), foram necessárias 6,5h para eliminar 90% das bactérias e cerca de 45h para a eliminação de 90% dos bacteriófagos. Em outro estudo, Abad et al., (1997) observou reduções na infectividade viral de 99,82% para Adenovírus (HAdV), 98,71% para HAV e 96,99% para Rotavírus (RV) após 96 h de depuração.

Esses resultados demonstram que um controle de qualidade sanitária baseado somente na eliminação de patógenos bacterianos, não garante a ausência de patógenos virais. De acordo com Kingsley e Richards (2003), sistemas de depuração comercial, com água esterilizada com radiação Ultra Violeta (U.V.), diminui rápida e significativamente, os níveis de *E. coli* (bactéria utilizada como indicadora de poluição fecal) em moluscos contaminados; no entanto, contaminações residuais de patógenos virais ainda podem permanecer na carne destes moluscos.

Estudos sobre a depuração simultânea de diferentes patógenos têm sido publicados com o uso de outras espécies de moluscos (ENRIQUEZ et al., 1992; SCHWAB et al., 1998; NAPPIER et al., 2008), e confirmam a eliminação diferencial de distintos tipos de vírus. Há muitas razões possíveis para que estes organismos sejam considerados como transmissores preferenciais de alguns vírus do que de outros: uma delas é que moluscos podem inativar e eliminar vírus em diferentes taxas (MCLEOD et al., 2009). No entanto, está bem estabelecido que fatores como temperatura, salinidade e o tipo de sistema de depuração utilizado podem afetar as taxas de eliminação de

microrganismos pelos moluscos, necessitando maiores estudos sobre a depuração simultânea de diferentes patógenos virais (MARINO et al., 2005).

Considerando-se que a dose infecciosa de patógenos virais tende a ser baixa, isto significa que a depuração não deve ser considerada como o principal método para eliminar este tipo de contaminação. No entanto, mesmo não eliminando totalmente os contaminantes virais, a depuração obviamente reduz o risco de doenças, e, desta forma, é necessário aperfeiçoar os sistemas utilizados para que estes sejam efetivos para outros microrganismos além de bactérias indicadoras de contaminação fecal, como a *E. coli* (FAO, 2008).

1.3 VÍRUS HUMANOS TRANSMITIDOS PELO MEIO HÍDRICO

As doenças virais veiculadas pelo meio hídrico podem ser adquiridas principalmente após o consumo de água de beber ou de alimentos contaminados, incluindo moluscos bivalves comestíveis de ambientes marinhos e os frutos e vegetais cultivados em solos irrigados com águas provenientes de esgoto tratado. Os patógenos virais também podem ser transmitidos através de águas de recreação poluídas, após contato direto por meio da pele ou por inalação (TAVARES et al., 2005).

De acordo com informações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007), considerando unicamente as doenças diarréicas frequentemente associadas ao consumo de água e alimentos contaminados, aproximadamente dois milhões de pessoas morrem a cada ano, na sua maioria, crianças menores de cinco anos. Exemplos de surtos associados à contaminação fecal no ambiente foram os de Shangai, em 1988, no qual ocorreram 300.000 casos de hepatite A e 25.000 casos de gastroenterites virais devido ao consumo de moluscos cultivados em uma região estuarina com contaminação fecal (HALLIDAY et al., 1991); um surto de gastroenterite por HuNoV associado provavelmente à contaminação fecal em uma clínica geriátrica, em Albacete (Espanha) que afetou, em 1999, 341 pessoas (MAYORAL CORTES et al., 2000) e, em 2004, no Sudão, que afetou 7.000 pessoas, causando 87 mortes devido ao vírus da Hepatite E (WHO, 2004).

Entre os vírus que infectam humanos, existem muitos tipos diferentes que são excretados em grandes concentrações nas fezes de pessoas com gastroenterites ou hepatites (vírus entéricos), e em menores concentrações na urina de indivíduos saudáveis, sendo considerados contaminantes ambientais (BOFFIL-MAS et al., 2005). Estes vírus podem causar inúmeras doenças, como meningite, paralisias,

miocardites, anomalias cardíacas congênitas, doenças respiratórias, hepatites, infecções oculares (MENA; GERBA, 2009) e, segundo Ennan et al. (2002), poderiam estar relacionados com alguns tipos de câncer. Sabe-se que vírus entéricos como Poliovírus (PV), Rotavírus (RV), HuNoV, alguns HAdV e HAV, presentes no trato gastrointestinal de indivíduos infectados, são eliminados através das fezes em grandes quantidades (10^5 - 10^9 /g de fezes) e são capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano. A presença destes patógenos em águas ou alimentos contaminados por resíduos fecais, provenientes de descargas de esgotos, tem contribuído para a ocorrência de doenças em indivíduos susceptíveis. A dose infectante destes agentes é extremamente baixa, podendo variar de uma a dez unidades infecciosas (ABBASZADEGAN, 2001, WYN-JONES; SELLWOOD, 2001).

Existe também um número elevado de diferentes vírus que infectam o homem de forma persistente e assintomática, constituindo uma parte do que se poderia definir como microbiota humana, sendo excretados em fezes ou urina de pessoas saudáveis durante anos (AGOSTINI et al., 1997). Apesar disso, é importante levar em consideração que estes vírus podem causar doenças importantes em pessoas imunossuprimidas. Este é o caso do Poliomavirus JC (JCPyV), que causa Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP), uma doença letal em aproximadamente 4% das pessoas com AIDS (BOFFILMAS et al., 2005).

1.3.1 ADENOVIRUS HUMANOS (HADV)

Adenovírus humanos, foram primeiramente isolados há mais de cinquenta anos e, atualmente, já foram identificados 52 diferentes sorotipos de HAdV, divididos em seis espécies (A-F), identificados com base na similaridade de seqüências gênicas, padrões de hemaglutinação, e perfis sorológicos (NEMEROW et al., 2009). De acordo com o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (ICTVdB, 2009), os HAdV pertencem à família *Adenoviridae* e esta família está subdividida nos gêneros *Mastadenovirus* (infectam homens, símios, bovinos, equinos, caninos, suínos, ovinos e roedores), *Aviadenovirus* (infectam aves em geral), *Atadenovirus* (infectam cervos, cobras e patos) e *Siadenovirus* (infectam anfíbios e perus).

A disponibilidade atual de diferentes seqüências gênicas permitiu uma análise filogenética mais detalhada a ser empregada na classificação; por exemplo, a espécie B é subdividida em B1 e B2 (SEGERMAN et al., 2003). Existe uma correlação entre as espécies, seu

tropismo tecidual e propriedades clínicas. Assim, espécies B1, C e E, podem causar principalmente doenças respiratórias, enquanto as espécies B, D e E podem induzir uma doença ocular. A espécie F é responsável por gastroenterites e vírus da espécie B2 infectam os rins e o trato urinário (RUSSELL, 2009).

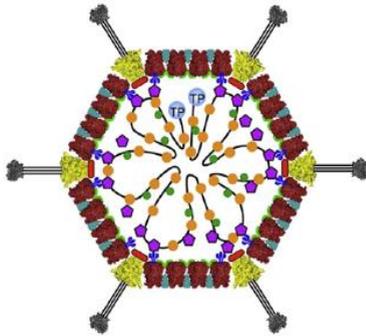
HAdV são vírus não envelopados, de simetria icosaédrica, e apresentam genoma de DNA fita dupla linear de 26 a 45 Kb (ENRIQUEZ, 2002), com aproximadamente 70-100nm de diâmetro (Figura 1). O capsídeo é composto de 252 capsômeros, 240 dos quais são denominados *hexons* e 12 são *pentons*. Cada penton projeta uma fibra protéica que varia para cada sorotipo de HAdV, com exceção de HAdV entéricos (sorotipos 40 e 41) que projetam duas fibras protéicas (SHENK, 1996).

Doenças associadas a HAdV têm sido documentadas desde 1926 (MENA; GERBA, 2009). As rotas de infecção incluem o trato respiratório, trato gastrointestinal e a conjuntiva ocular, sendo estes vírus responsáveis por inúmeros surtos em escolas, orfanatos e hospitais (HORWITZ, 2001).

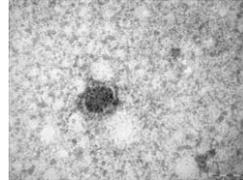
Todos os sorotipos de adenovírus são excretados em fezes sendo que águas contaminadas por poluição fecal são uma fonte direta para a ingestão, inalação ou contato direto com os olhos. Nenhum surto foi notificado associado a HAdV transmitido por alimentos, e somente dois surtos foram identificados como sendo veiculados pela ingestão de água contaminada por HAdV (KUKKULA et al., 1997; DIVIZIA et al., 2004), mas não por HAdV entéricos.

HAdV têm sido isolados em esgotos e em água de rios, frequentemente em concentrações maiores que as encontradas para enterovirus (PINA et al., 1998). Além disso, estes virus também têm sido encontrados em moluscos bivalves e águas oceânicas (RIGOTTO et al., 2005; 2010).

A



B



Major Capsid Proteins	Minor Capsid Proteins	Core Proteins
 Hexon	 Protein VI	 Terminal Protein
 Penton Base	 Protein IIIa	 Protein Mu
 Fiber	 Protein VIII	 Protein VII
	 Protein IX	 Protein V

Figura 1: Estrutura de Adenovirus Humano. **A:** diagrama esquemático mostrando as proteínas estruturais da partícula viral; as principais proteínas do capsídeo (Hexon, Penton e fibras), formam a superfície do capsídeo icosaédrico; As proteínas essenciais, proteína terminal, Mu, V e VII, estão associados com o genoma do DNA fita dupla linear. (Fonte: NEMEROW et al., 2009). **B:** Eletromicrografia de HAdV em um aumento de 36000 X, evidenciando a simetria do capsídeo.

1.3.2 Vírus da Hepatite A (HAV)

O vírus da hepatite A, pertencente ao gênero *Hepatovirus* e à família *Picornaviridae*, apresenta-se estruturalmente com um capsídeo icosaédrico não envelopado, medindo de 27-32 nm de diâmetro (Figura 2). O genoma que compõe a partícula é uma molécula de RNA linear com 7,5 Kb, de fita simples e polaridade positiva (FAUQUET et al., 2005). Esse genoma é dividido em três regiões: região 5' não codificadora; uma longa ORF codificadora de 11 proteínas, algumas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, 2A, 3B) e outras não estruturais (2B, 2C, 3A, 3C, 3D) e região 3' não codificadora (HOLLINGER; EMERSON, 2007). O HAV é extremamente estável no ambiente, especialmente quando está associado à matéria orgânica (KOOPMANS;

DUIZER, 2004).

A distribuição mundial da hepatite A mostra diferentes níveis de endemicidade e está diretamente relacionada com as condições sanitárias e socioeconômicas das populações (PINTÓ et al., 2010). A transmissão do HAV ocorre por via fecal-oral, principalmente através da ingestão de água e alimentos contaminados, podendo manifestar-se como hepatite icterica ou anictérica, ou desenvolver-se de forma inaparente ou subclínica, o que acontece em 80% dos casos de infecção (TAVARES et al., 2005).

Embora em aproximadamente 40% dos casos de hepatite A notificados, a fonte de infecção não pode ser identificada, surtos da doença relacionados com ingestão de alimentos contaminados têm sido observados, e muitos deles são causados pelo consumo de moluscos bivalves que são produzidos em águas impactadas (PINTÓ et al., 2010). O primeiro surto documentado, relacionado com moluscos contaminados, ocorreu na Suécia em 1955, quando 629 casos foram associados com o consumo de ostras cruas (ROOS, 1956). No entanto, o mais significativo, foi o surto ocorrido em Shangai, China, em 1988, com mais de 300.000 casos devido ao consumo de berbigões coletados de áreas poluídas (HALLIDAY et al., 1991).

Outros pequenos surtos de hepatite A associados ao consumo de águas, alimentos e à utilização de águas de recreação contaminadas têm sido evidenciados no mundo todo (FROST et al., 2002; SANCHEZ et al., 2002; PINTÓ et al., 2009). HAV também tem sido detectado em águas de poços (BORCHARDT et al., 2003), sistemas de tratamento de esgoto, rios e córregos (SCHVOERER et al., 2000; CLEMENTE-CASARES et al., 2003).

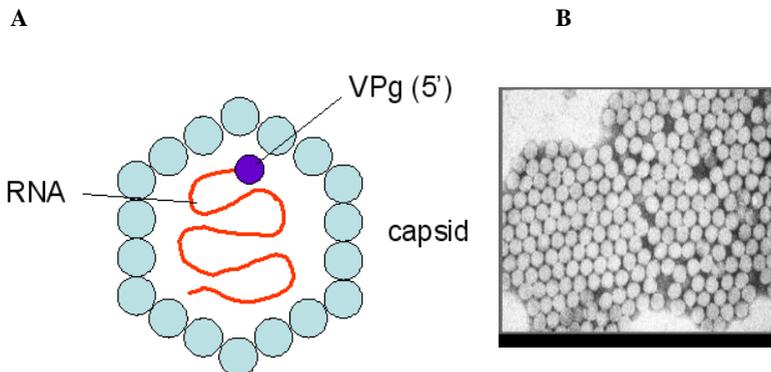


Figura 2: Representação de uma partícula de HAV (A); eletromicrografia de HAV em um aumento de 36000x, evidenciando a simetria do capsídeo (B).
Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-virus.htm>

1.3.3 Norovírus Humano (HuNoV) e Murino (MNV)

Os Norovirus, pertencentes à família *Caliciviridae*, são reconhecidos como os principais causadores de surtos de gastroenterites no mundo todo (CANNON et al., 2006). Previamente denominados vírus do grupo *Norwalk*, causam gastroenterites agudas autolimitadas em humanos, e, apesar de as infecções assintomáticas serem comuns, estudos recentes têm demonstrado que os norovírus são a causa principal de gastroenterites em pessoas de todas as idades (KOOPSMAN; DUIZER, 2004). A incidência maior ocorre em crianças, mas a doença também ocorre regularmente em adultos (BOFFIL-MAS et al., 2005). Esta seria a diferença em relação a outros grupos de vírus entéricos, como RV e HAdV, que são mais prevalentes em crianças.

De acordo com dados recentes do Centro de Controle de Doenças (*Center of Diseases Control*, CDC) dos Estados Unidos, estima-se que cerca de 23 milhões de casos de gastroenterites agudas são causados, anualmente, pelo HuNoV nos EUA, e que pelo menos 50% dos surtos de origem alimentar seriam norovirose. Surtos nos EUA são mais frequentemente associados ao consumo de frutos do mar crus, atingindo mais de 50% da população maior de 18 anos de idade. Os locais de ocorrência desses surtos incluem restaurantes, refeições de avião, navios de cruzeiros, escolas, hospitais, assim como grupos de pessoas em férias, em locais como praias, estâncias turísticas, parques aquáticos e outros com grandes aglomerações humanas (LOPMAN et al., 2004).

O gênero *Norovirus*, pode ser dividido em cinco genogrupos (GI, GII, GIII, GIV e GV), sendo que GI, GII e GIV são infecciosos para seres humanos; no entanto, apenas um pequeno número de surtos devido ao genogrupo IV foi relatado (KOOPMANS et al., 2002). O Genogrupo III agrupa os NoVs bovinos e genogrupo V contém norovirus de origem murina (WOBUS et al., 2006).

Norovirus Humanos e Animais são vírus não envelopados com aproximadamente 27–35 nm de diâmetro (Figura 3). HuNoV apresentam um capsídeo formado por 180 cópias de uma única proteína e sua arquitetura é baseada numa simetria icosaédrica com 90 dímeros. Sua superfície mostra 32 depressões em forma de cálice e arcos salientes (SCIPIONI et al., 2008). Essas propriedades são conservadas dentro da família *Caliciviridae*, mas variações estruturais entre diferentes membros desta família têm sido observadas e suas implicações funcionais estão em estudos (CHEN et al., 2004).

Pouco é conhecido sobre a biologia de HuNoVs, o que é principalmente devido a ausência de um sistema de cultivo celular ou modelo animal. Até os dias de hoje, todas as tentativas de propagar HuNoVs em cultura celular de rotina ou em culturas primárias não apresentaram resultados satisfatórios (DUIZER et al., 2004). Atualmente, a detecção molecular é considerada o método de escolha para HuNoVs em amostras clínicas, alimentos e ambiente (CANNON et al., 2006).

Devido a essas limitações, alguns outros vírus animais tem sido utilizados para prever o comportamento HuNoV, além de estudos de estabilidade e inativação. Atualmente, Calicivirus Felino, Bacteriófago MS2 e Poliovírus (BAE; SCHWAB, 2008), Calicivírus Canino (DUIZER et al., 2004) e Vírus da Hepatite A (HAV) (HEWITT; GREENING 2004) têm sido usados como modelo para estudos de HuNoV. Alguns destes vírus têm demonstrado uma inadequação como modelo para HuNoV. Por exemplo, Calicivirus Felino tem sido utilizado mais frequentemente para estudos de estabilidade e inativação de HuNoVs, mas tem sido criticado por não pertencer ao gênero *Norovirus*, por ser um vírus respiratório e por não sobreviver a baixo pH, uma característica de vírus entéricos, os quais devem sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal do hospedeiro (CANNON et al., 2006).

Em 2003, Norovírus Murino (MNV), pertencentes ao genogrupo V (ICTVdB, 2009) e que infectam camundongos, foram reportados e caracterizados (KARST et al., 2003). Este vírus atualmente é o único *Norovirus* capaz de se replicar tanto em cultura celular como em pequenos animais, e por isso tem sido bem aceito como o melhor

vírus modelo para HuNoVs (WOBUS et al., 2004). MNV pode ser produzido rotineiramente por infecção de macrófagos de origem murina, da linhagem celular RAW 264.7 e é facilmente quantificado utilizando ensaios de placa de lise (WOBUS et al., 2006).

Do ponto de vista molecular, MNV compartilha muitas características genéticas com HuNoVs. A análise do genoma de MNV (RNA fita-simples com aproximadamente 7.5 kb) identificou 3 fases abertas de leitura (ORF) características de *Norovirus* e *Versivirus*, dois gêneros da família *Caliciviridae* (KARST et al., 2003). Em relação à patogenicidade, MNV também compartilha com HuNoVs a capacidade de se dispersar pela via fecal-oral e altas concentrações de partículas virais são encontradas nas fezes do animal infectado (WOBUS et al., 2004).

Por ser um vírus descrito recentemente, há poucos trabalhos publicados relacionados à estabilidade e desinfecção de MNV. Este vírus foi utilizado como modelo para estudos de inativação de HuNoV por calor (HEWITT et al., 2009) e desinfecção por cloro e U.V. (CANNON et al., 2006; LEE et al., 2008; BELLLOT et al., 2008; BAERT et al., 2008). No entanto há a necessidade de realização de maiores estudos nesta área.

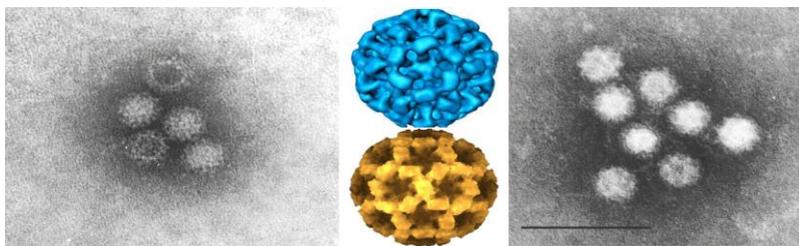


Figura 3: Eletromicrografia de Norovírus (direita e esquerda, barra=100nm). Reconstrução gráfica de HuNoV (Centro) Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fr-index.htm>

1.3.4 Poliomavírus Humano (PyV)

O gênero *Polyomavirus* pertence à família *Polyomaviridae*. São vírus de simetria icosaédrica (40-45nm), não envelopados e com genoma DNA circular de aproximadamente 5,2 Kb (Figura 4). *Polyomavirus* é o único gênero desta família e contém 14 diferentes vírus que infectam até 8 distintas espécies de mamíferos (NEU et al., 2009). Além das espécies BK e JC, recentemente, outros três novos

poliomavirus humanos (WUPyV, KIPyV e MCPyV) foram descritos (ALLANDER et al., 2007; GAYNOR et al., 2007; FENG et al., 2008).

O vírus JC foi isolado primeiramente em 1971, como agente causador de uma doença letal do sistema nervoso central (SNC), denominada Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML), em indivíduos imunossuprimidos. O vírus BK é um poliomavirus humano que é considerado a principal causa de Nefropatia e de Cistite Hemorrágica (KITAMURA et al., 1994).

Ambos os vírus são excretados na urina, pois desenvolvem infecções persistentes nos rins, o qual é o local de infecção primária. Cerca de 20-80% da população excreta estes vírus na urina, dependendo do grupo étnico e da faixa etária a qual pertencem (ENNAM et al., 2002). A infecção primária por JC e BK ocorre na infância e na adolescência e normalmente é assintomática. No entanto, a transmissão de poliomavirus humanos ainda não é bem esclarecida (FENG et al., 2008).

Um estudo realizado em amostras de esgoto urbano de diferentes áreas geográficas detectou altos níveis de poliomavirus, sugerindo uma transmissão pela rota urina-oral (BOFILL-MAS et al., 2005). Sumarizando estes resultados, de um total de 52 amostras, 98% resultaram positivas para poliomavirus JC, com concentrações médias aproximadas de 10^2 - 10^3 cópias genômicas/ml de esgoto; e, 90% foram positivas para poliomavirus BK com concentrações médias aproximadas de 10 - 10^2 cópias genômicas/ml de água. Cerca de 98% destas amostras também foram positivas para HAdV, vírus considerado como possível indicador de contaminação fecal humana.

No Brasil, um estudo recente (FUMIAN et al., 2010) descreveu a prevalência de subtipos de JCPyV atualmente presentes na população do Rio de Janeiro. Em amostras de esgotos tratados e não tratados, a presença de JCPyV foi detectada em 43% e 96% das amostras, respectivamente. Estes vírus foram caracterizados e a sequência nucleotídica obtida indicou que as cepas de JCPyV detectadas no Brasil são relacionadas com subtipos encontrados na África e na Europa.

Com base nestes dados, pode-se concluir que os poliomavirus humanos estão presentes em elevadas concentrações em amostras ambientais, e estudos de estabilidade demonstraram que são estáveis nestas matrizes e a pH ácido (BOFFIL-MAS et al., 2003). Isto leva a sugerir o trato gastrointestinal humano como uma possível porta de entrada destes vírus e o vírus JC como um potencial indicador de contaminação de excretas de origem humana (BOFFIL-MAS et al., 2005; FUMIAN et al., 2010).

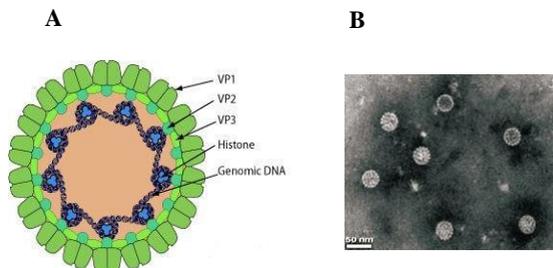


Figura 4: Representação de uma partícula de Poliomavírus Humano (A) com suas respectivas proteínas: VP1, VP2 e VP3; eletromicrografia de PyV em um aumento de 36000x, evidenciando a simetria do capsídeo (B). Fonte: http://expasy.org/viralzone/all_by_species/58.html

1.3.5 Rotavírus (RV)

O gênero *Rotavirus*, pertencente à família *Reoviridae*, apresenta partícula viral não envelopada, de aproximadamente 75nm de diâmetro, com capsídeo de simetria icosaédrica (Figura 5) constituído por três capsídeos protéicos distintos (BORCHARDT et al., 2003) A camada mais interna, denominada nucleocapsídeo, que envolve o genoma viral, é formada pela proteína VP2. A camada intermediária, o capsídeo interno, é composta pela proteína VP6. A camada mais externa, o capsídeo externo, é constituída pelas proteínas VP4 e VP7. O genoma dos rotavírus compreende 11 segmentos de RNA dupla fita, de 16,5-21kb de tamanho, com metilação na extremidade 5' de cada segmento, o que confere maior resistência contra a degradação por ribonucleases (ESTES, 2001).

Os rotavírus são classificados em sete sorogrupos de A a G, reconhecidos com base na especificidade antigênica da proteína VP6. O grupo A é o mais comum dos rotavírus humanos e é ainda classificado em sorotipos e/ou genótipos. Os sorotipos G ou P são determinados pela reatividade do vírus em ensaios de neutralização com base nas proteínas VP7 ou VP4 do capsídeo externo, respectivamente. Os genótipos P ou G são determinados por seqüenciamento, amplificação ou hibridização dos genes 4 ou 9 que codificam as proteínas VP4 ou VP7 (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996). Os rotavírus do grupo A são os agentes mais comuns de gastroenterite aguda em crianças, causando grande número de hospitalizações.

O RV tem sido considerado o principal agente etiológico de diarreia infantil em todo o mundo. A doença diarreica é geralmente

branda e autolimitada, caracterizada por diarreia, vômito, febre, desidratação e dor abdominal (RAMIG, 2004). A transmissão é feita principalmente por via fecal-oral. A veiculação através da água tem sido evidenciada durante todas as estações, porém com uma maior frequência durante o inverno (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996; MEHNERT et al., 1999; BORCHARDT et al., 2003). Os rotavírus causam diarreia principalmente em crianças menores de cinco anos, mas também podem infectar e causar diarreia em crianças mais velhas e em adultos não imunes, estando envolvidos nestes últimos casos rotavírus não pertencentes ao grupo A (ESTES, 2001; SANTOS, HOSHINO, 2005).

Números limitados de casos de rotavirose relacionados com o consumo de águas contaminadas têm sido publicados; a maioria é resultante da ingestão de águas de beber contaminadas por descargas de esgoto (GOFTI-LAROCHE et al., 2001; FROST et al., 2002; LOPMAN et al., 2003). Estudos demonstram que a persistência da partícula viral do rotavírus, e de sua infectividade, varia de acordo com o tipo de água que é analisada (ESPINOSA et al., 2008), apresentando, por exemplo, diferenças entre águas de superfície (maior conteúdo de matéria orgânica permite maior agregação viral) e águas subterrâneas.

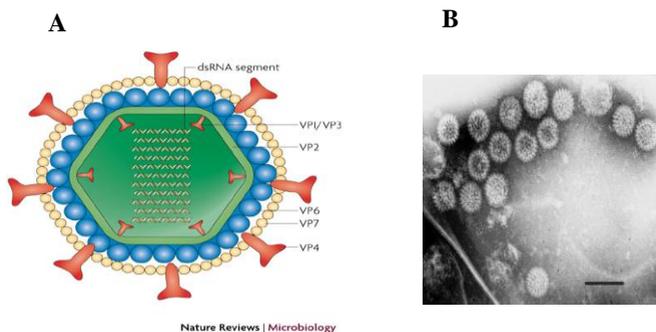


Figura 5. Representação de uma partícula de rotavírus (A), com suas respectivas proteínas: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7; eletromicrografia de RV em um aumento de 36000x, evidenciando a simetria do capsídeo (B). Fonte: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n7/fig_tab/nrmicro1692_F1.html.);

1.4 ESTABILIDADE DE PARTÍCULAS VIRAIS NO MEIO AMBIENTE

Os vírus excretados pela via fecal são, em geral, não envelopados, o que lhes confere elevada resistência a condições ambientais adversas. Podem permanecer viáveis por longos períodos na água, até mesmo em ambiente marinho e em águas subterrâneas, resistindo a condições ambientais desfavoráveis ou letais para outros microrganismos, tais como extremos de pH, elevadas temperaturas e elevada salinidade (LEY et al., 2002; GRIFFIN et al., 2008).

Embora não se multipliquem quando estão dispersos no ambiente por serem parasitos intracelulares obrigatórios, os vírus não envelopados são geralmente mais resistentes às intempéries do que outros microrganismos, bem como aos métodos químicos e físicos utilizados no tratamento de água e esgoto. Assim, os vírus apresentam vantagens em relação às bactérias como marcadores de eficiência do processo de descontaminação da água, já que os procariotos são mais susceptíveis aos processos de tratamento químico-físico e à degradação ambiental (JIANG et al., 2007). Muitos vírus entéricos são mais resistentes do que bactérias aos processos de desinfecção por tratamento de cloração e radiação ultravioleta; as bactérias, por sua vez, são mais facilmente removidas pelos processos de filtração (GRIFFIN et al., 2008). Desse modo, a ausência ou baixa concentração de bactérias de presumida origem fecal na água não significa ausência de vírus entéricos (JIANG et al., 2007).

Os Adenovírus podem sobreviver fora das células hospedeiras por um tempo prolongado, como resultado de suas propriedades físico-químicas e estruturais. Estes vírus são estáveis na presença de muitos agentes físicos e químicos, assim como condições adversas de pH e temperatura (MENA; GERBA, 2009). Também apresentam maior estabilidade térmica que enterovírus, já que são capazes de sobreviver por meses em ambiente aquático, especialmente em baixas temperaturas (SAUERBREI; WUTZLER, 2009). De acordo com Thurston-Enriquez et al. (2003), por estes vírus apresentarem um genoma de DNA dupla-fita, são capazes de utilizar o sistema de reparo de DNA de células hospedeiras, o que pode prolongar a sua sobrevivência no ambiente e aumentar a sua resistência à inativação por U.V.

Tem sido demonstrada uma grande resistência dos Rotavirus aos fatores ambientais e aos diversos tratamentos físico-químicos empregados para o tratamento de águas (MEHNERT et al., 1999, 2003). Os Rotavirus de origem humana são resistentes a variações de pH sendo inativados em pH 11 (MENG et al, 1987), concentrações de cloro entre

1,5 e 1,7 mg/L, e a radiação U.V., sendo esta última devido ao seu genoma de RNA dupla fita.

Entre os vírus entéricos, os norovírus são mais resistentes à inativação por cloro, uma vez que têm permanecido viáveis em águas tratadas com cloro em concentrações de 3,75 mg/L a 6,26 mg/L, normalmente usadas no tratamento de água potável e eficiente na inativação de poliovírus e rotavírus. Esses vírus mostram-se sensíveis em águas cloradas com concentração de 10 mg/L, geralmente aplicada no tratamento dos sistemas de abastecimento de água após detecção de contaminação (KESWICK, 1985; APPLETON, 2000).

O HAV é também mais resistente à cloração do que outros vírus entéricos, pois não é inativado em águas consideradas potáveis que apresentam níveis de cloro livre variando de 0,5 mg/L a 1,5 mg/L. Contudo, este vírus perde sua infecciosidade após tratamento com cloro em concentração de 5 mg/L durante um minuto, ou ainda, tem sua infecciosidade reduzida após exposição a hipoclorito de sódio, glutaraldeído a 2% e compostos amônios quaternários (APPLETON, 2000).

A sobrevivência dos vírus entéricos em águas estuarinas e marinhas tem sido examinada em alguns estudos (GERBA; SCHAIBERGER, 1975; WARD et al., 1986; WETZ et al., 2004; WALTERS et al., 2009), os resultados são heterogêneos e às vezes refletem a natureza complexa dos processos de inativação dos mesmos. Os vírus têm diferentes sensibilidades a fatores de inativação, como temperaturas desfavoráveis, compostos químicos, radiações solares, sólidos suspensos e atividade biológica de microrganismos (FUJIOKA et al., 1980). Os efeitos reconhecidos de parâmetros ambientais sobre a redução do título viral são muito variados e dependentes do tipo de vírus avaliado. Temperatura e radiação U.V. são os fatores mais prejudiciais para a estabilidade das partículas virais (LE GUYADER et al., 1994). A redução de título viral em água do mar provavelmente está relacionada à salinidade (WETZ et al., 2004). A presença de cátions é reconhecida por estar envolvida na adsorção do vírus nos sólidos em suspensão, permitindo a formação de ligações entre as partículas virais e uma variedade de materiais orgânicos (WARD et al., 1986).

Embora os parâmetros físicos sejam geralmente aceitos como fatores importantes no declínio viral no ambiente, a inativação biológica também desempenha um papel importante (KAPUSCINSKI; MITCHELL, 1980). Por exemplo, Gordon e Toze (2003) constataram que a presença/ausência de outros microrganismos é um fator mais importante do que a temperatura na sobrevivência do vírus em

ambientes aquáticos. Além disso, a presença de proteases extracelulares, nucleases e outras enzimas podem contribuir para a redução do título de patógenos virais entéricos no ambiente marinho (NOBLE; FUHRMAN, 1997; 1999).

REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO

ABBASZADEGAN, M. Advanced detection of viruses and protozoan parasites in water. **Rev Biol Biotech**, v. 1, p. 21-26, 2001.

AGOSTINI, H.T.; YANAGIHARA, R.; DAVIS, V.; RYSCHKEWITSCH, C.F.Y.; STONER, G.L. Asian genotypes of JC virus in native Americans and in a Pacific island population: Markers of viral evolution and human migration. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, p. 14542-14546, 1997.

ALLANDER, T.; ANDREASSON, K.; GUPTA, S.; BJERKNER, A.; BOGDANOVIC, G.; PERSSON, M.A. Identification of a third human polyomavirus. **J Virol**, v.81, n. 8, p. 4130–4136, 2007.

APPLETON H. Control of food-borne viruses. **Br. Med Bull.** v. 56, n. 1, p. 72-83, 2000.

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. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n.2, p. 477-484. 2008.

BAERT, L.; WOBUS, C.E.; VAN COILLIE, E., THACKRAY, L.B., DEBEVERE, J., UYTTENDAELE, M. Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n.2, p.543-546, 2008.

BAXTER, C.S.; HOFMANN, R.; TEMPLETON, M.R.; BROWN, M., ANDREWS, R.C. Inactivation of adenovirus 2, 5 and 41 in drinking water by U.V. light, free chlorine and monochloramine. **J. Environ. Engin.**, v. 133, n. 1, p. 97-103, 2007.

BELLIOT, G.J.S.; NOEL, J.F.; LI, Y.; SETO, C.D.; HUMPHREY, T.; ANDO, R.I.; MONROE, S.S. Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of Norwalk-like viruses. **J. Clinical Microb**, v. 39, p. 4288-4295, 2008.

BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n.12, p. 7894-7906, 2006.

BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; ALBIÑANA-GIMÉNEZ, N.; DE MOTES, C.M.; HUNDESA, A.; GIRONES, R. Effects on health of water and food contamination by emergent human viruses. **Rev Esp Salud Publica**, v. 79, n. 2, p.253-269, 2005.

BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; MAJOR, E.O.; CURFMAN, B. Y.; GIRONES, R. Analysis of the excreted JC virus strains and their potential oral transmission. **J Neurovirol**, v. 9, n. 4, p. 498-507, 2003.

BORCHARDT, M.A.; BERTZ, P.D.; SPENCER, S.K.; BATTIGELLI, D.A. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 1172-1180, 2003.

BOSCH, A.; LE GUYADER, F. Viruses in Shellfish. **Food Environ Virol**, v. 2, p. 115-116, 2010.

BOSCH, A.; SANCHEZ, G.; LE GUYADER, F.; VANACLOCHA, H.; HAUGARREAU, L.; PINTÓ, R.M. Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. **Water Sci Technol** v. 43, p. 61–66, 2001.

CANNON, J.L.E.; PAPAFRAGKOU, G.W.; PARK, J.; OSBORNE, L.A.; JAYKUS, R.; VINJE, J. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. **J. Food Prot.**, v. 69, n.11, p. 2761-2765, 2006.

CHEN, R.; NEILL, J.D.; NOEL, J.S.; HUTSON, A.M.; GLASS, R.I.; ESTES, M.K. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. **J. Virol.**, v. 78, p.6469–6479, 2004.

CLEMENTE-CASARES P, PINA S, BUTI M, JARDI R, MARTIN M, BOFILL-MAS S, GIRONES R. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. **Emerg Infect Dis** v. 9, p.448-454, 2003.

CORREA, A.A.; ALBARNAZ, J.D.; MORESCO, V.; POLI, C.R.; TEIXEIRA, A.L.; SIMÕES, C. O.; BARARDI, C.R.M. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Marine Environ. Res.**, v. 63, n. 5, p. 479-489, 2007.

CROCI, L.; MEDICI, D. D.; SCALFARO, C.; FIORI, A.; TOTI, L. The survival of hepatitis A virus in fresh produce. **International J. of Food Microb.**, v. 73, n. 1, p. 29–34, 2002.

DIVIZIA, M.; GABRIELI, D.; DONIA, A.; MACALUSO, A.; BOSCH, A.; GUIZ, S.; SANCHEZ, G., VILLENA, C.; PINTO, R.M.; PALOMBI, L.; BUONUOMO, E.; CENKO, F.; LENO, L.; BEBECI, D.; BINO, S. Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. **Water Sci. Technol.**, v.50, p.57 – 61, 2004.

DOYLE, A.; BARATAUD, D.; GALLAY, A.; THIOLET, J. M.; LE GUYAGER, S.; KOHLI, E. Norovirus foodborne outbreaks associated with the consumption of oysters from the Etang de Thau, France. **Euro Surveill.**, v. 9, p. 24–26, 2004.

DUIZER, E., SCHWAB, K. J.; NEILL, F. H.; ATMAR, R. L.; KOOPMANS, M. P. G.; ESTES, M. K. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. **J of Gen. Vir.**, n. 85, p. 79–87, 2004.

DUURSMA, E.K.; PARSI, P. Persistence of total and combined chlorine in seawater. **J. Sea Res.**, v. 10, n.2, p. 192-214, 1976.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). Produção de Moluscos, 2008. Available on:<
<http://www.epagri.rct-sc.br/epagri/index.jsp>>, Florianópolis, SC.
Accessed in November 5, 2009.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1998, Water Treatment Manuals: Disinfection. Wexford, Ireland.

ENNAM, S.; DEL VALLE, L.; LARA, C.; GAN, D.D.; ORTIZ-HIDALGO, C.; PALAZZO, J.P.; KHALILI, K. Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and betacatenin. **Cancer Res.**, v. 62, n. 23, p. 7093-7101, 2003.

ENRIQUEZ, R.; FROSNER, G. G.; HOCHSTEIN-MINTZEL, V.; RIEDEMANN, S.; REINHARDT, G. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. **J. Medical Virol**, v. 37, p.174–179, 1992.

ESPINOSA, A.C.; MAZARI-HIRIART, M.; ESPINOSA, R.; MARURI-AVIDAL, L.; MÉNDEZ, E.; ARIAS, C.F. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. **Water Res**, v. 42, n. 10-11, p.2618-2628, 2008.

ESTES, M. K.; BALL, J. M.; GUERRERO, R. A.; OPEKUN, A. R.; GILGER, M. A.; PACHECO, S. S. Norwalk virus vaccines: Challenges and progress. **J. Infect. Dis**, v. 181, n. 2, p.367–373, 2001.

EUROPEAN COMMUNITIES, 1991. Council Directive of 15th of July 1991 laying down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalve mollusks (91/492/EEC). Official Journal of European Communities, v. 268, p. 1–14.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008, Fisheries Technical Paper. Available on: http://www.fao.org/icatalog/search/result.asp?subcat_id=36, accessed at October 28, 2009.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Virus taxonomy, eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. New York, NY: Elsevier Academic Press, 2005.

FENG, H.; SHUDA, M.; CHANG, Y.; MOORE, P.S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. **Science**, v. 319, n. 5866, p. 1096–1100, 2008.

FLEMING, L.E.; BROAD, K.; CLEMENT, A.; DEWAILLY, E.; ELMIR, S.; KNAP, A.; POMPONI, S.A; SMITH, S.; SOLO, G., WALSH, P. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. **Mar. Pollut. Bull**, v.53, n.10-12, p.545-560, 2006.

FORMIGA-CRUZ, M.; ALLARD, A.K.; CONDÉN-HANSSON, A.C.; HENSHILWOOD, K.; HERNROTH B.E.; JOFRE, J. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their

applicability to diverse geographical areas. **Appl Environ Microbiol**, v.69, n. 3, p.1556-1563, 2003.

FORMIGA-CRUZ, M.; TOFIÑO-QUESADA, G.; BOFILL-MAS, S.; LEES, D.N.; HENSHILWOOD, K.; ALLARD, A.K.; CONDEN-HANSSON, A.C.; HERNROTH, B.E.; VANTARAKIS, A.; TSIBOUXI, A.; PAPAPETROPOULOU, M.; FURONES, M.D.; GIRONES, R. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. **Appl Environ Microbiol**, v.68, n.12, p.5990-5998, 2002.

FROST, F.J.; KUNDE, T.R.; CRAUN, G.F. Is contaminated groundwater an important cause of viral gastroenteritis in the United States? **J Environ Health**, v. 65, p. 9-14, 2002.

FUMIAN, T.M.; GUIMARÃES, F.R.; PEREIRA, B.J.; DA SILVA, M.T.; MUYLEAERT, F.F.; BOFILL-MAS, S.; GIRONÉS, R.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. **J Water, Health**, v. 8, n.3, p.438-445, 2010.

FUJIOKA, R.S.; LOH, P.C.; LAU, L.S. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v. 39, n. 6, p. 1105-1110, 1980.

GAYNOR, A.M.; NISSEN, M.D.; WHILEY, D.M.; MACKAY, I.M.; LAMBERT, S.B.; WU, G. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 5, p. 64, 2007.

GERBA, C.P.; GOYAL, S.M.; LABELLE, R.L.; CECH, I.; BODGAN, G.F. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. **Am J Public Health**, v. 69, n.11, p.1116-119, 1979.

GERBA, C.P.; SCHAIBERGER, G.E. Aggregation as a factor in loss of viral titer in seawater. **Water Research**, v. 9, p.567-571, 1975.

GOFTI-LAROCHE, L.; GRATACAP-CAVALLIER, B.; GENOULAZ, O.; JORET, J.C.; HARTEMANN, P.; SEIGNEURIN, J.M.; ZMIROU, D

A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water. **Water Sci Technol**.v. 43, n. 12, p. 39-48, 2001.

GORDON, C.; TOZE, S. Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. **J. Appl. Microbiol**, v. 95, p.536-544, 2003.

GRIFFIN, J.S.; PLUMMER, J.D.; LONG, S.C. Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. **J Virol**, v. 5, p. 112, 2008.

HALLIDAY, M.L.; KANG, L.Y.; ZHOU, T.K.; HU, M.D.; PAN, Q.C.; FU, T.Y. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. **J Infect Dis**, v.164, p. 852-859, 1991.

HEWITT, J.; RIVERA-ABAN, M.; GREENING, G.E. Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. **J. Appl. Microbiol**, v. 107, n. 1, p.65-71, 2009.

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

HOLLINGER, F. B.; EMERSON, S. U. Hepatitis A virus. In B. N. Fields, D. N. Knipe, & P. M. Howley (Eds.), *Virology* (pp. 799– 840). Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

HORWITZ, M.S. ADENOVIRUSES. In: *Virology*, p. 2149-2171. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.

ICTVdB. International Committee of Taxonomy of Viruses data Base, Available on:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>. Acesses November 2, 2009.

JIANG, S.C.; CHU, W.; HE, J.W. Seasonal Detection of Human Viruses and coliphage in Newport Bay, California. **Appl Environ Microbiol**, v.73, p. 6468-6474, 2007.

KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: *Virology*, p. 1657-1708. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.

KAPUSCINSKI, R.B.; MITCHELL, R. Processes Controlling Virus Inactivation in Coastal Waters. **Water Res**, v. 14, n. 4, 363-371, 1980.

KARST, S.M.; WOBUS, C.E.; LAY, M.; DAVIDSON, J.; VIRGIN, H.W. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. **Science**, v. 299, p. 1575-1578, 2003.

KESWICK, B.H.; GERBA, C.P.; DUPONT, H.L.; ROSE, J.B. Detection of enteric viruses in treated drinking water. **Appl Environ Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 1290-1294, 1984.

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

KITAMURA, T.; SATOH, K.; TOMINAGA, T.; TAGUCHI, F.; TAJIMA, A.; SUZUKI, K. Alteration in the JC polyomavirus genome is enhanced in immunosuppressed renal transplant patients. **Virology**, v. 198, p. 341-345, 1994.

KOIVUNEN, J.; HEINONEN-TANSKI, H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, U.V. irradiation and combined chemical/U.V. treatments. **Water Res**, v. 39, p.1519–1526, 2004.

KOIZUMI, Y.; ISODA, N.; SATO, Y.; IWAKI, T.; ONO, K.; IDO, K.; SUGANO, K.; TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H. Infection of a Japanese patient by genotype 4 hepatitis e virus while traveling in Vietnam. **J Clin Microbiol**, v. 42, n.8, p. 3883-3885, 2004.

KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foodborne viruses: An emerging problem. **Int. J. Food Microbiol**, v. 90, n. 1, p. 23–41, 2004.

KOOPMANS, M.; VON BONSDORFF, C.H.; VINJÉ, J.; DE MEDICI, D.Y.; MONROE, S. Foodborne Viruses. **FEMS Microbiol Rev**, v. 26, p. 187-205, 2002.

KOOPMANS, M.; VINJÉ, J.; DE WIT, M.; LEENEN, I.; VAN DER POEL, W. Y.; VAN DUYNHOVEN, Y. Molecular Epidemiology of human enteric caliciviruses in the Netherlands. **J Infect Dis**, v. 181, p. 262-269, 2000.

KUKKULA, M.; ARSTILA, P.; KLOSSNER, M.L.; MAUNULA, L.; BONSDORFF, C. H.; JAATINEN, P. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. **Scand J Infect Dis**. v. 29, n. 4, p. 415-418, 1997.

LEAL, D. A.G.; FRANCO, R.M.B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: Metodologias de detecção e normas de controle. **Rev Panam Infectol**, v. 10, n. 4, p:48-57, 2008.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DELI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Crit Rev Microbiol**, v. 28, p. 371-409, 2002.

LEES, D. International Standardisation of a Method for Detection of Human Pathogenic Viruses in Molluscan Shellfish. **Food Environ Virol**, v. 2, p.146–155, 2010.

LEE, J.; ZOH, K.; KO, G. Inactivation and U.V. disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n.7, p. 2111-2117, 2008.

LEE, C.Y.; PANICKER, G.; BEJ, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink™ NH microwell plate sandwich hybridization. **J. Microbiol. Met**, v. 53, p. 199–209, 2003.

LEES D. Viruses in bivalve shellfish. **Int J Food Microbiol**, v. 59, p. 81-116, 2000.

LE GUYADER, F. S.; LE SAUX, J. C.; AMBERT-BALAY, K.; KROL, J.; SERAIS, O.; PARNAUDEAU, S. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. **J. Clin. Microbiol**, v. 46, p. 4011–4017, 2008.

- LE GUYADER, F. S.; NEILL, F. H.; DUBOIS, E.; BON, F.; LOISY, F.; KOHLI, E. A semi-quantitative approach to estimate Norwalklike virus contamination of oysters implicated in an outbreak. **Int J Food Microbiol**, v. 87, n.1–2, 107–112, 2003.
- LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, L.; DUBOIS, E.; POMMEPUY, M. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 8, p. 3241-3248, 2000.
- LE GUYADER, F.; DUBO, E.; MENARD, D.; POMMEPUY, M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 3665-3671, 1994.
- LETSON D. Oceans and Human Health: Human Dimensions Ch. 5, pp. 91-98 in: Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Sea, P.J. Walsh, S.L. Smith, L.E. Fleming, H. Solo-Gabriele and W.H. Gerwick, eds. Elsevier, 2008.
- LEY V; HIGGINS, J; Fayer, R. Bovine Enteroviruses as Indicators of Fecal Contamination. **Appl Environ Microbiol**, v.68, p.3455-3461, 2002.
- LIANG, D. Evaluation of mollusk as biomonitors to investigate heavy metal contamination along the Chinese Bohai Sea. **Sci. Total Environ**, v. 324, p. 105-113, 2004.
- LOPMAN, B. A.; REACHER, M. H.; VIPOND, I. B.; HILL, D.; PERRY, C.; HALLADAY, T. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002–2003. **Emerg. Infect. Dis** v. 10, n. 10, p. 1827–1834, 2004.
- LOPMAN, B.; VENNEMA, H.; KOHLI, E.; POTHIER, P.; SANCHEZ, A.; NEGREDO, A. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and Epidemic spread of new norovirus variant. **Lancet**, v. 363, p. 682-688, 2004.
- LOPMAN, B.A.; REACHER, M.H.; VAN DUIJNHOFEN, Y.; HANON, F.X.; BROWN, D.; KOOPMANS, M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. **Emerg Infect Dis**, v. 9, p. 90-96, 2003.

LOWTHER, J. A.; AVANT, J. M.; GIZYNSKI, K.; RANGDALE, R. E.; LEES, D. N. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. **J. Food Prot**, v. 73, p. 305–311, 2010.

MARINO, A.; LOMBARDO, L.; FIORENTINO, C. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-01 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Int J Food Microbiol**, v. 99, p. 281-286, 2005.

MAYORAL-CORTES, J.M.; MATEO, A.; PONS, M.C.; HERRERA, C. I.; GUTIÉRREZ, A.G.; VIVO, R.A. Brote de gastroenteritis en una residencia de ancianos de Albacete. **Rev Esp Salud Pública**, v. 74, p.561-72, 2000.

MENG, Z.D.; BIRCH, C.; HEATH, R.; GUST, I. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. **Appl Environ Microbiol**, v. 53, n. 4, p. 727-730, 1987.

MCLEOD, C.; HAY, B.; GRANT, C.; GREENING, G.; DAY, D. Inactivation and elimination of human enteric viruses by Pacific oysters. **J. Appl. Microbiol**, v.107, p. 1809–1818, 2009.

MEHNERT, D.U.; QUEIROZ, A.P.S.; SANTOS, F.M.; CANDEIAS, J.M.G.; HARSI, C.M. Occurrence of human enteric viruses in sewage and surface waters in the city of São Paulo, **Virus Reviews and Research**, v. 4, p. 27, 1999.

MENA, K.D.; GERBA, C.P. Waterborne Adenovirus. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 198, p. 133-167, 2009.

MONARCH, S.; FERETTI, D.; COLLIVIGNARELLI, C.; GUZZELLA, L.; ZERBINI, I.; BERTANZA, G.; PEDRAZZANI, R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Res**, v. 34, n. 17, p. 4261–4269, 2000.

MURPHREE, R. L.; TAMPLIN, M. L. Uptake and Retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 10, p. 3656-3660, 1991.

MYRMEL, M.; BERG, E.M.; RIMSTAD, E.; GRINDE, B. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 5, p.2678-2684, 2004.

NAPPIER, S.P.; GRACZYK, T.K.; SCHWAB, K.J. Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 22, p. 6825-6831, 2008.

NEMEROW, G.R.; PACHE, L.; REDD, Y. V.; STEWART, P.L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. **Virology**, v. 20, n. 2, p.380-388, 2008.

NOBLE, R.T.; FUHRMAN, J.A. Breakdown and microbial uptake of marine viruses and other lysis products. **Aq. Microb. Ecology**, v. 20, p.1-11, 1999.

NOBLE, R.T.; FUHRMAN, J.A. Virus Decay and Its Causes in Coastal Waters. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 1, p.77-83. 1997.

PINA, S.; CREUS, A.; GONZÁLEZ, N.; GIRONES, R.; FELIP, M. Y.; SOMMARUGA, R. Abundance, morphology and distribution of planktonic virus-like particles in two high mountain lakes. **J Plankton Res**, v. 20, p.2413-2421, 1998.

PINTO, R.M.; COSTAFREDA, M.I.; PÉREZ-RODRIGUEZ, F.J.; D'ANDREA, L.; BOSCH, A. Hepatitis A Virus: State of the Art. **Food Environ Virol**, v. 2, p.127-135, 2010.

PINTÓ, R. M.; COSTAFREDA, M. I.; BOSCH, A. Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 7350-7355, 2009.

RAMIG, R.F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **J Virol**, v. 78, n.19, p. 10213-10220, 2004.

RICHARDS, G.P. Enteric Viruses contamination of foods through industrial practices: a primer on interventions strategies. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 27, p.117-125, 2001.

RICHARDS, G. P. Microbial purification of shellfish: A review of depuration and relaying. **J. Food Prot**, v. 51, n. 3, p. 218–251, 1988.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 12, p. 3807-3838, 2005.

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

ROOS, B. Hepatitis epidemic transmitted by oysters. **Svenska La`kartidningen**, v. 53, p. 989–1003, 1956.

RUSSELL, W.C. Adenoviruses: update on structure and function. **J. Gen. Virol**, v. 90, p. 1-20. 2009.

SANCHEZ, G.; PINTÓ, R. M.; VANACLOCHA, H.; BOSCH, A. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. **J. Clin. Microbiol**, v. 40, p. 4148–4155, 2002.

SANTOS, N.; HOSHINO, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. **Rev. Med. Virol.**, v. 15, p. 29-56, 2005.

SAUERBREI, A.; WUTZLER, P. Testing thermal resistance of viruses. **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p. 115-119, 2009.

SCHVOERER, E.; VENTURA, M.; DUBOS, O.; CAZAUX, G.; SERCEAU, R.; GOURNIER, N.; DUBOIS, V.; CAMINADE, P.; FLEURY, H.J.A.; LAFON, M.E. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. **Res Microbiol**, v. 152, p. 179-186, 2001.

SCHWAB, K. J.; NEILL, F. H.; ESTES, M. K.; METCALF, T. G.; ATMAR, R. L. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. **J. Food Prot.**, v. 61, p. 1674–1680, 1998.

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

SEGERMAN, A.; ARNBERG, N.; ERIKSON, A.; LINDMAN, K.; WADELL, G. There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses. **J Virol**, v. 77, n. 2, p. 1157-1162, 2003.

SHENK T. Adenoviridae: The viruses and their replication. In: *Virology*, p. 2111-2148. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds). Vol.2. Lippincott-Raven, 3rd ed., Philadelphia, USA, 1996.

SIMMONS, G.; GARBUTT, C.; HEWITT, J.; GREENING, G. A New Zealand outbreak of norovirus gastroenteritis linked to the consumption of imported raw Korean oysters. **New Zealand Medical Journal**, v. 120, p. 2773, 2007.

SOBSEY, M. D.; DAVIS, A. L.; RULLMAN, V. A. Persistence of hepatitis A virus and other viruses in depurated Eastern oysters. **Proc. Oceans**, v. 87, n. 5, p. 1740–1745, 1987.

TAVARES, T. M.; DE PAULA, D. C.; DIEDERICHSEN, W.M.E. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, 85-104, 2005.

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; HAAS, C.N.; JACANGELO, J.; GERBA, C.P. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n.6, p. 3100-3105, 2005.

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; HAAS, C.N.; JACANGELO, J.; GERBA, C.P. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. **Appl Environ Microbiol**, 69, 3979-3985, 2003.

TREE, J.A.; ADAMS, M.R.; LEES, D.N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 4, p. 2038-2043, 2003.

WALTERS, S.P.; YAMAHARA, K.M.; BOEHM, A.B. Persistence of nucleic acid markers of health-relevant organisms in seawater microcosms: Implications for their use in assessing risk in recreational waters. **Water Res**, v. 43, n.19, p.4929-4939, 2009.

WANG, S.; LEVIN, R. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. **J. Microb. Met**, v. 64, n. 1, p.1-8, 2006.

WARD, J.E. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing and fate. **Invertebrate Biology**, v. 115, n.3, p. 218-231, 1996.

WARD, R.L.; KNOWLTON, D.R.; WINSTON, P.E. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. **Appl Environ Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 450-459, 1986.

WARTON, B.; HEITZ, A.; JOLL, C.; KAGI, R. A new method for calculation of the chlorine demand of natural and treated waters. **Water Research**, v. 40, n. 15, p.2877-2884, 2006.

WESTRELL, T.; DUSCH, V.; ETHELBERG, S.; HARRIS, J.; HJERTQVIST, M.; JOURDAN-DA SILVA, N.; KOLLER, A.; LENGLET, A.; LISBY, M.; VOLD, L. Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, **Euro Surveill**, v. 15, p. 19524. 2010.

WETZ, J.J.; LIPP, E.K.; GRIFFIN, D.W.; LUKASIK, J.; WAIT, D.; SOBSEY, M.D; SCOTT, T.M.; ROSE, J.B. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. **Mar. Pollut. Bull**, v.48, n.7-8, p. 698-704, 2004.

WOBUS, C.E.; THACKRAY, L.B.; VIRGIN, H.W. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. **J. Vir**, v. 80, p. 5104-5112, 2006.

WOBUS, C. E.; KARST, S. M.; THACKRAY, L. B.; CHANG, K. O.; SOSNOVTSEV, S. V.; BELLLOT, G. Replication of norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. **PLoS Biology**, v. 2, n. 12, p.432, 2004.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p.75-85, 2005.

WONG, G.T.F.; OATTS, T.J. Dissolved Organic Matter and the Dissipation of Chlorine in Estuarine Water and Seawater. **Water Res**, v. 18, n. 4, p.501-504, 1984.

WONG, G.T.F.; DAVIDSON, J.A. The fate of chlorine in seawater. **Water Res**, v. 11, p. 971-978, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on Infectious Diseases. Geneva: WHO; 2004. Disponible en: www.who.int/infectious-disease-report/

WYN-JONES, A.P.; SELLWOOD, J. A review: Enteric viruses in aquatic environment. **J Appl Microbiol**, v. 91, p. 945-962, 2001.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética de desinfecção viral em ostras de cultivo e em água do mar, para a aplicação em sistemas de depuração de moluscos bivalves, a partir do desenvolvimento de três tópicos de estudo:

- Avaliação da eficiência de um sistema fechado de depuração comercial na eliminação de Adenovírus Humano 5, Vírus da Hepatite A e Rotavírus em ostras *Crassostrea gigas* cultivadas em Santa Catarina;
- Análise da cinética de desinfecção de Adenovirus Humano tipo 2, Norovírus Murino tipo 1 e Poliomavirus JC em água do mar natural e artificial submetida a tratamento com cloro livre;
- Análise da estabilidade e cinética de desinfecção de Adenovirus Humano tipo 2, Norovírus Murino tipo 1 e Vírus da Hepatite A em água do mar natural submetida a tratamento com radiação Ultravioleta.

CAPÍTULO 1

**Dinâmica de Depuração de Ostras (*Crassostrea gigas*)
artificialmente contaminadas com Vírus da Hepatite A e
Adenovírus**

1.1 JUSTIFICATIVA

A produção mundial de moluscos bivalves tem aumentado substancialmente nos últimos cinquenta anos, passando de cerca de um milhão de toneladas em 1950 para cerca de 13,6 milhões de toneladas em 2005. A China é atualmente o principal produtor destes moluscos, com 9,5 milhões de toneladas em 2005, o que representa 70% da produção total de bivalves e 80,2% da produção mundial de produtos da aquicultura (FAO, 2008).

De acordo com estatísticas da FAO (2008), em 2005, outros grandes produtores de bivalves cultivados foram o Japão (794.940 t), Estados Unidos (707.200 t), Coreia (389.800 t), Tailândia (386.540 t) e França (253.333 t), seguida pela Espanha (174.166 t), Itália (158.314 ton) e Chile (140.808 ton). A produção de aquicultura de bivalves na América Latina e no Caribe atingiu 128.418 t, representando 1,07% do total global para a produção de aquicultura.

A produção de moluscos no Brasil, apesar dos vastos recursos naturais e diversificados, está praticamente restrito ao estado de Santa Catarina, reconhecido como o principal produtor de ostras (*Crassostrea gigas*) e Mexilhões (*Perna perna*), com uma produção de 1.792 e 10.663 t em 2009, respectivamente (EPAGRI, 2009). Esta produção classifica o Brasil como o maior produtor de ostras da América Latina.

O controle sanitário da qualidade de moluscos e águas de cultivo, na maioria dos países produtores, inclusive o Brasil, é baseado somente em parâmetros bacterianos (coliformes e *E. coli*). De acordo com a atual legislação nacional, a resolução n. 12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), não é realizada a avaliação de coliformes termotolerantes para moluscos “in natura”, exigindo unicamente a detecção para *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva (ANVISA, 2001). Os níveis de coliformes termotolerantes ou *E. coli* é exigência somente para a qualidade das águas de cultivo, conforme resolução n° 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005). Entretanto, como tais microrganismos são facilmente inativados pelos procedimentos de tratamento de água ou efluentes, um número aceitável destas bactérias não assegura a inexistência de outros patógenos resistentes à inativação, tais como os vírus entéricos (LEES, 2000).

A presença de vírus entéricos nas águas de esgoto representa um grande risco a população, pois estas águas são lançadas em rios, córregos e até mesmo no mar, contaminando as águas de recreação, consumo humano e de cultivo de moluscos. Considerando que nos últimos anos foi detectado um aumento da poluição dos locais de cultivo

de moluscos no Estado de Santa Catarina, com a detecção de patógenos virais e bacterianos nos moluscos e nas águas de cultivo (SINCERO et al., 2006; VICTORIA et al., 2010; RIGOTTO et al., 2010), um controle sanitário dos produtos de maricultura torna-se urgente, para que estas áreas e a produção de moluscos apresentem uma qualidade microbiológica de acordo com a regulamentação vigente no País (ANVISA, 2001). No meio ambiente, os vírus são capazes de se agregar rapidamente às partículas sólidas, protegendo-se desta forma dos fatores inativantes, o que favorece sua sobrevivência (MARINO et al., 2005).

Visando o controle desta contaminação, métodos de limpeza dos moluscos como a transposição para áreas de água mais limpas e a depuração são amplamente utilizados em outros países. Ambos os processos baseiam-se na capacidade de filtração dos moluscos, considerando que naturalmente serão eliminados os microrganismos adsorvidos a seus tecidos (LEE; PANICKER; BEJ, 2003). O princípio deste processo é a manutenção dos moluscos, por um determinado tempo, em contato com água limpa sob condições controladas, a fim de que, através do processo de filtração, os patógenos presentes no tecido digestivo sejam excretados nas fezes e pseudofezes (RICHARDS, 1988; CROCI et al., 2002; RODRICK; SCHNEIDER, 2003; MARINO et al., 2005).

Existem dois tipos principais de sistemas de depuração de moluscos bivalves: de fluxo contínuo e de recirculação (fechado). Ambos os processos de depuração são eficazes; o sistema de fluxo contínuo requer uma fonte próxima de água do mar, de boa qualidade microbiológica. Nos sistemas fechados de depuração, a água do mar é recirculada por pelo menos 24 horas, e durante este ciclo, a água é tratada química (cloro ou ozônio) ou fisicamente (radiação U.V.) para eliminar contaminação por microrganismos.

A comercialização de moluscos bivalves para fora de fronteiras estaduais necessita de um certificado de inspeção sanitária do Serviço de Inspeção Federal (SIF), cujo órgão emissor é o Serviço de Inspeção de Produto Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A falta desta certificação e do conhecimento das origens do produto limita o comércio dos moluscos. Este registro, exigido para comercialização, funciona como um certificado de qualidade, informando a procedência dos produtos vendidos. Para consegui-lo o produtor necessita seguir uma série de determinações do MAPA, que vão desde medidas para construção das instalações, roupas utilizadas por funcionários e uma certificação da qualidade microbiológica da origem dos moluscos (RIGOTTO et al., 2005). Em 2005, através do decreto nº

5.564, de 19 de outubro (BRASIL, 2005), foi instituído o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves, formado pelos Ministério de Aquicultura e Pesca (MPA), MAPA e ANVISA, com a finalidade de estabelecer e avaliar os requisitos necessários para garantia da qualidade higiênico-sanitária dos moluscos bivalves, visando à proteção da saúde da população e à criação de mecanismos seguros para o comércio nacional e internacional.

A legislação brasileira não prevê qualquer tratamento prévio de purificação dos moluscos. Estudos brasileiros sobre depuração de moluscos são raros, porém tornam-se necessários considerando-se a necessidade de maior conhecimento nesta área com a finalidade de melhorar a qualidade dos moluscos comercializados.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência de um sistema fechado de depuração comercial na eliminação de patógenos entéricos virais em ostras cultivadas em Santa Catarina, empregando técnicas moleculares e de cultura celular.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Produzir e titular suspensões-estoque dos vírus da hepatite A (cepa HM 175), Adenovírus Humano (cepa HAdV5) e Rotavírus Símio (cepa SA11) em células FrHk-4, Hep-2 e MA104, respectivamente;
- Padronizar ensaios de biocumulação, para contaminar experimentalmente ostras de cultivo, a serem depuradas, com concentrações conhecidas dos vírus selecionados;
- Extrair os ácidos nucléicos totais dos tratos gastrointestinais das ostras artificialmente contaminadas para a detecção da presença e viabilidade viral através de PCR, RT-PCR e ICC-PCR;
- Determinar a eficiência do processo de depuração idealizado pela empresa *Blue Water Aquaculture* em relação à purificação de ostras contaminadas com patógenos virais, através do desenvolvimento de ensaios de depuração com o uso de água tratada com radiação ultravioleta;
- Quantificar a contaminação viral presente nas amostras de ostras submetidas ao processo de bioacumulação e de depuração, através da técnica de qPCR.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Delineamento Experimental

Os experimentos e resultados apresentados neste capítulo foram realizados no período compreendido entre os meses de novembro de 2006 a novembro de 2008. Estes trabalhos foram divididos em duas etapas: estabelecimento de condições experimentais (padronização de técnicas) e aplicação destas condições em ensaios de depuração de moluscos em um sistema comercial. A Figura 1.1 apresenta um fluxograma das atividades realizadas neste período.

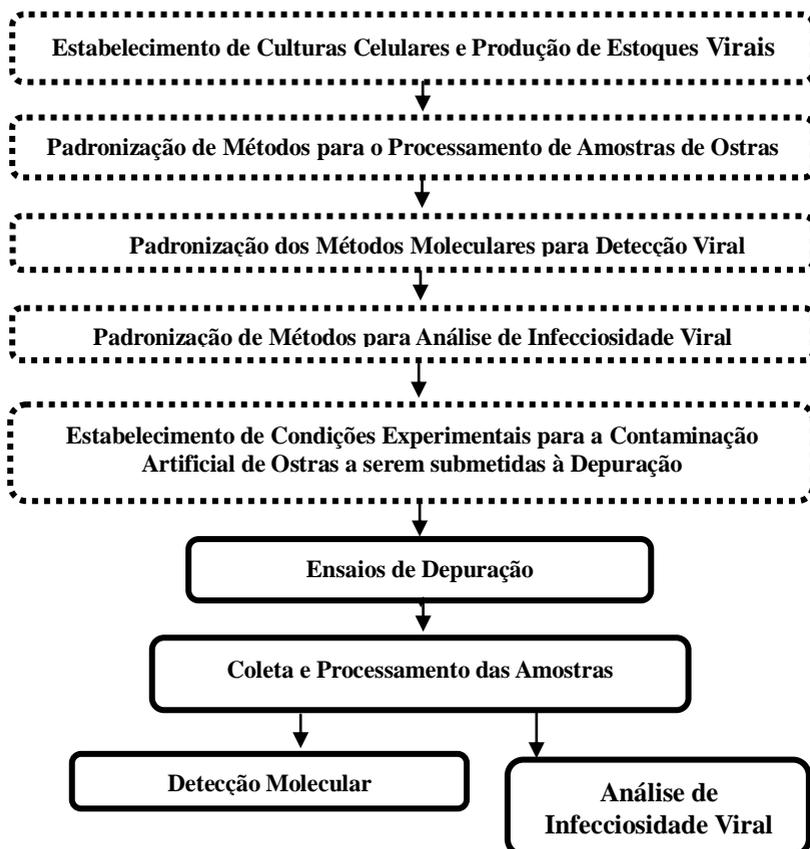


Figura 1.1: Fluxograma das etapas experimentais seguidas para os experimentos de depuração viral. Linha tracejada: etapas de padronização dos métodos; Linha inteira: etapas de aplicação dos métodos.

METODOLOGIAS PARA PRODUÇÃO DE SUSPENSÕES VIRAIS

1.3.2 Vírus e Células

Foram utilizadas as cepas HAdV5, de Adenovírus Humano; HM 175, do Vírus da Hepatite A e SA11, de Rotavírus Símio, as quais foram propagadas e quantificadas nas seguintes linhagens celulares:

- FRHK-4 (células de rim de macaco Rhesus): vírus da hepatite A (HAV), cepa HM175
- HEP-2 e A549 (células de carcinoma de orofaringe humana e de pulmão humano, respectivamente): Adenovírus, cepa HAdV5 (HAdV)
- MA104 (células de rim de macaco Rhesus): Rotavírus cepa SA11 (RV SA11)

As células FRHK-4, HEP-2 e A549 foram mantidas em garrafas de 75cm² contendo Meio Mínimo Essencial com sais de Eagle's (MEM, Sigma) adicionado de bicarbonato de sódio, antibióticos/antifúngico: penicilina G e sulfato de estreptomicina/anfotericina B (Gibco-BRL) nas concentrações finais de 100U/ml, 100µg/ml e 0,25 µg/ml, respectivamente e soro fetal bovino à 10% (SFB, Gibco-BRL).

Para a propagação e manutenção das células MA104 foi utilizado meio MEM, suplementado com L-glutamina 2mM, aminoácidos não-essenciais 1X, HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfônico] 15mM, soro fetal bovino (SFB) 10%, e antibióticos e antifúngico a 1% (penicilina G 100U/ml; estreptomicina 100µg/ml; anfotericina B 0,25µg/ml). As células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera com 5% de CO₂.

1.3.3 Estoques Virais

Para a produção dos estoques virais de HAdV5 e HAV, monocamadas confluentes de células HEP-2 e FRhK-4, respectivamente, foram lavadas 3X com PBS e infectadas com 1ml de estoque viral previamente produzido. Após um período de adsorção viral, por 1h a 37°C/5% CO₂, o inóculo viral foi removido e meio de manutenção (MEM suplementado com 2% de SFB e 1% antibióticos) foi adicionado. As células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera com 5% de CO₂, por até 2 (para infecção por HAdV5) e 7 dias (para infecção por HAV).

Para a produção de RV SA11, células MA104 em monocamada confluyente, inoculadas com 1ml do estoque viral, pré-tratado com tripsina 10µg/ml, por 30 min a 37°C. Após a adsorção viral, por 1h a 37°C, o inóculo viral foi removido e meio MEM suplementado com tripsina 5µg/ml e livre de SFB foi adicionado à cultura de células infectadas. As células, então, foram mantidas a 37°C, sob atmosfera com 5% de CO₂, até a destruição total da monocamada celular, entre 12h e 24h.

Após o período de infecção de cada um dos vírus, as células foram congeladas a -80°C e descongeladas a 37°C por três vezes, a fim de ocasionar a lise celular, e esta suspensão foi transferida para um tubo e centrifugada a 3.000×g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante livre de restos celulares foi transferido para um novo tubo, distribuído em alíquotas de 1 ml e estocado a -80°C para uso nos ensaios posteriores.

1.3.4 Titulação dos Estoques Virais

O título infeccioso de cada um dos estoques virais produzidos neste trabalho foi determinado através do método de imunofluorescência indireta (IFA), de acordo com Barardi et al. (1998), com algumas modificações.

Foram preparadas, 24h antes do ensaio, lâminas Lab-Tek® (Nunc), contendo oito cavidades cada uma, com 5×10^4 células MA104 (para a titulação de RV SA11) e $1,5 \times 10^5$ células HEP-2 e FRhK-4 (respectivamente para a titulação de HAdV5 e HAV) por cavidade. As lâminas foram mantidas a 37°C, sob atmosfera com 5% de CO₂.

Para a titulação de HAdV5 e HAV, o fluido viral foi diluído seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} em meio de manutenção e 100µL de cada uma destas diluições foram inoculados nos poços, em duplicata. Após adsorção viral, por 1h a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂, o inóculo foi removido e 500µl de meio de manutenção foram adicionados. As células ficaram sob incubação durante 2 (para HAdV5) e por 7 dias (para HAV) nas mesmas condições de temperatura e atmosferas mencionadas acima. Os controles negativos (controles celulares) consistiram somente de inoculação com PBS.

Para a titulação de RV SA11, foi realizada uma diluição seriada conforme para HAdV5 e HAV, mas a suspensão viral a ser titulada foi pré-ativada com tripsina 10µg/ml, por 30 min a 37°C, e diluída em meio MEM sem SFB. Volumes de 50µL de cada diluição foram semeados em duplicada nas lâminas contendo células MA104. As lâminas foram incubadas por 1h a 37°C, sob atmosfera com 5% de CO₂, para adsorção

viral. Após, o inóculo foi removido e 300µL de MEM, suplementado com tripsina 5µg/ml e livre de SFB, foram adicionados a cada cavidade. As lâminas foram incubadas por 24h, a 37°C, sob atmosfera com 5% de CO₂.

Após o período de adsorção viral, o procedimento realizado para cada uma das três linhagens celulares foi o mesmo: as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas por tratamento com metanol absoluto gelado por duas vezes de 5 min cada vez. As lâminas foram lavadas, novamente, duas vezes com PBS e incubadas em solução bloqueadora [soroalbumina bovina (BSA) 1%, Tween-20 0,05%, PBS], por 10 min. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS, sob agitação a temperatura ambiente (TA) e incubadas com o anticorpo primário MAb60 diluído na razão 1:4 em solução bloqueadora (IgG de camundongo anti-VP7 de rotavírus, para titulação de RV SA11), MAb8052 diluído na razão 1:200 em solução bloqueadora (antiadenovírus clone 20/11, Millipore) e MAB8241 (Chemicon International Inc.). As lâminas foram incubadas por 60 min a 37°C e, posteriormente, lavadas três vezes em solução bloqueadora, sob agitação a TA.

Após, as lâminas foram incubadas, por 15 min a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluído na razão 1:100 em solução bloqueadora. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes em solução bloqueadora, secas a temperatura ambiente e montadas em solução de montagem [formalina 5%, NaCl 0,25M, DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), pH 8,6, 2,5%] para leitura em microscópio de fluorescência. Os valores da titulação de cada vírus por imunofluorescência indireta foram expressos em FFU/ml (*Focus Forming Unit/ml*).

METODOLOGIAS PARA O PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE OSTRAS

1.3.5 Ostras

As ostras da espécie *Crassostrea gigas* utilizadas nos ensaios de depuração, foram adquiridas pela empresa *Blue Water Aquaculture* diretamente da fazenda de cultivo Cantinho da Ostra, localizada no bairro Santo Antônio de Lisboa, ao norte da cidade de Florianópolis/SC.

1.3.6 Dissecação das ostras

Para a detecção viral, as ostras foram dissecadas com a finalidade de se trabalhar com os tecidos individualizados. Anteriormente à abertura das valvas dos moluscos, foi coletada a hemolinfa diretamente do músculo adutor intacto, com o auxílio de uma seringa. Para a dissecação, as valvas foram abertas com auxílio de uma espátula estéril e com o uso de bisturi e de uma pinça estéreis, a carne do manto, palpos, brânquias e hepatopâncreas foram separadas e armazenadas individualmente em tubos de 50 ml. Após a dissecação, os tecidos das ostras foram homogeneizados com um homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax (Modelo T25 basic, IKA Labortechnik), para a obtenção de uma solução tecidual líquida e homogênea, da qual foram eluídas as partículas virais.

Os diferentes tecidos dissecados foram utilizados somente para as análises moleculares por qPCR para quantificação de genomas virais de HAdV5 (item 1.3.9.2) em ostras submetidas a depuração. Para as demais análises, foram utilizados os tecidos provenientes do hepatopâncreas das ostras.

1.3.7 Preparação de extratos teciduais

Este procedimento foi realizado de acordo com Sincero et al. (2006), com algumas modificações. Um volume de 2 ml do homogeneizado foi transferido para um tubo de 50ml contendo 4 ml de caldo triptose fosfato (TPB) 10%, preparada em glicina 0,05M, pH 9,0. Os tubos foram agitados no vórtex até completa homogeneização e, posteriormente, deixados sob agitação por 30 min a temperatura ambiente. A seguir, os tubos foram adicionados de 6 ml de clorofórmio:butanol (1:1) e homogeneizados em vórtex por 30s. Os tubos foram, então, centrifugados a 11.500×g, a 4°C, por 15 min.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 50 ml para centrífuga e adicionada de 6 ml de polietilenoglicol (PEG) 24%, dissolvido em NaCl 1,2M. Os tubos foram agitados, por 2h, a 4°C. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 11.500×g, por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi suspenso em 3 ml de água MilliQ estéril.

Tendo por objetivo, aumentar a sensibilidade de recuperação viral a partir de carne de ostras artificialmente semeadas com vírus entéricos, foi avaliada a adição de uma etapa final de clarificação com clorofórmio. Para tal, após a dissolução do precipitado final em água MilliQ estéril, as amostras foram adicionadas de 30% de clorofórmio, agitadas em agitador tipo *vórtex*, centrifugadas a 11.500×g, por 10 min,

a 4°C, e o sobrenadante coletado. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da realização dos ensaios de detecção do genoma viral para a purificação do material genético.

ANÁLISES MOLECULARES

1.3.8 Extração dos ácidos nucleicos totais a partir dos extratos teciduais

Os ácidos nucleicos totais foram extraídos a partir de 400 µl de amostra, utilizando o método descrito por Boom et al. (1990), com algumas modificações.

Primeiramente, foram adicionados 800µL de tampão de lise L6 (100 ml de Tris-HCl 0,1M, pH 6,4, 22 ml de EDTA 0,2M, pH8,0, 2,6ml de Triton X-100, 120g de isotiocianato de guanidina) aos tubos contendo 400 µl de extrato, que foram agitados em vórtex e incubados a temperatura ambiente (~25°C) por 10 min. A seguir, foram adicionados 15 µl de sílica (60g de dióxido de silício e água deionizada q.s.p. 500 ml, pH 2,0) e os tubos agitados em vórtex e incubados a temperatura ambiente por 20 min, sob agitação.

A seguir, os tubos foram centrifugados a 18.000×g, por 1 min, e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 µl de solução de lavagem L2 (100 ml de Tris-HCl 0,1M, pH 6,4, 120g de isotiocianato de guanidina), os tubos foram agitados em vórtex, centrifugados a 18.000×g, por 1 min, e os sobrenadantes descartados. Após foram realizados mais dois passos de lavagem do precipitado com etanol 70% e acetona, respectivamente, da mesma forma como realizado com o tampão L2.

Os precipitados, constituídos pelos ácidos nucleicos adsorvidos à sílica, resultantes da lavagem com acetona foram secos em banho-maria a 56°C, por 15 min, nos tubos com as tampas abertas. Após, foram adicionados 60 µl de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) em cada tubo e os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 56°C, por 15 min, com as tampas fechadas. A seguir, os tubos foram centrifugados a 18.000×g, por 3 min. Foram coletados 45 µl do sobrenadante de cada tubo contendo os ácidos nucleicos.

1.3.9 Amplificação Gênica

1.3.9.1 PCR qualitativo

A detecção molecular de HAdV5 foi realizada com o uso dos pares de iniciadores (Invitrogen Brazil- Life Technologies, Sao Paulo, SP) hexAA 1885/hexAA 1913 (PCR convencional) e nehexAA 1893/nehexAA 1905 (Nested-PCR), bem como das condições de amplificação, descritos por Allard et al. (1990) e Puig et al. (1994), respectivamente. Estes pares de iniciadores geram produtos de 300 pb e 142 pb, respectivamente, do gene *Hexon* dos HAdV.

A detecção molecular de HAV e RV SA11 foi precedida por uma etapa de transcrição reversa para a produção do DNA complementar (cDNA) do genoma viral. Para a síntese do cDNA, uma aliquota de 5.0µl do RNA viral foi aquecida a 99°C por 5 min, seguida de resfriamento em banho de gelo por 2 min. A reação de transcrição reversa (RT) do RNA viral desnaturado foi realizada com o uso de iniciadores randômicos pd(N)₆ (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) e da enzima transcriptase reversa M-MLV (InvitrogenTM, CA, USA), por um período de 60 min, a 37°C, em termociclador (Techne Flexigene), seguida por incubação a 75°C por 10 min.

Os pares de iniciadores e condições de amplificação utilizadas para a detecção de HAV foram os descritos previamente por Paula et al. (2004). Para a RT-PCR foram utilizados os iniciadores F6 (+) e F7 (-), os quais amplificam um fragmento de 392 pb, de todos os genótipos de HAV. Para a reação de Nested-PCR utilizou-se os iniciadores F8 (+) e F9 (-), os quais amplificam um fragmento de 247 pb.

Para os ensaios de RT-PCR para RV SA11, foram utilizadas as condições de amplificação e iniciadores VP6-F e VP6-R, os quais amplificam um fragmento de 379pb do gene que codifica a proteína VP6, previamente descritos por Iturriza-Gómara et al. (2002).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris 89mM-ácido bórico 89mM-EDTA 2mM), a 100V, corados com brometo de etídeo 0,5µg/ml, e visualizados em transluminador U.V., para posterior fotodocumentação com o equipamento *Kodak Image System*. Controles negativos (água deionizada estéril) e positivos (DNA purificado de estoque viral) foram usados em todos os experimentos.

1.3.9.2 PCR quantitativo (qPCR) para HAdV5

O ensaio de qPCR foi realizado com iniciadores, sonda e condições de amplificação descritos por Hernroth (2002), utilizando o termociclador StepOne™ Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). Para evitar inibição da amplificação e aumentar a sensibilidade da reação, as amostras sempre foram analisadas em duplicata, e diluições 1:10 dos ácidos nucleicos. A curva padrão aplicada foi preparada a partir de um fragmento de DNA de HAdV, sorotipo 41, clonado em plasmídeo pBR322 (gentilmente doado pela Dr. Rosina Gironés, da Universidade de Barcelona). Controles negativos foram incluídos em todos os experimentos. Os protocolos completo do qPCR para HAdV2 e produção de curvas padrão estão descritos no item 2.3.13.1.

A quantificação do genoma de HAdV5, nos diferentes tecidos de ostras, foi expressa em cópias genômicas por grama de tecido (CG/g). Os dados médios de três experimentos independentes foram pareados com os tempos de amostragem e para a preparação dos gráficos foi utilizado o software *GraphPad Prism 5*.

1.3.9.3 Determinação do limite de sensibilidade das reações de PCR e RT-PCR

Para avaliar o limite de detecção viral em tecido de ostras, alíquotas de 2ml de hepatopâncreas, dissecado e homogeneizado, foram semeadas com diferentes diluições dos três vírus, simultaneamente. Essas alíquotas foram submetidas ao procedimento descrito no item 1.3.7 para a eluição viral. Após este procedimento, foi realizada a extração do material genético (item 1.3.8) e a detecção por PCR/RT-PCR qualitativo, de acordo com o item 1.3.9.1.

ANÁLISES DE INFECCIOSIDADE VIRAL POR CULTIVO CELULAR

1.3.10 Avaliação da citotoxicidade do extrato de ostras

Com o objetivo de avaliar a toxicidade dos extratos teciduais de hepatopâncreas das ostras, frente as diferentes linhagens celulares, ensaios de citotoxicidade foram realizados. Estes ensaios têm por finalidade estabelecer a diluição na qual o tecido das ostras não apresenta toxicidade para as células e vírus de interesse. Esta diluição serviu como base para as análises posteriores envolvendo a inoculação de amostras teciduais de ostras, contendo vírus e submetidas ao processo

de depuração, em células cultivadas *in vitro* e posteriormente submetidas à detecção molecular por amplificação gênica. Foram utilizadas amostras negativas para os vírus selecionados neste trabalho (resultado confirmado por PCR), para que as alterações morfológicas observadas nas células fossem somente devidas aos componentes das amostras e não à infecção viral.

Previamente à inoculação em cultivo celular, as amostras testadas foram tratadas com antibiótico/antifúngico (penicilina G 100U/ml/ estreptomicina 100µg/ml/anfotericina B 0,25µg/ml). Para a inoculação em células MA104, as amostras foram também tratadas previamente com tripsina (10µg/ml) por 30 min.

Células HEP-2, A549, MA104 e FRhK-4 foram propagadas em placas de cultivo celular de 24 poços, na concentração de 2×10^5 células por poço, por 24h antes da realização dos ensaios. A inoculação das amostras foi realizada da seguinte maneira: diluições seriadas de amostras negativas (oustras não infectadas), para cada um dos vírus, variando de 1:2 a 1:32 foram preparadas em meio de cultivo MEM 1X sem SFB. Um inóculo de 100µl de cada uma das diluições foi colocado em contato com as células por um período de 60 min, a 37°C/5% CO₂. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Após o período de adsorção, o inóculo foi removido e 1ml de meio de manutenção foi adicionado às células. As placas foram incubadas a 37°C com 5% CO₂, e as possíveis alterações morfológicas na monocamada celular foram observadas após uma incubação de 48h (para MA104 e HEP-2), 96h (para A549) e 7 dias (para FRhK-4) de incubação. Cada observação foi comparada aos controles celulares. As células foram observadas em microscópio de luz invertido, fixadas e coradas com 250 µl de uma solução de Preto de Naftaleno (0,1% Preto de Naftaleno, 5% Ácido Acético, pH 2,3-2,4), para a visualização das células viáveis e estabelecimento da diluição não citotóxica dos extratos teciduais para ser utilizada nos ensaios de infecciosidade.

1.3.11 PCR integrado ao Cultivo Celular (ICC-PCR)

Após o estabelecimento das diluições não citotóxicas do extrato tecidual de ostras, procedeu-se a análise das amostras de ostras submetidas ao processo de depuração. Tal procedimento foi realizado com todas as amostras dos ensaios de depuração, com a finalidade de analisar a infecciosidade viral, bem como verificar se ocorria um aumento da sensibilidade da detecção por amplificação gênica.

As amostras foram previamente tratadas, conforme descrito no

item 1.3.10, diluídas nas diluições não citotóxicas pré estabelecidas e inoculadas em monocamadas celulares. Após o período de adsorção viral, as células foram lavadas com PBS para eliminar possíveis partículas virais não infecciosas que não penetraram nas células; adicionou-se meio de manutenção e as placas foram mantidas sob as mesmas condições descritas no item anterior.

Ao final do período de incubação para cada vírus, as placas foram retiradas da estufa e sofreram 3 ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento; após este procedimento, 400µl do sobrenadante foi retirado e o material genético extraído conforme item 1.3.8; em seguida foram realizadas as reações de amplificação gênica por PCR qualitativo (item 1.3.9.1).

1.3.12 Imunofluorescência Indireta para HAdV5

A análise de infecciosidade viral por IFA em amostras de ostras, submetidas ao processo de depuração, foi realizada com a finalidade de confirmar resultados obtidos por ICC-PCR. Estes ensaios foram feitos somente para a detecção de HAdV5, o qual é identificado como um dos patógenos mais resistentes a processos de desinfecção. A metodologia aplicada para estes experimentos foi a mesma utilizada para a titulação de estoques virais de HAdV5, descrita no item 1.3.4, utilizando a diluição não citotóxica estabelecida nos ensaios de citotoxicidade (item 1.3.10).

ENSAIOS DE DEPURAÇÃO VIRAL POR OSTRAS *C. GIGAS*

1.3.13 Sistema de depuração comercial

O sistema de depuração comercial, utilizado no presente trabalho, foi projetado e desenvolvido pela empresa de consultoria em Aquicultura *Blue Water Aquaculture*. O mesmo foi alocado na fazenda de cultivo Cantinho da Ostra, no bairro de Santo Antônio de Lisboa, ao norte de Florianópolis.

Este sistema foi planejado em sistema fechado de circulação de água (2.200l/h), composta por um tanque com capacidade para 1.000l de água do mar, uma bomba de água acoplada a um filtro de areia, uma bomba dosadora de cloro, um sistema de luz U.V. e um compressor destinado à manutenção da temperatura (Figura 1.2). Cada uma dessas unidades, localizadas em um módulo adjacente ao tanque de água, é independente uma das outras, sendo possível a utilização de somente uma ou da associação entre elas.

O tanque da depuradora comporta 19 caixas numeradas (cada

uma com 10 dúzias de ostras), distribuídas em 5 colunas com 4 andares cada, apoiadas em um suporte inferior, destinado a evitar o contato direto com as fezes e pseudofezes que se acumulam no fundo do tanque.

O equipamento de radiação U.V. (18W, ATMAN II, baixa pressão, luz monocromática 254nm) esteriliza a água com o comprimento de onda que pertence à faixa aceitável para a desinfecção da água, numa intensidade de 6 mJ/cm^2 . A esterilização por U.V. obrigatoriamente exigiu que a água passasse previamente pelo filtro de areia para a retirada de sólidos em suspensão, considerando que a turbidez da água poderia também diminuir a penetração da radiação, reduzindo, conseqüentemente, a eficiência da esterilização.

A água recirculada durante os ciclos de depuração foi proveniente diretamente do local onde as ostras foram coletadas. A cada experimento, o tanque da depuradora foi limpo e preenchido com água com a ajuda de uma bomba vibratória submersa. A temperatura da água foi mantida a 18° C durante todo o período de depuração, através do ajuste do sistema de refrigeração. Ao início de cada ciclo de depuração, e pós depuração, foi realizada uma retro lavagem no filtro de areia para a limpeza do meio filtrante. A retro lavagem consistiu na inversão do fluxo de água e com essa inversão, a água, sob pressão, provocava a expansão da areia, agitando e atritando os grãos, desprendendo a sujeira acumulada.

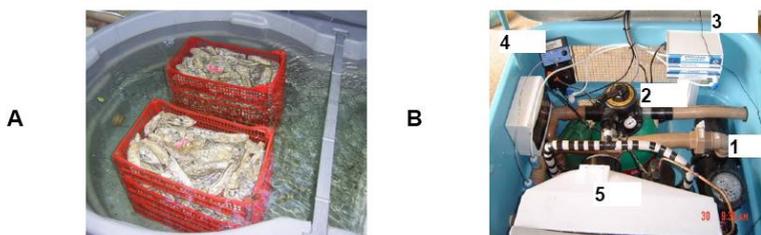


Figura 1.2 Sistema de Depuração Comercial de Moluscos Bivalves. **A:** Tanque de Depuração com capacidade para 1.000 litros de água do mar, 100 dúzias de ostras organizadas em 15 caixas plásticas, distribuídas em 5 colunas, com 3 andares em cada coluna. **B:** Sistema de Depuração: 1. sistema de bombeamento, 2. filtro de areia, 3. lâmpada de UV, 4. Bomba de Cloro, 5. Sistema de Resfriamento para a manutenção da temperatura da água

1.3.14 Bioacumulação de patógenos virais por ostras *C. gigas*

O procedimento de bioacumulação foi realizado para contaminar artificialmente as ostras que foram submetidas ao processo de depuração comercial. Esta contaminação artificial ocorreu através da exposição das ostras, por um determinado tempo, à água do mar semeada com concentrações conhecidas dos vírus selecionados. Após cada ensaio de bioacumulação, as ostras foram colocadas por 10 min em uma solução de 0,5% de hipoclorito de sódio para desinfecção das valvas. Para a padronização destes ensaios foram realizados dois experimentos, ambos utilizando RV SA11 como modelo, na concentração final de 3×10^3 FFU/ml de água do mar:

- Uso de microalgas como estratégia para estimular o processo de filtração pelas ostras:

Foram utilizados dois aquários com 3l de água do mar, contendo três ostras cada um. Em um dos aquários, a contaminação foi realizada com RV SA11, previamente adsorvidos, por 30 min, em 300ml de microalgas. No segundo aquário, a contaminação foi realizada com a inoculação direta de RV SA11 na água do mar. Após 3h de exposição a esta contaminação, as ostras foram coletadas, processadas de acordo os itens 1.3.6 e 1.3.7, e analisadas por PCR (item 1.3.9.2).

- Ensaio de bioacumulação em diferentes tempos de exposição:

Foram utilizados 5 aquários, com 3L de água do mar e três ostras cada um. Cada aquário correspondeu a um tempo de exposição (30, 60, 90, 120 e 180 min), sendo que em cada tempo as três ostras de um dos aquários foram retiradas e processadas de acordo os itens 1.3.6 e 1.3.7 e analisadas por PCR (1.3.9.2).

1.3 15 Depuração viral pelas ostras *C. gigas*

Após o estabelecimento das condições de contaminação artificial das ostras, procedeu-se aos ensaios de depuração no sistema comercial. O procedimento de bioacumulação foi desenvolvido por 3h de contato com água semeada simultaneamente com os três vírus selecionados, cada um na concentração final de 3×10^3 FFU/ml de água do mar. Foram expostas à contaminação, 12 ostras, das quais 3 foram analisadas para verificar a eficiência da contaminação (controle positivo de cada ensaio), e as demais foram identificadas e submetidas ao processo de depuração em sistema fechado.

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que cada repetição consistiu de um ciclo completo de depuração de 96h. Para a distribuição das ostras, foram utilizadas 9 caixas, sendo que cada uma das caixas recebeu uma ostra artificialmente contaminada, identificada com tinta colorida, juntamente com outras 6 dúzias de ostras não contaminadas. Em 48h, 72h e 96h foram coletadas 3 ostras artificialmente contaminadas (mediante sorteio prévio) e reunidas como uma única amostra. Como controles negativos, a cada repetição, foram coletadas duas amostras de três ostras não contaminadas artificialmente (amostras da fazenda de cultivo) nos períodos pré e pós depuração. Após a coleta das ostras, estas foram processadas para concentração, detecção, quantificação e análise da viabilidade viral.

1.3.16 Análise da água do mar utilizada nos ensaios de depuração

Em paralelo às análises de contaminação viral nas ostras depuradas, foram analisadas amostras de 2l da água do mar utilizada nos ensaios de depuração, após 48h, 72h e 96h de recirculação.

A concentração viral em água do mar foi realizada pelo método de adsorção em membrana eletronegativa e subsequente eluição, conforme descrito por Katayama et al. (2002). Para esta análise, a água coletada do tanque de depuração foi filtrada com o uso de uma bomba de vácuo equipada com uma membrana tipo AP20 e em seguida filtrada em membrana tipo HA 0,45µm, carregadas negativamente (Millipore Corporation, Bedford, MA, E.U.A.). A membrana foi então lavada com 350 ml de H₂SO₄ (0,05M, pH 3,0) para remover cátions e os vírus adsorvidos foram eluídos da membrana com 10 ml de NaOH (0,1M, pH 10,8). A membrana foi colocada em um tubo contendo 50 ml de H₂SO₄ (0,05M, pH 1,0) e 50 ml de tampão TE 100X, pH 8,0 foi adicionado para a neutralização. O filtrado foi então concentrado pelo sistema *Centriprep* (Millipore) através de centrifugação a 3,500 xg, durante 2 min, resultando em um volume final de 2,0 ml. A partir de 400µl foi realizada a extração de ácidos nucleicos e a detecção da PCR qualitativo, conforme item 1.3.9.1.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Otimização do método de concentração viral a partir de amostras de ostras

Tendo por objetivo, aumentar a sensibilidade de recuperação viral a partir de carne de ostras artificialmente sementeas com vírus entéricos, foram realizados testes de concentração e purificação viral a partir dos

tecidos das ostras. O melhor método foi o composto por eluição viral em caldo triptose fosfato (TPB-Sigma®) em glicina pH 9,0, clarificação com clorofórmio:butanol e precipitação com polietilenoglicol 6.000, seguido de duas clarificações com clorofórmio. Nesta fase dos ensaios, a qualidade dos reagentes utilizados mostrou-se essencial para a obtenção de bons resultados. Os experimentos foram iniciados utilizando-se TPB de um fabricante e todos os resultados foram negativos. Quando houve a mudança para a nova marca (Sigma®), obtiveram-se resultados satisfatórios.

Quando as ostras foram semeadas com concentrações decrescentes de cada um dos três vírus, o limite de detecção na carne das ostras foi de 4 FFU para HAV por nested-PCR; 0,01 FFU de HAdV5 por nested-PCR e $5,0 \times 10^3$ FFU de RV por RT-PCR (Figura 1.3 A, B e C), por grama de tecido digestivo de ostras.

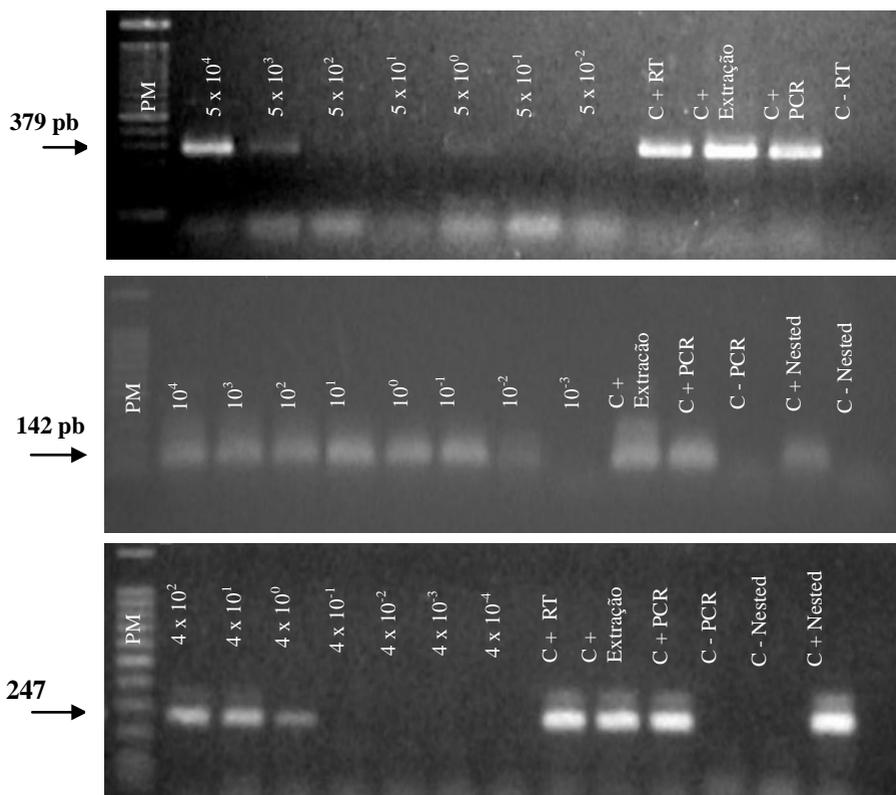


Figura 1.3: Eletroforese em Gel de Agarose 1,5% de produtos de PCR e nested-PCR referentes aos limites de detecção de RV (A), HAdV5 (B) e HAV (C) em tecido digestivo de ostras experimentalmente inoculadas. PM: Peso Molecular 100pb

1.4.2 Estabelecimento das condições de bioacumulação viral

Inicialmente foi avaliada a necessidade do uso de microalgas como estratégia para estimular o processo de filtração pelas ostras. Como resultado foi observado que não houve diferença na detecção de Rotavírus adsorvidos previamente em microalgas e não adsorvidos. Portanto, optou-se pelo não uso de microalgas.

Posteriormente, foram realizados ensaios de bioacumulação, avaliando-se diferentes tempos de exposição das ostras à água do mar contaminada com os vírus (30, 60, 90, 120 e 180 min). O período de 180 min foi o que apresentou melhor detecção viral e, portanto, foi o selecionado para utilização em ensaios de depuração. A Figura 1.4 representa a detecção de RV SA11 em ostras submetidas aos diferentes períodos de bioacumulação.

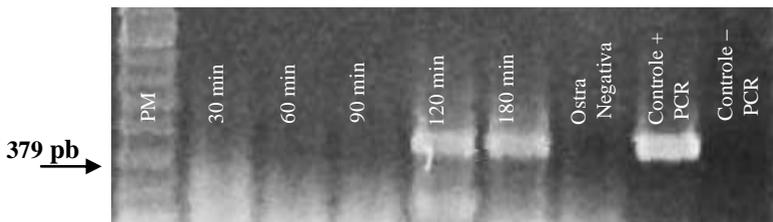


Figura 1.4: Bioacumulação de RV SA11 por ostras em diferentes tempos de exposição a água do mar semeada com 3×10^3 FFU/ml sem emprego de microalgas para adsorção viral. PM: Peso Molecular 100pb

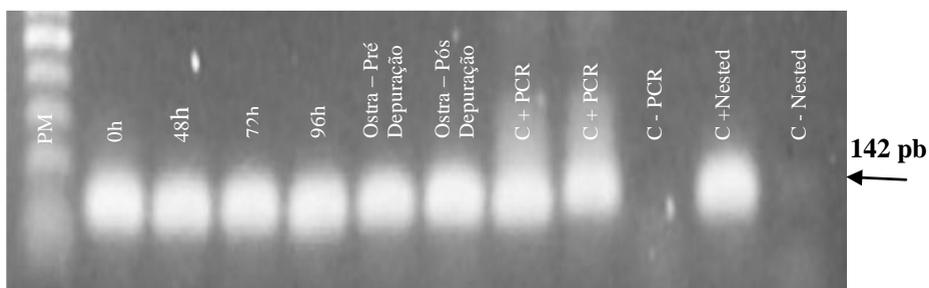
1.4.3 Ensaios de depuração viral por ostras *C. gigas*

Os ensaios de depuração envolvendo RV SA11 não foram satisfatórios, pois não apresentaram homogeneidade e reprodutibilidade. Portanto, estes resultados não foram apresentados nesta tese, e desta forma os estudos de depuração viral tiveram prosseguimento com a utilização de HAdV5 e HAV.

1.4.3.1 Detecção molecular de HAV e HAdV5

A detecção molecular por PCR de ambos os vírus (Figura 1.5) mostrou que durante o processo de depuração, a presença do genoma de HAdV5 foi detectada em todos os tempos amostrais (0h, 48h, 72h e 96h), e a presença do genoma de HAV foi detectada até o período de 72h. A Tabela 1.1 indica o resultado para a detecção molecular em todas as repetições realizadas. As amostras utilizadas como controle negativo apresentaram resultado negativo para HAV, no entanto, a detecção de HAdV5 foi positiva pois as mesmas já apresentavam contaminação com este vírus proveniente do local de cultivo.

A



B



Figura 1.5: Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de produtos de nested PCR referentes à depuração em sistema fechado. A: Adenovirus; B: vírus da Hepatite A; PM: marcador de peso molecular 100pb

AVALIAÇÃO DA INFECCIOSIDADE DE HAV E HADV EM CULTURA CELULAR

1.4.3.2 Análise da Infecciosidade Viral em Amostras de Ostras

Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade dos extratos de ostras utilizando-se a técnica de adsorção dos extratos teciduais das ostras em diferentes diluições com a monocamada celular, sendo que a avaliação da integridade das células após distintos tempos de incubação foi feita por coloração com Preto de Naftaleno.

Para as células MA104 (RV SA11) e A549 (HAdV), o extrato de ostras não diluído não apresentou toxicidade; para as células FrhK-4 (HAV) o extrato de ostras apresentou toxicidade somente quando não diluído; para as células Hep-2 (HAdV), a extrato de ostras apresentou-se tóxico até a diluição 1:4. Devido à variação natural da composição das amostras de ostras (concentração de glicogênio, lipídeos...), optou-se por utilizar a diluição 1:4 para os ensaios de ICC-PCR com células MA104, A549 e FrhK-4; e a diluição 1:8 para células Hep-2.

Na avaliação da infecciosidade por ICC-PCR, dos extratos teciduais de ostras depuradas, foi observado que houve uma inativação viral ao longo das 96h de recirculação da água do mar e de contato com a radiação U.V. (Figura 1.6). Para o HAdV5 foi observado que em 96h de depuração a inativação viral foi alcançada. Para HAV, foram necessárias pelo menos 72h para a inativação destes vírus. A Tabela 1.1 indica o resultado para a avaliação de viabilidade viral por ICC-PCR em todas as repetições realizadas.

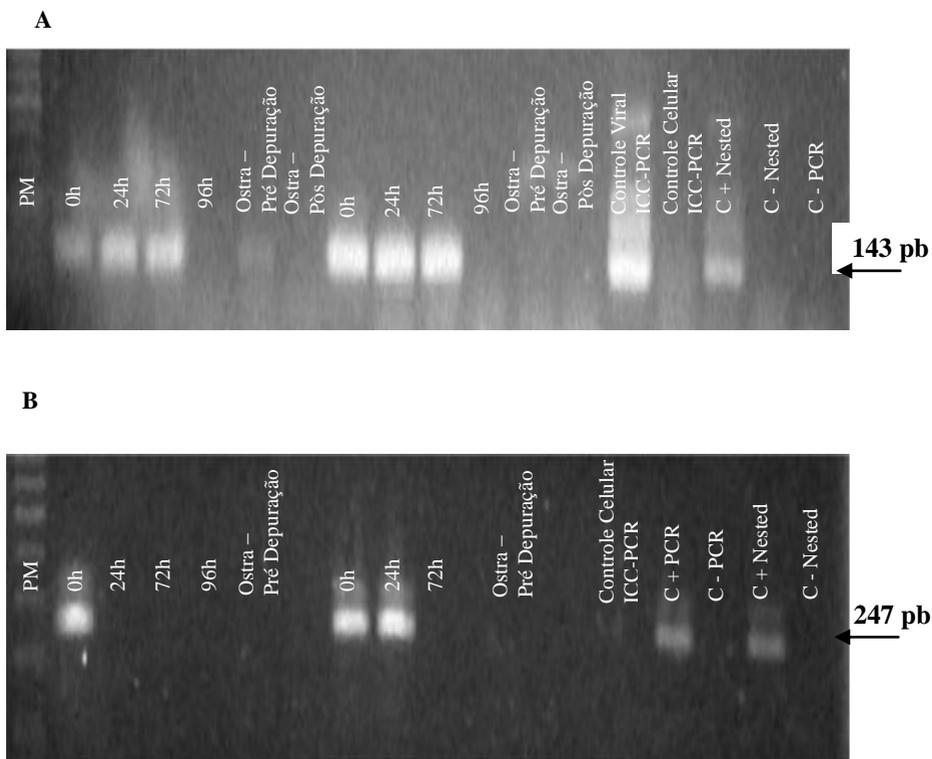


Figura 1.6: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de nested PCR referentes à avaliação da viabilidade viral por ICC-PCR de duas repetições dos diferentes períodos de depuração em sistema fechado. **A**: Adenovirus; **B**: vírus da Hepatite A; **PM**: marcador de peso molecular 100pb, 17: C + Nested PCR, 18: C – Nested PCR.

A técnica de IFA foi também utilizada para confirmar-se a inativação dos HAdV5 humanos (os mais resistentes aos processos de desinfecção), considerando também que estes foram os vírus mais persistentes no processo de depuração. Como resultado destas análises (Figura 1.7) foi observado a confirmação dos resultados obtidos por ICC-PCR. A viabilidade viral foi detectada até o período de 72h de depuração.

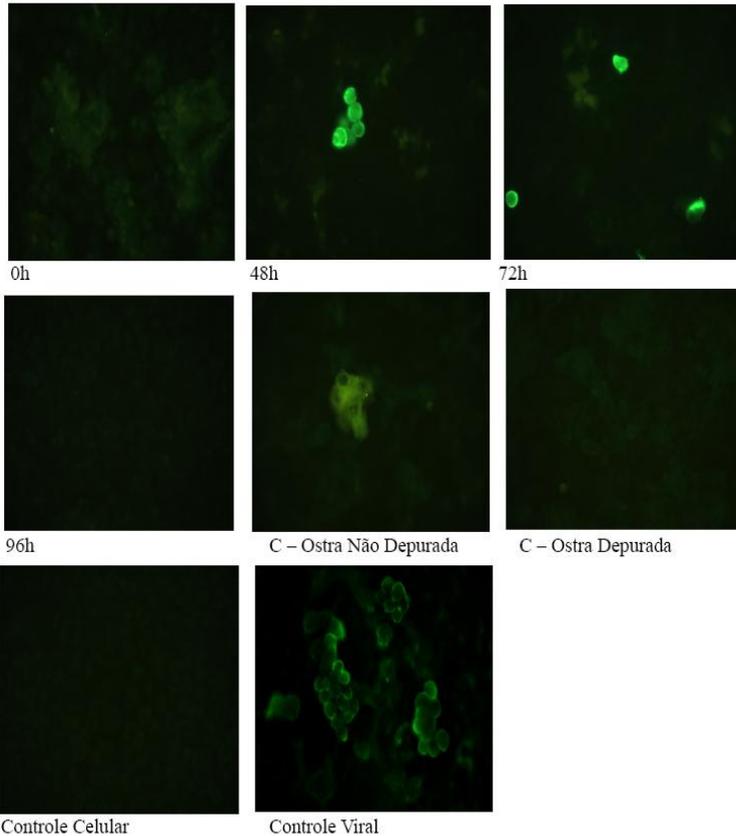


Figura 1.7: IFA para HAdV5, em células A549, em extratos de ostras submetidas ao processo de depuração em sistema fechado.

1.4.3.3 Quantificação dos genomas de HAdV5 nos diferentes tecidos de ostras após bioacumulação e depuração

Na análise dos diferentes tecidos de ostras (hepatopâncreas, brânquias, palpos labiais, hemolinfa e manto) por qPCR para a quantificação de cópias genômicas de HAdV5, foi possível observar a pequena redução comparando valores iniciais (tempo 0h) e finais (tempo 96h). A Figura 1.8 apresenta os gráficos referentes a cada um dos tecidos analisados, em valores absolutos (CG/g).

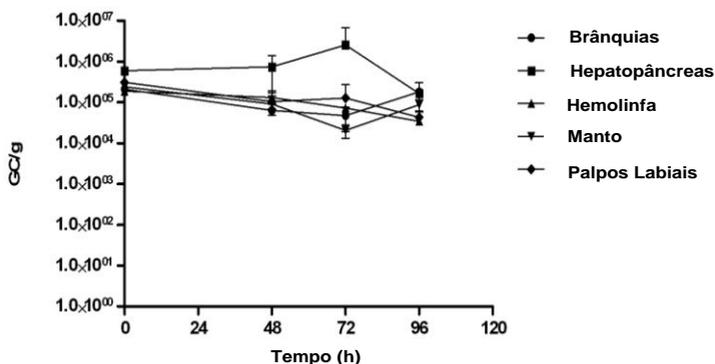


Figura 1.8: Redução do número de cópias do genoma de HAdV5 nos diferentes tecidos de ostras após o processo de depuração em diferentes tempos (0h, 48h, 72h e 96h). Cada ponto do gráfico é a representação da média de três experimentos independentes analisados por qPCR, \pm desvio padrão; CG: Cópias Genômicas.

1.4.3.4 Desinfecção viral da água do mar utilizada durante os ensaios de depuração

Em paralelo às análises de contaminação viral nas ostras depuradas, foram analisadas amostras de 2l de água após 96h de período de depuração. A Tabela 1.1 apresenta os resultados obtidos através de RT-PCR e nested-PCR das amostras da água da depuradora. Foi possível verificar para HAdV que apenas após o período de 96h, houve inativação viral em uma das repetições, o que sugere que a água após esse período, poderia ser eliminada sem que houvesse prejuízos ao meio ambiente. Não houve detecção de HAV e RV em nenhuma amostra de água, sugerindo que o tratamento com radiação U.V. foi eficaz na degradação do genoma desses vírus.

Tabela 1.1: Detecção de HAdV5 e HAV em hepatopâncreas de ostras e em amostras de água do mar após processo de depuração em sistema fechado, com desinfecção por U.V. Os resultados obtidos foram obtidos em três experimentos independentes (n=3) avaliados por PCR qualitativo, ICC-PCR e IFA. NA: Não Analisado.

Tempos	PCR HAV	ICC-PCR HAV	PCR HAdV5	ICC-PCR HAdV5	IFA HAdV5
Ostras					
0h	3	3	3	3	3
48h	3	2	3	3	3
72h	1	0	3	3	3
96h	0	0	3	0	0
Água do Mar					
96h	0	0	1	NA	NA

1.5 DISCUSSÃO

A legislação brasileira não regulamenta sistemas de depuração, e apenas a presença de bactérias, como coliformes fecais e de *Salmonella* sp. nas águas de cultivo e carne de molusco são atualmente regulamentadas (ANVISA, 2001; CONAMA, 2005).

O presente trabalho apresenta as primeiras informações, no Brasil, sobre a dinâmica de eliminação de patógenos virais por ostras de cultivo utilizando um sistema fechado de depuração com água do mar filtrada e desinfetada por um sistema utilizando-se radiação U.V. A depuradora avaliada funciona em sistema de recirculação de água, no qual foi possível a circulação completa do volume de água do tanque, duas vezes a cada hora. Esta taxa de recirculação está dentro dos parâmetros internacionais para um sistema deste porte (CEFAS, UK, 1998; NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM, USA, 2003; CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY, CANADÁ, 2003; FAO, 2008). A recirculação de água tem como vantagens a facilidade de operação do sistema, a possibilidade do uso desses sistemas de depuração em locais distantes de uma fonte de água do mar (restaurantes, por exemplo) e a economia no volume de água utilizado.

Anteriormente a este estudo, foi demonstrado que este mesmo sistema de depuração foi eficaz na inativação de *Salmonella* Typhimurium em ostras contaminadas artificialmente, utilizando-se água do mar tratada simultaneamente por radiação U.V. e cloro livre, por um período mínimo de 12h (CORRÊA et al., 2007). A depuração é efetiva para remover muitas bactérias fecais, sendo que não há dados efetivos sobre a eficiência de sistemas de depuração na eliminação de bactérias do gênero *Vibrio* (*Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*), biotoxinas marinhas (causadoras de diarreias e paralisias), metais pesados ou compostos orgânicos (FAO, 2008). A combinação de cloro livre e radiação U.V. aumentaram a eficiência da desinfecção, diminuindo o tempo necessário para completar o processo de depuração. A aplicação simultânea destes dois métodos de desinfecção gerou um efeito sinérgico, pois cada um causa um dano diferente aos microrganismos (KOIVUNEN; HEINONEN-TANSKI, 2004).

O uso de cloro nos tanques de depuração é o processo mais antigo de desinfecção, mas a sua eficácia durante este processo pode causar certa toxicidade para os moluscos. De acordo com Rodrick e Schneider (2003), o uso de cloro mesmo em baixa concentração (< 1ppm) pode prejudicar o processo de filtração dos moluscos, dificultando a eficiência da depuração.

A radiação U.V. tem sido amplamente utilizada para o

tratamento de águas subterrâneas e águas residuais, e sua eficiência já foi avaliada contra vários patógenos virais, como o HAV, HuNoV e HAdV (HIJNEN et al., 2006; UEKI ET al., 2007; HERNROTH; ALLARD, 2007; SAVINI et al., 2009). A aplicação da U.V. em sistemas de depuração é reconhecidamente eficiente (DORÉ, 2001; CARETTI; LUBELLO, 2003). De acordo com Koivunem e Heinonem-Tanski (2005), este tipo de tratamento elimina bactérias entéricas, vírus, esporos bacterianos e protozoários na água, sem a produção de produtos tóxicos ou outros resíduos químicos. Por estas razões, foi selecionado o tratamento da água por radiação U.V. no sistema de depuração analisado neste trabalho.

Sendo assim, no presente estudo, avaliou-se a dinâmica de depuração de ostras artificialmente contaminadas por distintos patógenos virais. Os experimentos foram realizados no mesmo sistema comercial de depuração, anteriormente testado para eliminação de *S. Tiphymurium*, por um período máximo de 96h, com água do mar sob tratamento por radiação U.V. Os resultados mostraram que a presença do genoma de HAdV5 e HAV ainda foi detectada por PCR qualitativo em 96h e 72h, respectivamente, sendo que HAdV5 apresentou-se mais resistente após o tratamento com U.V., mantendo-se infeccioso até 72h de recirculação da água no sistema de depuração, ao passo que HAV foi inativado após 72h de tratamento (Figuras 1.5 e 1.6). Há evidências que diferentes vírus podem apresentar diferentes taxas de eliminação pelos moluscos bivalves (LEES, 2003; RICHARDS et al., 2010). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com estas informações, considerando que houve uma eliminação mais rápida de HAV, em relação ao tempo necessário para a eliminação de HAdV5.

Quando vírus entéricos viáveis são isolados de moluscos, eles mantêm a sua capacidade de infectar células permissivas *in vitro* (RIGOTTO et al., 2005). Essa capacidade pode ser uma ferramenta útil para o estudo de viabilidade viral em amostras ambientais. Os métodos de cultura celular são mais trabalhosos, mas associados com os métodos moleculares permitem uma avaliação completa da eliminação viral.

O uso exclusivo de técnicas moleculares para avaliar a presença viral em moluscos bivalves tem sido o método de escolha de muitos pesquisadores que trabalham esta área (RIGOTTO et al., 2005; SINCERO et al., 2006; UEKI et al., 2007, SUFFREDINI et al., 2008). No entanto, estes métodos apresentam algumas limitações, porque a detecção do genoma não prevê o risco real de contaminação. Muitos estudos de depuração de moluscos bivalves também relataram o uso somente de métodos moleculares para avaliar a dinâmica de depuração

(FORMIGA-CRUZ et al., 2003; UEKI et al., 2007; NAPPIER et al., 2008; MACLEOD et al., 2009), mas apenas alguns deles mencionam o emprego de cultura de células como forma de avaliar a infecciosidade viral (CHOO; KIM, 2006; HERNROTH; ALLARD, 2007). De acordo com os resultados apresentados nas Figuras 1.5, 1.6 e 1.7, o tratamento com U.V. foi eficiente para a inativação viral, já que foram utilizados métodos que permitiram acessar a viabilidade viral, tais como o ICC-PCR e a Imunofluorescência Indireta.

Neste estudo, o genoma HAdV5 foi detectado em todas as amostras de ostras por PCR e qPCR, ao longo de 96h de ensaio. Por outro lado, quando os resultados de ICC-PCR e IFA foram levados em consideração, a detecção viral foi observada somente até 48h, para HAV, e 72h para HAdV5. A detecção do genoma viral com a aplicação de PCR e qPCR ocorreu, ou porque o genoma inativado pela radiação U.V., foi re-ingerido pelas ostras, ao longo do período de 96h, ou ainda porque os vírus, mesmo inativados pela radiação U.V., permaneceram adsorvidos aos tecidos dos moluscos tendo seu genoma sido amplificado nas reações. De acordo com os resultados expostos na Figura 1.8, no caso dos HAdV5 notou-se a presença do genoma viral em diferentes tecidos das ostras, com maior concentração no tecido digestivo (hepatopâncreas).

Tem sido sugerido que vírus de genoma DNA dupla fita são menos suscetíveis à inativação por raios U.V., devido ao fato que se uma das fitas for danificada pela radiação, a outra fita ainda pode ser utilizada como molde para a replicação viral (ENRIQUEZ-THURSTON et al., 2003). Independentemente do dano ao genoma, análises moleculares, ainda podem amplificar DNAs parcialmente degradados, resultando em resultados falso-positivos. Os genomas de HAdV, entretanto, são relatados como sendo os mais resistentes à radiação U.V. do que os outros vírus de DNA ou RNA de dupla fita (MENA; GERBA, 2009). Isto provavelmente também está relacionado com as características estruturais destes vírus que são mais resistentes à degradação.

A desinfecção de águas por tratamento com U.V. ou com cloro reduzem o número de partículas virais quantificadas por qPCR e qRT-PCR se tratamentos severos forem aplicados. No entanto, os tratamentos comumente utilizados para desinfecção de águas, produzem uma redução significativa no número de partículas virais infecciosas sem apresentar variações equivalentes no nível de genomas virais quantificados por qPCR ou qRT-PCR (GIRONÉS et al., 2010). Desta forma, a associação de métodos moleculares à avaliação da

infeciosidade viral de HAV e HAdV5, permitiu uma análise mais completa e real da dinâmica de eliminação destes dois patógenos virais no processo de depuração.

Estudos tem repetidamente demonstrado que moluscos bivalves eliminam vírus de seus tecidos mais lentamente quando comparado à eliminação da maioria das bactérias, e que a temperatura da água nestes sistemas pode influenciar neste processo (RICHARDS, 2003). Neste trabalho, a temperatura de 18-20°C foi selecionada, devido a experimentos anteriores no Laboratório de Virologia Aplicada, da UFSC, que demonstraram que estas temperaturas evitam um estresse fisiológico nos moluscos, permitindo que a depuração transcorra de forma adequada. Isto porque as ostras da espécie *Crassostrea gigas* são adaptadas a águas mais frias (até 20°C) e, em temperaturas mais elevadas as mesmas entram em estresse, desovam e apresentam ainda altas taxas de mortalidade.

A maioria dos países que produzem moluscos bivalves para exportação tem normas rigorosas de controle de sistemas de depuração e procedimentos operacionais para garantir o controle da qualidade do processo de purificação. O monitoramento da temperatura da água durante o ciclo de purificação também é recomendado (EUROPEAN COMMUNITIES, 1992). Pesquisas realizadas com ostras *C.gigas* (LEE et al., 2003) demonstraram que em temperaturas de 18 a 21 °C, enterovírus são removidos mais rapidamente dos moluscos; enquanto a maior parte dos vírus presentes pôde ser removida após 4 dias nessas temperaturas, uma contaminação viral residual permaneceu mesmo quando moluscos moderadamente contaminados foram submetidos à depuração. Assim, a depuração é um processo especialmente indicado para moluscos com baixos níveis de contaminação, e não deve ser utilizada para produtos altamente contaminados (FAO, 2008). Uma redução de 4-logs na concentração viral é considerada uma desinfecção eficiente, pois representa a remoção de 99,99% da concentração presente inicialmente (EPA, 2003). Desta forma, moluscos com uma alta contaminação (por exemplo, 10^7 partículas virais/g de carne), com uma redução de 4-logs após serem submetidos à depuração, seguiriam com uma contaminação viral ainda considerada elevada.

Pesquisas pioneiras em relação à bioacumulação e depuração viral foram concentradas ao estudo de Poliovírus (PV) (LIU et al., 1967; SERAICHEKAS et al., 1968; DI GIROLAMO et al., 1975; METCALF et al., 1979). Estudos mostraram que moderados níveis de PV são depurados dentro de 3 dias por ostras da espécie *Crassostrea virginica* (SOBSEY et al., 1987; POWER; COLLINS, 1989) e por *C. gigas*

(HOFF, BECKER, 1969).

No entanto, tem sido demonstrado que HAV pode permanecer infeccioso em ostras por um período de até 3 semanas, e pode ser detectado por métodos moleculares até 6 semanas (KINGSLEY; RICHARDS, 2003), indicando que a prática de transposição, utilizada muitas vezes no lugar de depuração, deve ser realizada por períodos mais longos para eliminar HAV. Em contraste, ostras submetidas à depuração por 96h, apresentaram uma redução de 98% e de 97% na infecciosidade de HAV e RV, respectivamente (ABAD et al., 1997). Isto indica que a depuração de moluscos é um método mais efetivo na eliminação de vírus infecciosos, devido ao uso dos tratamentos da água utilizada neste processo.

O sistema de purificação projetado por *Blue Water Aquaculture* (Florianópolis, SC, Brasil) foi eficaz para a purificação de ostras contaminadas artificialmente por HAdV5 e HAV. O tratamento de irradiação U.V. foi eficiente para eliminar a contaminação viral após 96 h, conforme determinado pelo ICC-PCR e IFA. Com estes resultados, foi possível observar uma eliminação diferencial de HAdV5 e HAV em ostras, em relação ao tempo de purificação. Este trabalho confirmou que HAdV é um patógeno especialmente resistente aos raios U.V. viral e exigiu mais tempo para sua inativação.

1.6 CONCLUSÕES

- A etapa inicial de padronização de técnicas levou à otimização das condições para os ensaios de depuração viral, tais como: qualidade dos reagentes utilizados para a eluição viral, clarificação final das amostras teciduais com clorofórmio, necessidade de diluição das amostras para evitar a citotoxicidade nos ensaios de viabilidade viral, sensibilidade das técnicas de detecção molecular, bem como a seleção do período de 3h para a bioacumulação viral, sem o uso de microalgas;
- De acordo com a cinética de depuração viral, foi possível observar que há uma eliminação diferencial de HAdV5 em relação a eliminação de HAV, sendo que a presença do genoma de HAdV5 foi detectada ao longo de todos os tempos amostrais, indicando uma estabilidade maior quando comparado ao genoma de HAV;
- A detecção do genoma de HAdV5 com a aplicação de PCR e qPCR em todos os tempos analisados pode ter ocorrido porque o genoma inativado pela radiação U.V., foi re-ingerido pelas ostras, ao longo do período de 96h ou o vírus, mesmo inativado, permaneceu adsorvido aos tecidos das ostras;

- Os resultados obtidos nos ensaios de depuração mostraram diferenças na inativação de HAdV5 e HAV, durante o tempo de recirculação e tratamento da água do mar com U.V.;
- O sistema de depuração avaliado foi efetivo para a purificação de ostras artificialmente contaminadas com HAV e HAdV5, e o tratamento com U.V. foi efetivo para eliminar a contaminação viral em 72h;
- Houve a confirmação de que HAdV5 é particularmente um patógeno viral resistente á radiação U.V., necessitando tempos mais longos para sua inativação.

REFERÊNCIAS CAPÍTULO 1

ABAD, F.X.; PINTÓ, R.M.; GAJARDO, R.; BOSCH, A. Viruses in mussels: public health implications and depuration. **J. food Protect.**, v. 60, n. 6, p. 677-681, 1997.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>, Brasília, DF.

BARARDI, C. R. M.; YIP, H.; EMSLIE, K. R.; VESEY, G. SHANKER, S.R.; WILLIAMS, K. L. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 49, p. 9-18, 1998.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIN-VAN DILLEN, P.M.E.; NOORDA, A. J. Rapid simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microb.**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BRASIL, Decreto n. 5.564, de 19 de Outubro de 2005. Institui o Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves. Diário Oficial da União, n. 202, p. 2, 20 de Outubro de 2005.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. Capítulo 10, Policy and Procedures for Controlled Relaying and Depuration, 2003. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/english/anim/fispoi/manman/csspp.ccsmtoc/dme.shtml>>. Acesso em 09 de novembro de 2009.

CARETTI, C.; LUBELLO, C. Wastewater disinfection with PAA and U.V. combined treatment: a pilot plant study. **Water Res.**, v. 37, p. 2365-2371, 2003.

CENTER FOR ENVIRONMENTAL, FISHERIES AND AQUACULTURE SCIENCE. Guidance for Inspection of Shellfish Purification Systems for Food Authorities, 1998. Disponível em: <<http://www.nrlcefas.org/>> /GuidanceforinspectionofshellfishpurificationsystemsforFoodAuthorities.PDF. Acesso em 12 de agosto de 2004.

CORREA AA; 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. **Mar. Environ. Res**, v. 63, n. 5, p. 479-489, 2007.

DI GIROLAMO, R.; LISTON, J.; Uptake and elimination of poliovirus by West Coast oysters. **J. Appl Microbiol.**, v. 29, n. 2, p.260-264, 1975.

DORÉ, W.J. Re-Inspection of Shellfish Purification Centres. In: Centre for Environmental, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), **Shellfish News**, n. 12, p. 19-21, 2001.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). Produção de Moluscos, 2009. Disponível em: <<http://www.epagri.rct-sc.br/epagri/index.jsp>>, Florianópolis, SC. Acesso em 5 de agosto de 2010.

EUROPEAN COMMUNITIES, 1991. Council Directive of 15th of July 1991 laying down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalve mollusks (91/492/EEC). Official Journal of European Communities, v. 268, p. 1-14.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008, Fisheries Technical Paper. Available on: <http://www.fao.org/icatalog/search/result.asp?subcat_id=36>, accessed at October 28, 2009.

GIRONES, R.; FERRÚS, M.A.; ALONSO, J.L.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CORRÊA, A.A.; HUNDESA, A.; CARRATALA, A.; BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water-the pros and cons of molecular techniques. **Water Res**, v. 44, n.15, p.4325-4339, 2010.

HERNROTH, B.; ALLARD, A. The persistence of infectious adenovirus (type 35) in mussels (*Mytilus edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*). **Int J Food Microbiol**, v. 13, n. 3, p. 296-302, 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. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 9, p. 4523-4533, 2002.

HIJNEN, W.A.M.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of U.V. radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. **Water Res**, v. 40, n.1, 3-22, 2006.

HOFF, J.C.; BECKER, R.C. The accumulation and elimination of crude and clarified poliovirus suspensions by shellfish, **Am J Epidemiol**, v. 90, n. 1, p. 53-61, 1969.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; WONG, C.; BLOME, S.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J Virol**. V. 76, n. 13, p. 6596-6601, 2002.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, O. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p.1033–1039, 2002.

KINGSLEY, D. H.; MEADE, G. H.; RICHARDS, G.P. Detection of both hepatitis A virus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food borne illness. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 8; p. 3914-3918, 2003

KOIVUNEN, J.; HEINONEN-TANSKI, H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, U.V. irradiation and combined chemical/U.V. treatments. **Water Res**, v. 39, p.1519–1526, 2004.

LEE, C.Y.; PANICKER G.; BEJ, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink™ NH microwell plate sandwich hybridization. **J of Microb Met.** v. 53, p.199-209, 2003.

LEES, D. Viruses in bivalve shellfish. **Int J Food Microbiol**; v. 59, p.81-116, 2000.

LIU, O.C.; SERAICHEKAS, H.R.; MURPHY, B.L. Viral depuration of the Northern quahaug. **Appl Microbiol.**, v. 15, n. 2, p. 307-315, 1967.

LUBELLO, C.; CARETTI, C.; GORI, R. Comparison between PAA/U.V. and H₂O₂/U.V. disinfection for wastewater reuse. **Water Sci. Technol: Water Supply**, v. 2, n. 1, p. 205-212, 2002.

MARINO, A.; LOMBARDO, L.; FIORENTINO, C. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-01 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Int J Food Microb**, v. 99, p. 281-286, 2005.

MENA, K.D.; GERB, C.P. Waterborne Adenovirus. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 198, p. 133-167, 2009.

METCALF, T.G. Indication of viruses in shellfish growing waters. **Am J Public Health**, v. 69, n. 11, p. 1093-1094, 1979.

MURPHREE, R. L., TAMPLIN, M. L. Uptake and Retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. **Appl Environ Microbiol**, v. 61, n. 10, p. 3656-3660., 1991.

NATIONAL SHELLFISH SANITATION PROGRAM. Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ear/nss2-1.html>>. Acesso em 11/11/2005.

POWER, U.F.; COLLINS, J.K. Differential Depuration of Poliovirus, *Escherichia coli*, and Coliphage by the Common Mussel, *Mytilus edulis*. **Appl Environ Microbiol**, v. 55, n. 6, p. 1386-1390, 1989.

PUIG, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; ALLARD, A.; WADELL, G.; GIRONES, R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, n. 8, p. 2963-2970, 1994.

RICHARDS, G.P.; MCLEOD, C.; LE GUYADER, S. F. Processing Strategies to Inactivate Enteric Viruses in Shellfish. **Food Environ Virol**, v. 2, p.183-193, 2010.

RICHARDS, G.P.; Microbial Purification of Shellfish: a review of depurations and relaying. **J of Food Protec**, v. 51, p.218-251, 1988.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, C.K.; CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.S.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental samples in Florianopolis, South Brazil. **J Appl Microbiol**, 2010.

RIGOTTO, C.; SINCERO, T. C.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional PCR, nested-PCR and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Res**, v.39, n. 2-3, p. 297-304, 2005.

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

SAVINI, G.; CASACCIA, C.; BARILE, N.B.; PAOLETTI, M.; PINONI, C. Norovirus in bivalve molluscs: a study of the efficacy of the depuration system. **Vet Ital**, v. 45, n. 4, p. 535-539, 2009.

SINCERO, T.C.M; LEVIN, D. B.; SIMÕES, C. M.O.; BARARDI, C. R. M. Detection of Hepatitis A virus (HVA) in Oysters (*Crassostrea gigas*). **Water Res**, v. 40, n.5, p.895-902, 2006.

SOBSEY, M. D.; DAVIS, A. L.; RULLMAN, V. A. Persistence of hepatitis A virus and other viruses in depurated Eastern oysters. **Proceedings Oceans**, v. 87, n. 5, p. 1740–1745, 1987.

SUFFREDINI, E.; CORRAIN, C.; ARCANGELI, G.; FASOLATO, L.; MANFRIN, A.; ROSSETTI, E.; BIAZZI, E.; MIONI, R.; PAVONI, E.; LOSIO, M.N.; SANAVIO, G.; CROCI, L. Occurrence of enteric viruses in shellfish and relation to climatic-environmental factors. **Lett Appl Microbiol**, v. 47, n. 5, p. 467-468, 2008.

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; HAAS, C.N.; JACANGELO, J.; GERBA, C.P. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 3979-3985, 2003.

UEKI, Y.; SHOJI, M.; SUTO, A.; TANABE, T.; OKIMURA, Y.; KIKUCHI, Y.; SAITO, N.; SANO, D.; OMURA, T. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 17, p. 5698-5701, 2007.

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; DE ABREU CORRÊA, A.; KOLESNIKOVAS, C.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P.; BARARDI, C.R. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil.. **J Appl Microbiol**, v. 109, p. 231-238.

CAPÍTULO 2

Estudo da Desinfecção de Norovírus Murino, Adenovírus Humano e Poliomavírus Humano em água do mar natural e artificial tratadas com cloro livre

-Trabalho desenvolvido no Laboratório de Vírus Contaminantes de Águas e Alimentos, do Departamento de Microbiologia, da Universidade de Barcelona, durante a realização do estágio de doutorado no exterior (Bolsa CAPES/PDEE) de janeiro a dezembro de 2009 -

2.1 JUSTIFICATIVA

A cloração é o método predominante de desinfecção devido ao seu baixo custo, facilidade de aplicação e capacidade de inativar uma grande variedade de microorganismos patogênicos (DEBORDE; GUNTEN, 2008). Devido a esta capacidade o cloro livre, (e também dióxido de cloro e cloraminas) é comumente usado em processos de tratamento de água (BRUCHET; DUGUET, 2004). No entanto, em certas circunstâncias, pode induzir a formação de subprodutos potencialmente prejudiciais (Trihalometanos e Ácidos Haloacéticos), devido à sua reatividade com os componentes da água ou poluentes (RICHARDSON, 2005; KRASNER et al., 2006).

A desinfecção da água geralmente envolve o uso de cloro em um ou dois pontos (s) no processo de tratamento, ou seja, para um pré-tratamento (para induzir a uma desinfecção no início do processo) e pós-tratamento (para manter uma atividade desinfectante residual no sistema de distribuição (DEBORDE; GUNTEN, 2008). Devido a sua atividade dependente do pH, várias espécies de cloro (HOCl, ClO, Cl₂, etc) podem estar presentes em solução. Estas formas de cloro apresentam diferenças significativas em sua reatividade com os microorganismos e micropoluentes. Portanto, a variabilidade da eficiência na oxidação ou desinfecção podem ser observados, dependendo do pH da água (KRASNER et al., 2006).

A capacidade de cloro para destruir microorganismos é resultado da interferência no funcionamento químico do organismo. Especificamente, é a reação química entre HOCl e estrutura celulares que inativa os processos vitais necessários. A alta eficiência germicida de HOCl é atribuída a sua facilidade de penetrar em membranas celulares e reagir com sistemas enzimáticos, e pela interação com as proteínas do capsídeo ou ácido nucléico de patógenos virais (CHEREMISINOFF, 2002).

Há poucos estudos sobre o tratamento de água do mar com uso de Cloro (DUURSMA; PARSI, 1976; HAAG, 1981; WONG; OATTS, 1984; DIN et al., 2000), e em muitos deles está claro que quando o cloro é adicionado na água do mar, a concentração inicial diminui ao longo do tempo em duas fases. Na primeira fase, a concentração diminui rapidamente; esta fase é seguida de uma diminuição muito mais lenta, mas constante na perda da concentração ao longo do tempo (DIN et al., 2000). A taxa de dissipação de cloro é afetada pela temperatura, presença de radiação e concentração de brometos. Uma fração significante da demanda de cloro, principalmente na primeira fase, é

causada pela reação entre o cloro adicionado e compostos orgânicos naturalmente encontrados na água do mar.

O pH da água e concentração de sais dissolvidos na água do mar influencia no potencial de desinfecção do cloro. Considerando o pH 8.0 da água do mar, a adição de cloro pode resultar na presença de HOCl, OCl⁻, HOBr e OBr⁻ e irá atuar criando um ambiente hostil para os organismos vivos (KRASNER et al., 2006). Níveis aumentados da concentração de sais, como KCl e NaCl melhoram a ação do cloro livre no tratamento de água do mar (BERG et al., 1990; SHARP et al., 1980).

O cloro foi um dos primeiros métodos utilizados para a desinfecção da água do mar para a depuração de moluscos bivalves (RODRICK; SCHNEIDER, 2003). Quando utilizado com água do mar de baixa a moderada concentração de matéria orgânica, é um eficaz bactericida, mas não há evidências sobre sua eficácia contra diferentes patógenos virais (FAO, 2008).

A adição de cloro em sistemas de depuração de moluscos é geralmente realizada através da utilização de uma solução de hipoclorito de sódio. Para efeitos de depuração, 2-3 mg/l de cloro livre é normalmente utilizado por um tempo de contato, com a água do mar, de no máximo 1h. Antes de usá-lo é necessário reduzir o cloro livre na água (com a adição de Tiosulfato de Sódio) a menos de 0,1 mg/l, caso contrário, elevados níveis de cloro na água podem interferir nas atividades fisiológicas dos moluscos (BLOGOSLAWSKI, 1991; BOYD, 1996; RODRICK; SCHNEIDER, 2003), e também alterar o sabor, reduzindo o valor comercial destes produtos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a cinética de desinfecção de Adenovírus Humano tipo 2 (HAdV2), Norovírus Murino tipo 1 (MNV-1) e Poliomavírus Humano JC (JCPyV) em água do mar natural e artificial tratadas com cloro, através do uso de técnicas moleculares e de cultivo celular, para sua futura utilização em depuradoras de moluscos bivalves.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer os parâmetros ótimos para a realização dos experimentos de estabilidade de HAdV2, MNV-1 e JCPyV em água do mar tratada com cloro, através da avaliação de diferentes condições experimentais;

- Desenvolver um ensaio de qRT-PCR para a quantificação de genomas de MNV-1;
- Estabelecer um método de cultura celular para a avaliação de MNV-1 infecciosos;
- Otimizar técnicas, previamente estabelecidas, para a avaliação da desinfecção de HAdV2 e JCPyV (métodos moleculares e de cultivo celular);
- Aplicar as condições experimentais e métodos otimizados para a avaliação da cinética de inativação de genomas virais e partículas virais infecciosas em água do mar natural e artificial tratadas com cloro.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Delineamento Experimental

Este trabalho é parte integrante da monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Especialista em Biologia Experimental, pela Universidade de Barcelona, curso o qual foi realizado pela doutoranda desta tese. Parte destes resultados foi publicada em um artigo de Revisão, redigido pelo grupo de pesquisa da Dra. Rosina Gironés, o qual foi publicado no periódico *Water Research*, em 2010. A Figura 2.1 apresenta o fluxograma do delineamento experimental desenvolvido para a realização de todas as etapas necessárias de padronização e aplicação de técnicas utilizadas.

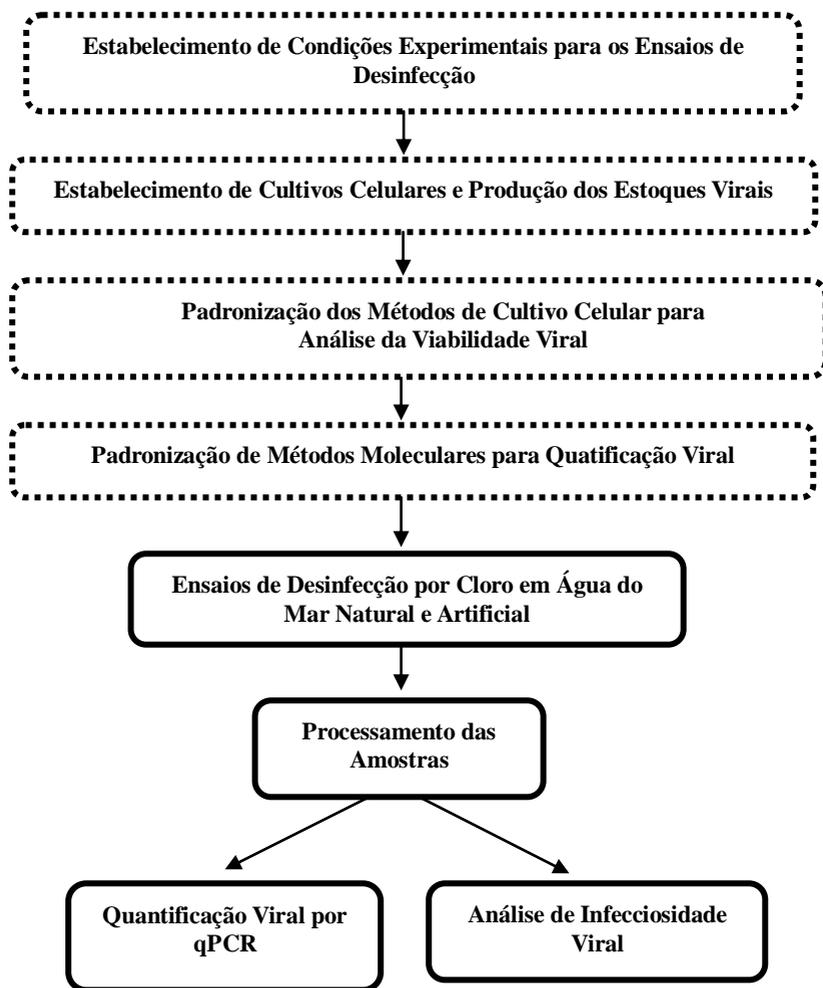


Figura 2.1: Fluxograma das etapas experimentais seguidas para os experimentos de desinfecção viral por cloro em água do mar natural e artificial. Linha tracejada: etapas de padronização dos métodos; Linha inteira: etapas de aplicação dos métodos.

ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA OS ENSAIOS DE DESINFECÇÃO

2.3.2 Reagentes e Vidrarias

Os reagentes e vidrarias utilizados neste trabalho foram preparadas de acordo com Thurston-Enriquez et al. (2003). Resumidamente, todos os materiais de vidro, previamente ao uso, foram imersos em uma solução de 100 mg/l de cloro livre, por um período mínimo de 12 h, com o objetivo de torná-los livre de demanda de cloro (*chlorine demand free*). Posteriormente, estes materiais foram lavados com água deionizada e submetidos a um tratamento em estufa a 200 ° C por 2h. Após este tratamento inicial, Este tratamento inicial foi realizado uma única vez e ao final de cada experimento, estes materiais foram submetidos somente ao processo de imersão em solução de cloro livre, não sendo mais necessário o tratamento em estufa.

Para os ensaios de desinfecção em água do mar, uma solução-estoque a 150mg/l de cloro livre foi preparada utilizando-se água sanitária (hipoclorito de sódio comercial, 42g de cloro/l) adequada para a desinfecção de água de bebida. Para atingir as concentrações de cloro livre utilizadas nos ensaios de desinfecção, uma diluição desta solução-estoque foi feita em água deionizada (sempre no dia de sua utilização).

2.3.3 Água do Mar

Todos os experimentos de desinfecção foram realizados em água do mar natural ou artificial. Esta última foi preparada com sais marinhos comerciais (*Sea Salts*, Sigma, St. Louis, MO, USA), dissolvendo-se 33g destes sais por litro de água deionizada. A água do mar natural utilizada nestes experimentos foi coletada na praia de Gava, localizada na costa mediterrânea, Catalunha, Espanha. O pH e a condutividade de cada uma destas águas foram avaliados, bem como a qualidade microbiológica da água natural (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Parâmetros físico-químicos e qualidade microbiológica das amostras de água do mar natural e artificial utilizadas nos experimentos de desinfecção.

	Água Natural	Água Artificial
pH	7.6	7.9
Temperatura (°C)	23.7	23.9
Condutividade (ppt)	62.35	50.4
Turbidimetria (NTU)	0.75	-
Coliformes Fecais (UFC/ml)	<4	-
<i>Escherichia coli</i> (UFC/ml)	<4	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFC/ml)	<4	-

2.3.4 Estudo Preliminar do Decaimento de Cloro livre em contato com Água do mar

Previamente aos ensaios de desinfecção, foi necessário avaliar a interferência das matrizes (PBS e meio de cultivo de células MEM 1X) nas quais os estoques virais utilizados para semear as amostras de água foram preparados, considerando a possibilidade da existência de demanda de cloro livre pelos componentes destas matrizes.

Para este primeiro experimento, foi utilizada água BDF (“buffered demand free”), que consistia em 0,54 g de Na_2HPO_4 (Anidro) e 0,88 g de KH_2PO_4 (Anidro) por litro de água deionizada e destilada, livre de cloro, cujo pH foi ajustado para 8,0 com 1M KH_2PO_4 . Esta solução, após preparada foi estocada a 4°C até uso.

Foram realizados 3 experimentos diferentes. Para cada um deles, foi utilizado um em recipiente de vidro previamente tratado (item 2.3.1), utilizando 1ml de cada matriz avaliada, adicionado a 100ml de água BDF tratada com uma concentração inicial de 2mg/l de cloro livre: 1) 1ml de PBS; 2) 1ml de meio de cultivo de células MEM 1X suplementado com 2% de SFB e 3) 1ml de meio de cultivo de células MEM 1X suplementado com 10% de SFB. Em um quarto recipiente, foram adicionados somente 100ml de água BDF e cloro livre na concentração inicial de 2mg/l, sendo este considerado como controle negativo. Para cada um dos experimentos, foram realizadas coletas de 10ml de água nos tempos de 30s, 5, 10 e 15 min, para a análise da concentração de cloro livre pelo método DPD (*N,N*-dietil-*p*-

Phenilenediamin), utilizando espectrofotômetro Hanna HI 95711 (*Hanna Instruments*, Hungria).

Além destes ensaios, diferentes concentrações de cloro livre (1mg/l, 1,5mg/l, 2mg/l e 2,5mg/l) foram testadas a fim de avaliar o seu comportamento na água do mar natural e artificial, e selecionar a melhor concentração inicial para a aplicação nos ensaios de desinfecção.

Estes experimentos foram realizados com os dois tipos de água testados neste trabalho. Para cada teste, 100ml de água do mar natural ou artificial foram adicionados com as quatro diferentes concentrações iniciais de cloro livre citadas acima, e os recipientes foram mantidos sob agitação, a TA, por um período de 30 min. Nos tempos de 30s, 5, 15 e 30 min, 10ml de água foi coletada e a concentração de cloro livre foi avaliada como descrito anteriormente.

2.3.5 Armazenamento das Amostras

Ensaio anteriores realizados neste estudo (dados não mostrados) demonstraram que o congelamento das amostras de água do mar pode afetar a recuperação viral, especialmente para a análise de infecciosidade viral. Desta forma, todas as análises que envolveram cultivo celular foram realizadas no mesmo dia dos ensaios de desinfecção, para evitar a necessidade de congelamento das amostras.

Outros ensaios realizados previamente, demonstraram que a aplicação de uma etapa de ultracentrifugação e recuperação da amostra em tampão PBS, permitiram o armazenamento das amostras a 4°C, além de reduzir a toxicidade, concentra as partículas virais e elimina os inibidores das reações de amplificação gênica.

Desta forma, as amostras, após desinfecção com cloro, foram ultracentrifugadas a 60.000 xg, por 60 min, a 4 ° C. Os sedimentos resultantes foram solubilizados em PBS estéril e mantidos a 4 ° C para posteriores análises moleculares e em cultivo celular.

2.3.6 Extração dos Ácidos Nucléicos

O método utilizado para o isolamento do genoma viral de todas as amostras foi o QIAmp Viral MiniKit (Qiagen, Valencia, CA, USA.), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 140µl de cada amostra foram homogeneizados com 560 µl de uma solução de lise, contendo isotiocianato de guanidina; os ácidos nucleicos foram precipitados com igual volume de etanol 100% e este precipitado foi purificado em uma mini-coluna, através do uso de duas diferentes soluções de lavagem. Ao final, os ácidos nucleicos foram eluídos em

tampão de eluição e armazenados a -80°C até serem usados para as análises moleculares.

MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR

2.3.7 Células RAW 264.7 e produção de MNV-1

As células RAW 264.7 (macrófagos transformados com Vírus da Leucemia Murina de Abelson, derivados de camundongos BALBc, Figura 2.2), bem como a cepa de MNV-1, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Herbert W. Virgin, do Departamento de Patologia e Imunologia, da Escola de Medicina da Universidade de Washington (Saint Louis, Missouri, USA). Estas células foram propagadas em meio de cultivo DMEM 1X (Gibco, Carlsbad, CA, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (*Low Endotoxin Serum*, Gibco, Carlsbad, CA, USA), 1,5% HEPES, 1% penicilina/streptomicina, 1% Aminoácidos não essenciais e 1% L-Glutamina. Para a produção de MNV-1, monocamadas confluentes de células RAW 264.7 foram infectadas por até 48h. As células infectadas foram submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento para liberar os vírus ainda presentes no interior das mesmas. O sobrenadante foi centrifugado a $2500\times g$ por 10 min a 4°C , para eliminar os restos celulares. O material resultante foi recuperado e armazenado a -80°C para uso nos ensaios posteriores.

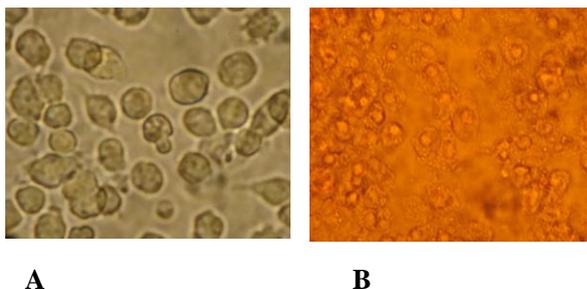


Figura 2.2: Imagens de microscópio de luz invertido de células RAW 264.7 obtidas em aumento de 400X. **A**: células não infectadas, **B**: células infectadas com MNV-1, apresentando efeito citopático típico.

2.3.8 Células A549 e produção de HAdV2

As células A549 (células epiteliais de carcinoma de pulmão humano, Figura 2.3), foram obtidas a partir do banco de células europeu (European Collection of Cell Cultures -ECACC) e mantidas com meio de cultivo MEM 1X (Gibco, Carlsbad, CA, USA), suplementado com

10% SFB, 1% antibióticos Penicilina/Estreptomicina e 1% L-glutamina.

Para a produção de HAdV2 (NCPV#00213), monocamadas confluentes de células A549 foram infectadas por até 48h. As células infectadas foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento e o sobrenadante foi centrifugado a 2500xg 10 min a 4°C, para eliminar os restos celulares. O material resultante foi recuperado e armazenado a -80°C para uso nos ensaios posteriores.

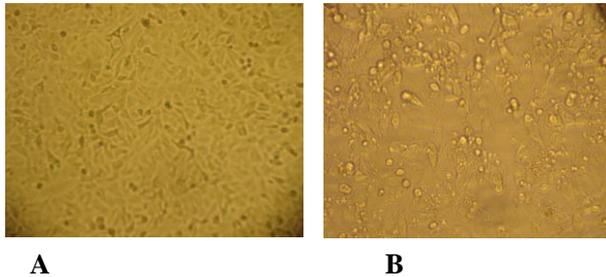


Figura 2.3. Imagens de microscópio de luz invertido de células A549 obtidas em aumento de 400X. **A**: células não infectadas, **B**: células infectadas com HAdV2, apresentando efeito citopático típico.

2.3.9 Células SVG-A e produção de JCPyV

As células SVG-A, derivadas de carcinoma gliais de células embrionárias humanas (Figura 2.4), e a cepa viral JCPyV Mad-1 foram gentilmente cedidas por Dr. Eugene O. Major, do Laboratório de Medicina Molecular e Virologia, do Instituto Nacional de Transtornos Neurológicos, *National Institute of Health*, Estados Unidos. Estas células foram propagadas em meio de cultivo MEM 1X (Gibco, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% SFB, 1% antibióticos Penicilina/Estreptomicina e 1% L-glutamina.

Para a produção de JCPyV, monocamadas confluentes de células SVG-A foram infectadas por 8 dias, não havendo indução de efeito citopático. Após este período, as células foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento e o sobrenadante foi centrifugado a 2500xg por 10 min a 4°C, para eliminar os restos celulares. O material resultante foi recuperado e armazenado a -80°C para uso nos ensaios posteriores.



Figura 2.4. Imagens de microscópio de luz invertido de células SVG-A não infectadas obtidas em aumento de 400X.

2.3.10 Ensaios de Citotoxicidade

Com o objetivo de avaliar a toxicidade das amostras de água do mar natural e artificial, frente as diferentes linhagens celulares, ensaios de citotoxicidade foram realizados. Estes testes foram baseados na metodologia previamente descrita por Rigotto et al. (2005), com algumas modificações.

Células RAW 264.7, A549 e SVG-A foram propagadas em placas de cultivo celular de 24 poços, na concentração de 2×10^5 células/ml, por 24h antes da realização dos ensaios. A inoculação das amostras foi realizada da seguinte maneira: diluições seriadas de amostras de água do mar natural e artificial, para cada um dos vírus, variando de 1:2 a 1:32 foram preparadas em meio de cultivo MEM 1X sem soro fetal bovino. Um inóculo de 100 μ l de cada uma das diluições foi colocado em contato com as células por um período de 60 min, a 37°C. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Após o período de incubação, o inóculo foi removido e 1 ml de meio MEM 1X suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino foi adicionado às células. As placas foram incubadas a 37°C/5% CO₂, e alterações morfológicas na monocamada celular foram observadas após 48h (para RAW 264.7), 96h (para A549) e 8 dias (para SVG-A) de incubação. Cada observação foi comparada a controles negativos, contendo somente células e meio de cultivo. As células foram observadas em microscópio de luz invertido, fixadas com 1% de Formaldeído e coradas com 0,1% de Cristal Violeta para estabelecimento da diluição não citotóxica da água do mar para ser utilizada nos ensaios de viabilidade viral.

2.3.11 Imunofluorescência Indireta para titulação de HAdV2 e JCPyV

Utilizou-se a técnica de imunofluorescência indireta (IFA) descrita por Barardi et al. (1998) para a titulação de estoques virais e análise de infecciosidade em amostras de água do mar.

Para a titulação dos estoques virais de HAdV2, células A549 foram cultivadas em meio de crescimento durante 24h em câmaras de 8 poços (Lab Tek[®], NUNC), na densidade de $3,0 \times 10^5$ células/ml, utilizando 500µl para cada poço. O fluido viral de HAdV2 foi diluído seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} em meio para manutenção (meio MEM 1X suplementado com 2% SFB) e 100µL de cada uma das diluições foi inoculado nos poços, em duplicata, contendo as células. Os controles negativos consistiram somente de inoculação com PBS e em seguida meio de manutenção. Após adsorção viral, o inóculo foi removido e 500µl de meio de manutenção foram adicionados, inclusive no controle celular (negativo). As células ficaram sob incubação durante 72h nas mesmas condições de temperatura e atmosferas mencionadas acima.

Após a incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas 2X com solução salina (PBS). Em seguida as células foram fixadas à câmara pela adição de 300µL de metanol gelado a -20°C e mantidas por 5 min à temperatura ambiente. As células foram então rehidratadas pela adição de 300µL de PBS e inoculadas durante 30 min com 300µL de solução bloqueadora (PBS, soroalbumina bovina a 1%, GibcoBRL e Tween-20 a 0,05%, BIO-RAD), a fim de inibir as reações inespecíficas. A cada poço foram adicionados 100µL do anticorpo anti-adenovírus clone 20/11 (MAB8052), Millipore, diluído na razão 1:200 em solução bloqueadora. As células foram incubadas por 1h a 37°C . Após, as células foram lavadas três vezes com solução bloqueadora e incubadas por 15 min em temperatura ambiente com um anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) diluído a 1:100. A seguir, as lâminas foram lavadas três vezes com solução bloqueadora, secas a temperatura ambiente e montadas em solução de montagem [formalina 5%, NaCl 0,25M, DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), pH 8,6, 2,5%]. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40). O título viral foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos (FFU/ml).

Para os JCPyV, o mesmo protocolo, com pequenas

modificações foi seguido. As células utilizadas foram as da linhagem SVG-A, também crescidas por 24h até atingirem confluência. Em seguida as mesmas foram infectadas com fluido viral de poliomavírus JC diluído seriadamente de 10^{-1} a 10^{-6} em meio para manutenção e 100 μ L de cada uma das diluições foi inoculado, em duplicata, nos poços contendo as células. Após 90 min de adsorção viral, o meio de manutenção foi adicionado e a incubação foi mantida por 8 dias, sendo que no quarto dia pós-infecção, o meio de manutenção foi substituído por meio de cultivo novo, para uma melhor manutenção das células durante um período mais longo de infecção. O anticorpo utilizado foi o sobrenadante do hibridoma MON anti-SV40/JC VP41, diluído 1:10 em solução bloqueadora. Todo o restante do ensaio foi feito conforme o descrito acima para HAdV2.

Para os ensaios de infecciosidade viral após desinfecção por cloro, a técnica de IFA também foi utilizada. No entanto, previamente à etapa de infecção das células, as amostras a serem inoculadas foram previamente diluídas em meio de manutenção a uma diluição não citotóxica (de acordo com resultados obtidos no item 2.3.10). Para a detecção de HAdV2, as câmaras foram incubadas por 96h, e para a detecção de JCPyV a incubação foi realizada por 8 dias, a 37 ° C em 5% de CO₂. As etapas seguintes foram realizadas seguindo igual protocolo utilizado para a titulação destes vírus.

2.3.12 Ensaio de Placa de Lise para MNV-1

Este método foi realizado de acordo com Bae e Schwab (2008) com algumas modificações. Três diferentes períodos de incubação para a replicação viral foram avaliados (24, 36 e 48h), com o uso de dois tipos diferentes de agarose (agarose de baixo ponto de fusão e de ponto de fusão normal), o que evita a difusão da infecção viral a partir de uma célula infectada, para outras células próximas. Pequenas regiões claras arredondadas (denominadas placas de lise) são formadas na monocamada celular como resultado de uma replicação viral localizada. Estas placas podem devem ser melhor visualizadas com o uso de coloração por um corante vital, como o cristal violeta ou vermelho neutro.

Resumidamente, células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 60 mm em uma densidade de 2×10^6 células por poço, por 24h antes do início dos experimentos. Diluições seriadas de base 10 do estoque viral foram preparadas e destas diluições, 0,5ml foram utilizados para inoculação das células. Após uma incubação por 1 hora a 37 ° C na presença de 5% de CO₂, o inóculo viral foi aspirado e

substituído por 2ml de uma solução contendo 1,5% de agarose (SeaPlaque Agarose de baixo ponto de fusão, Lonza, CA, USA ou Agarose para Biologia Molecular, ponto de fusão normal, Sigma) e Meio de Cultivo MEM 1X, e novamente incubadas a 37 ° C por 24, 36 ou 48h, até que as placas de lise fossem visíveis. Após esse período de incubação, 2 ml de uma mistura de agarose 3% e MEM 2X (1:1), adicionadas de 0,1% do corante Vermelho Neutro, foi sobreposta à primeira camada de agarose aplicada. As placas foram contadas após 6-8h e o título viral foi expresso como PFU por mililitro (unidades formadoras de placa/ml).

2.3.13 Ensaio de Placas de Lise para HAdV2

Este ensaio foi utilizado somente para as análises de infecciosidade das amostras de água tratadas com cloro, não sendo aplicado para titulação de estoques virais de HAdV2.

Uma suspensão celular (6×10^5 células/ml) foi incubada com um 1ml de cada uma das amostras de água do mar. Esta mistura foi adicionada a uma garrafa estéril de cultura de tecidos (25cm^2) e deixados em repouso a $36 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 4 a 6h, para permitir a infecção viral e adesão das células à superfície da garrafa. Após este período, 5ml de meio de cultivo MEM 1X, contendo 1,5% de carboximetilcelulose (CMC) foi adicionado à garrafa de cultivo, e esta foi então incubada a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ por até 7 dias. Após este tempo, o meio foi removido, as células foram fixadas com 1% de formaldeído e coradas com cristal violeta.

MÉTODOS MOLECULARES

2.3.14 qPCR para HAdV2 e JCpyV

2.3.14.1 Preparação das Curvas-padrão

Para a produção das curvas-padrão aplicadas na quantificação por qPCR para HAdV2 e JCPyV, dois plasmídeos foram utilizados: pJCPyV, contendo o genoma completo de JCPyV cepa Mad-1 no vetor de clonagem pBR322 (gentilmente cedido por Andrew Lewis do Escritório de Pesquisas e Revisão em Vacinas, CBER, FDA, USA) e pAdV41, contendo o gene da região *Hexon* de HAdV41, também clonado no vetor pBR322 (cedido por Dr. Annika Allard da Universidade de Umeå, Suécia).

Bactérias competentes *Escherichia coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA) foram transformadas com o plasmídeo (pJCPyV ou

pAdV41). Os plasmídeos foram purificados das bactérias com o uso do kit QIAGEN *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN GmbH, Inc., Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, e o DNA obtido, foi quantificado por espectrofotometria.

Para reduzir a possibilidade de contaminação por DNA plasmidial nos laboratórios, os plasmídeos foram linearizados com as enzimas de restrição NruI (pJCPyV) ou BamHI (pAdV41) (Promega, Madison, WI), de acordo com as instruções do fabricante. O produto da reação enzimática foi purificado e novamente quantificado; diluições seriadas na base 10 foram preparadas em tampão TE, variando de 10^7 CG/10 μ l a 10^{-2} CG/10 μ l. Estas diluições foram alíquotadas e armazenadas a -80 °C para uso posterior.

2.3.14.2 Amplificação Gênica

Para a quantificação de HAdV2 e JCPyV, utilizou-se o kit *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). A seqüência dos iniciadores e sondas para cada um dos vírus estão descritos na Tabela 2.2.

Para JCPyV, foram utilizados o par de iniciadores JE3F (0,5 μ M)/ J3ER (0,5 μ M) e a sonda JE3P (0,15 μ M). Para HAdV2, utilizou-se o par de iniciadores ADF (0,9 μ M)/ADR (0,9 μ M) e a sonda ADP1 (0,225 μ M). Para ambas as reações, o volume final foi de 25 μ l, contendo a mistura de reação *Taqman* na concentração final de 1X.

A quantificação foi realizada com o uso do termociclador MX3000P *Sequence Detector System* (Stratagene, La Jolla, CA, USA), com as seguintes condições de amplificação para ambos os vírus: 2 min a 50 °C; 10 min a 95 °C e 45 ciclos de amplificação (15s a 95 °C e 1 min a 60 °C).

2.3.15 qPCR para MNV-1

Para o estabelecimento de um protocolo otimizado do qPCR para quantificar cópias genômicas de MNV-1, as estratégias utilizadas foram (1) avaliação de dois diferentes conjuntos de iniciadores e sondas; (2) produção e análise de três diferentes curvas-padrão para a quantificação absoluta: DNA plasmidial, RNA complementar (cRNA) gerado comercialmente a partir de um molde do DNA e RNA extraído a partir de um estoque viral de MNV-1 previamente quantificado por Ensaio de Placas de Lise e (3) comparação de três diferentes kits comerciais de qRT-PCR.

2.3.15.1 Iniciadores e Sondas

Os iniciadores e sondas testados foram selecionados a partir de trabalhos já publicados na literatura e estão descritos na Tabela 2.3. As condições da reação de qRT-PCR foram aplicados de acordo com cada autor.

Os conjuntos de iniciadores e sonda foram avaliados utilizando o kit comercial *One-step QuantiTect Probe RT-PCR Kit* (Qiagen, Valencia, CA, E.U.A.) e realizado em termociclador *Mx3000 Real Time PCR System* (Stratagene, La Jolla, CA, E.U.A.).

Tabela 2.2: Iniciadores e sondas utilizados para a detecção de HAdV2 e JCPyV por qPCR.

Iniciadores e Sondas	Sequencia (5'-3')	Referencia
JCPyV		BOFILL-MAS et al., 2001
JE3F	ATGTTTGCCAGTGATGATTGAAAA	
JE3R	GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTT	
JE3P	6-FAM AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAAGA-TAMRA	
HAdV2		HERNROTH et al., 2002
ADF	CWTACATGCACATCKCSGG	
ADR	CRCGGGCRAAYTGCACCAG	
ADP1	6-FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA	

6-FAM, fluoróforo 6-carboxifluoresceína; TAMRA, *quencher* não fluorescente na região 3' carboxitetrametilrodamina

Tabela 2.3: Iniciadores e Sondas avaliados para a detecção de MNV-1 por qRT-PCR

Set	Sequence (5'-3')	Location	Reference
Fw-ORF1/ORF2	CAC GCC ACC GAT CTG TTC TG	4972-4991	BAERT et al., 2008
Rv-ORF1/ORF2	GCG CTG CGC CAT CAC TC	5080-5064	
MGB-ORF1/ORF2	6FAM-CGC TTT GGA ACA ATG-MGBNFQ	5001-5015	
SA4 (Forward)	TGA TCG TGC CAG CAT CGA	4763-4780	VINJÈ et al., (Personal communication)
SA5 (Reverse)	GTT GGG AGG GTC TCT GAG CAT	4863- 4843	
Probe MNV-P	6FAM-CTA CCC ACC AGA ACC CCT TTG AGA CTC-BHQ1	4807-4833	

2.3.15.2 Produção e análise de três diferentes curvas-padrão

Três diferentes curvas-padrão foram geradas e avaliadas por sua eficiência para quantificar MNV-1, de acordo com o limite de sensibilidade de cada curva-padrão, a eficiência da amplificação e os valores do *Slope* e R^2 , fornecidos pelo software utilizado para análise dos resultados.

A eficiência da amplificação da reação de qPCR deve ser de 90 a 100%; o *slope* é o indicador da amplificação real, representa o coeficiente angular da reta composta pelos pontos da curva-padrão (valores entre 3,2 e 3,5 são aceitáveis) e o R^2 representa a linearidade da curva-padrão (valores mais próximos de 1,0 indicam uma relação direta entre os valores de *Ct -cycle threshold-* e o número de cópias genômicas).

De acordo com o conjunto de iniciadores e sonda selecionados, a quantificação foi realizada com as seguintes condições: transcrição reversa (30 min a 50 °C); ativação da enzima AmpliTaq Gold (15 min a 95 °C) e 45 ciclos de amplificação (10s a 95 °C, 30s a 55 °C e 15s a 72 °C).

- Curva padrão de DNA plasmidial

Com a finalidade de produzir uma curva padrão a partir de DNA plasmidial, os seguintes passos foram realizados: um produto de PCR de 1.663 bp, correspondente à região da junção ORF1/ORF2 do genoma de MNV-1 (localizada na posição 3.999-5.662) foi gerado por PCR convencional, com o uso dos iniciadores descritos por Hsu et al. (2007) e do kit comercial *OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen, Valencia, CA); este produto de PCR foi inserido no vetor de clonagem *pGEM®-T Easy Vector* (Promega, Madison, USA), produzindo um plasmídeo de 4.678 pb o qual foi utilizado para transformar bactérias competentes DH5 α *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); este plasmídeo foi purificado com o kit *PureYield™ Plasmid Prep Kit* (Promega, Madison, USA), linearizado com a enzima de restrição Sac I (Promega, Madison, USA) e após a determinação por espectrofotômetro da concentração plasmidial, o número de moléculas de DNA foi calculado através do uso da fórmula descrita abaixo. Uma diluição seriada de base 10 desta suspensão foi preparada em tampão TE e utilizada como curva-padrão.

$(X \text{ g/}\mu\text{l DNA} / [\text{tamanho do plasmídeo em pb} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} = Y$
moléculas/ μl

Exemplo:

Tamanho do Plasmídeo: 4.678 pb

Concentração: 100 ng/μl = 100 x 10⁻⁹ g/ul

Cálculo: (100 x 10⁻⁹ g/ul / [4678 x 660*]) x 6.022 x 10²³ = 3 x 10¹⁰ mol/μl

* 660 para DNA; 340 para RNA

- **Curva padrão de cRNA**

Uma curva-padrão foi gerada com RNA transcrito a partir do mesmo plasmídeo utilizado para gerar a curva-padrão de DNA. Este RNA foi transcrito comercialmente por *Yorkshire Bioscience* (York, Inglaterra), utilizando o sistema de transcrição T7 RNA polimerase, seguido da completa remoção DNA plasmidial com a enzima DNase. O RNA gerado foi purificado com LiCl, seguido por extrações com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria e o número de cópias de moléculas de RNA foi calculado conforme descrito anteriormente. Diluições seriadas de base 10 foram preparadas em tampão próprio para armazenamento de RNA (*RNA storage buffer*, Ambion, Austin, E.U.A.).

- **Curva padrão de RNA proveniente de uma suspensão de partículas virais**

RNA foi extraído como descrito acima (seção 2.3.6) de um estoque MNV anteriormente titulado por placas de lise (como descrito no item 2.3.12). Diluições seriadas na base 10 deste RNA extraído foram preparadas em tampão próprio para RNA (*RNA storage buffer*, Ambion, Austin, E.U.A.) e utilizado como curva-padrão. O número de cópias do genoma, neste caso, foi calculado de acordo com o título viral obtido em PFU/ml. A diluição seriada iniciou com 10⁸ PFU/5 μl.

2.3.15.3 Comparação de kits comerciais para qRT-PCR

Após a seleção do conjunto de iniciadores e sonda, três kits comerciais para RT-qPCR foram comparados utilizando-se concentrações conhecidas de cópias genômicas de MNV-1 (5 x 10³ e 5 x 10¹CG/reacção)

A performance de *Platinum® Quantitative RT-PCR ThermoScript™ One-Step System* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), *QuantiTect probe One-step RT-PCR* (Qiagen, Valencia, CA, USA) e

RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foi analisada de acordo com as instruções de cada fabricante. A seleção do melhor kit comercial foi baseada na sensibilidade do ensaio, na intensidade máxima de fluorescência (R_n e ΔR_n) e na ausência de sinal não específico nos controles negativos (NTC). As condições de amplificação foram as descritas no item 2.3.15.2.

2.3.16 Tratamento enzimático (ET) previamente a detecção molecular por qPCR (ET-qPCR)

Neste trabalho, foi aplicada uma estratégia para analisar a aplicabilidade de tratamentos enzimáticos das amostras de desinfecção, para a diferenciação entre vírus inativados e vírus infecciosos, através da quantificação por qPCR. De acordo com Nuanualsuwan e Cliver (2002), estes ensaios têm como princípio, a capacidade do capsídeo viral proteger o ácido nucléico da ação de proteases e nucleases.

Com este propósito, dois tratamentos enzimáticos foram aplicados neste estudo para inferir sobre a infecciosidade viral, por métodos moleculares. Estes tratamentos enzimáticos foram realizados com o uso de Deoxyribonuclease I (DNase I, *Molecular grade*, Invitrogen), de acordo com protocolo previamente estabelecido pelo grupo de pesquisa de Barcelona; e de Ribonuclease A (RNase A partir de pâncreas bovino, Invitrogen), de acordo com Nuanualsuwan e Cliver (2002). Estes tratamentos foram realizados antes a extração de ácidos nucléicos das amostras, as quais foram submetidas à quantificação posterior por q(RT)-PCR.

Para o tratamento com DNase I, a enzima e as soluções de reação (tampão de reação 1X e solução de inativação, providas pelo fabricante) foram adicionados em excesso, considerando uma possível inibição destes reagentes devido a composição heterogênea de amostras ambientais. Para o tratamento das amostras de água do mar tratadas com cloro, 100 μ l de DNase (1 Unidade/ μ l) e 100 μ l de tampão de reação foram simultaneamente adicionados a 100 μ l de cada amostra. Esta mistura foi então homogeneizada e incubada por 30 min a TA. Após este período, 100 μ l de solução de inativação foram adicionados e a amostra foi aquecida a 70 °C por 10 min, para desnaturar a enzima e RNA. Imediatamente ao final da reação, a amostra foi submetida a extração de ácidos nucléicos (item 2.3.6) e armazenada a -20° C, para posterior quantificação por qPCR.

Para o tratamento com RNase A, 100 μ l de cada uma das amostras foram tratados com 100ng da enzima, homogeneizadas e

incubadas por 30 min a 37°C. Após este período, foram adicionadas 40 U de inibidor de RNase, com o propósito de parar a reação enzimática. Imediatamente ao final da reação, a amostra foi submetida a extração de ácidos nucleicos (item 2.3.6) e armazenada a -20° C, para posterior quantificação por qRT-PCR.

DESINFECÇÃO POR CLORO LIVRE

As técnicas otimizadas, conforme descrito nas seções anteriores, foram utilizadas para determinar a capacidade do cloro livre em inativar vírus infecciosos na água do mar natural e artificial, a fim de obter informações úteis para a desinfecção da água a ser utilizada em tanques de depuração de moluscos. Estes dois tipos de água foram semeadas com concentrações conhecidas de HAdV2, MNV-1 e JCPyV e foram tratadas com cloro livre por um determinado tempo. A cinética de desinfecção foi avaliada através da quantificação de genomas virais por q(RT)-PCR e de vírus infecciosos por ensaios em cultura celular.

2.3.17 Ensaios de Desinfecção Viral

Para o desenvolvimento dos ensaios de desinfecção, recipientes de vidro previamente tratados (de acordo com item 2.3.2), contendo 65 ml de água do mar natural ou artificial, foram mantidos a 23-25°C, no interior de uma cabine de segurança biológica. Durante todo o tempo do experimento, estes recipientes foram mantidos sob agitação constante.

Antes de cada experimento, a concentração de cloro livre da solução-estoque foi medida pelo método DPD e o volume necessário para atingir a concentração de cloro livre inicial, em cada recipiente, foi calculado. Os experimentos foram realizados em duplicata para cada tipo de água.

Dois recipientes foram utilizados em cada experimento e ambos foram semeados simultaneamente com MNV-1, HAdV2 e JCPyV (suspensões virais em PBS), em concentrações que permitissem verificar a redução de 4 logaritmos ($5,0 \times 10^6$ PFU/ml de MNV-1; $5,0 \times 10^6$ FFU/ml de HAdV2 e $1,5 \times 10^6$ FFU/ml de JCPyV), ou seja, 99,99% de eliminação de vírus presentes inicialmente (EPA, 2003).

Um destes recipientes foi utilizado como controle negativo de desinfecção, sem adição de cloro, para cada um dos experimentos realizados. O uso deste controle foi necessário para avaliar se a inativação viral ocorreu devido a atividade desinfetante do cloro ou devido a interferência de compostos presentes na água do mar. O outro recipiente, contendo cloro livre em água do mar a uma concentração inicial de 2,5

mg/l, foi utilizado com o objetivo de avaliar a cinética de desinfecção viral.

Os ensaios foram desenvolvidos por 60 min, e amostras de 5 ml de água do mar foram coletadas a cada 30s, 10, 20, 30, 45 e 60 min, de ambos recipientes. Nos mesmos tempos de coleta, 5 ml de água do mar foram analisados para a determinação da concentração de cloro livre ao longo do tempo experimental.

Após cada tempo de amostragem, o cloro livre residual foi imediatamente neutralizado pela adição de 50 µl, de uma solução de Tiosulfato de Sódio a 10%, a cada uma das amostras e estas armazenadas a 4°C. Ao término de cada experimento, as amostras foram ultracentrifugadas a 60.000 xg por 60 min a 4°C e o sedimento resultante foi ressuspendido em PBS (item 2.3.4).

Posteriormente à ultracentrifugação, as amostras foram submetidas à quantificação de genomas virais (tratamento com nucleases, qPCR e qRT-PCR) e a análise de infecciosidade (Ensaio de Placa de Lise e IFA). Os ensaios em cultura celular foram realizados sempre no mesmo dia dos ensaios de desinfecção, evitando congelar as amostras.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Estudos Preliminares de Decaimento de Cloro Livre em Água do Mar Natural e Artificial

A matriz PBS foi selecionada para a preparação e diluição dos estoques virais que foram utilizados nos experimentos de desinfecção. Esta escolha foi baseada na baixa interação do PBS com o cloro livre presente na água testada, o que evitou uma diminuição significativa de cloro disponível (Figura 2.5).

Quando diferentes concentrações de cloro livre foram avaliadas, a concentração inicial de 2.5mg/l foi selecionada, considerando que permitiu níveis aceitáveis de cloro livre por no mínimo 30 min, tempo o qual foi considerado como adequado para a inativação viral, tanto para água do mar natural (Figura 2.6) como artificial (Figura 2.7).

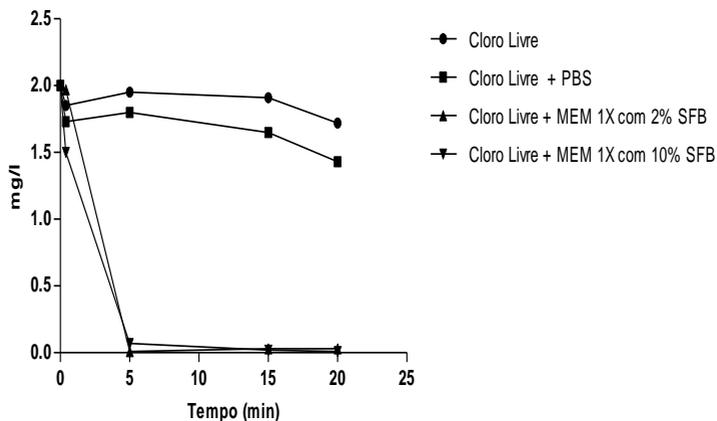


Figura 2.5: Curva de decaimento do Cloro Livre em água BDF com diferentes concentrações de substâncias orgânicas e inorgânicas. Este experimento foi realizado com uma concentração inicial de 2,0mg/l de cloro livre.

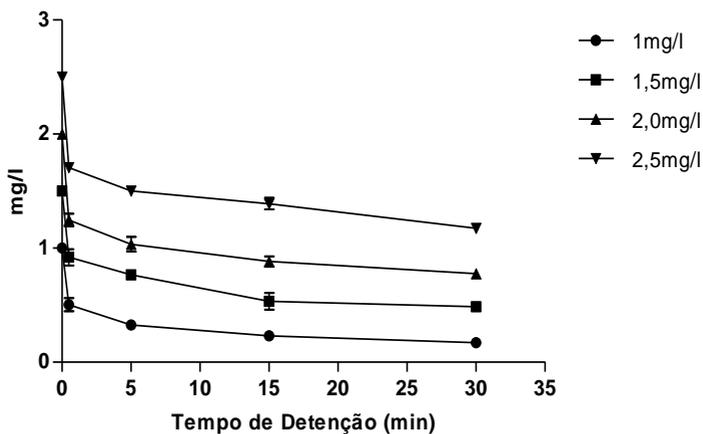


Figura 2.6: Curva de Decaimento de Cloro Livre em água do mar natural. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

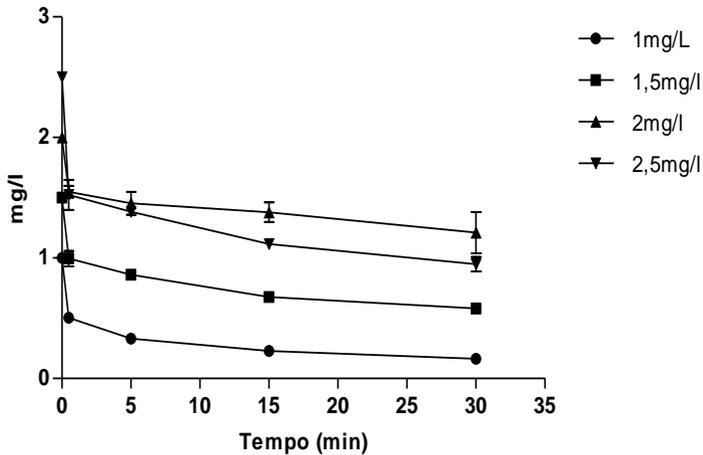


Figura 2.7: Curva de Decaimento de Cloro Livre em água do mar artificial. Os valores representam a media de dois experimentos independentes.

2.4.2 Métodos de Cultivo Celular para Quantificação de HAdV2, MNV-1 e JCPyV infecciosos após os ensaios de desinfecção por cloro

2.4.2.1 Titulação dos Estoques Virais

Os estoques virais de HAdV2 e JCPyV que foram produzidos para este estudo, foram quantificados pelo ensaio de IFA (item 2.3.11), apresentando os títulos virais de 10^9 FFU/ml e 10^7 FFU/ml, respectivamente. O título viral da suspensão de MNV-1 produzida foi determinado pelo ensaio de placa de lise (item 2.3.12) e foi quantificado a 4×10^8 PFU/ml.

2.4.2.2 Citotoxicidade

De acordo com os ensaios de citotoxicidade (item 2.3.10), as diluições 1:2, 1:4 e 1:8, da água do mar natural e artificial, em meio de cultivo MEM 1X sem SFB foram selecionadas para serem usadas em A549, RAW 264.7 e SVG, respectivamente, para os ensaios de infecciosidade viral nas amostras de desinfecção.

2.4.2.3 Ensaio de Placas de Lise para MNV-1

O melhor tempo de incubação para obter as placas de lise com um tamanho adequado para a contagem visual foi de 48h, utilizando a agarose de baixo ponto de fusão *SeaPlaque* (Lonza, Basel, Suíça). Os tempos de incubação de 24 e 36h apresentaram placas de lise de tamanho pequeno, permitindo somente a quantificação de diluições muito baixas. O uso de agarose de ponto de fusão normal não permitiu uma avaliação visual satisfatória das placas de lise. A Figura 2.8 ilustra o resultado observado para este tipo de ensaio, com o uso de agarose de baixo ponto de fusão e um período de incubação de 48h.

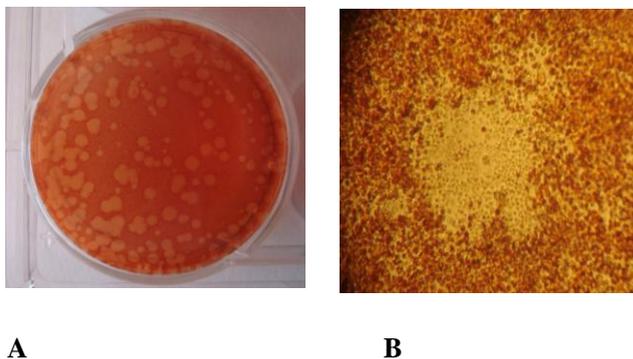


Figura 2.8: Formação de Placas de Lise por após a infecção de células RAW 264.7 por MNV-1. **A**: Imagem Digital de placas visualizadas em uma placa de 6 poços; **B**: Microscopia de Luz invertida obtida com um aumento de 200X.

2.4.2.4 Ensaios de viabilidade viral para HAdV2 e JCPyV em amostras de água do mar

Na aplicação do método a IFA com o objetivo de quantificar HAdV2 e JCPyV infecciosos em amostras de água do mar após tratamento com cloro livre, não foi possível uma otimização do método.

Apesar de diferentes períodos de incubação da infecção viral terem sido avaliados, os resultados obtidos não foram confiáveis e reprodutíveis, tanto para HAdV2 como para JCPyV. Provavelmente a heterogeneidade da matriz água do mar tenha alterado as condições de dispersão viral na água, resultando em uma diminuição do título por agregação destes vírus, ou causado alguma interferência nas reações imunológicas.

Desta forma, para avaliar a viabilidade de HAdV2 após a desinfecção, o ensaio de Placas de Lise foi selecionado por proporcionar melhores resultados que o método previamente testado, já que a quantificação de partículas virais foi clara e fácil. Uma interferência da matriz água do mar na monocamada de células não foi observada.

No entanto, devido a ausência de um método alternativo para a detecção de JCPyV infecciosos, esta etapa do trabalho não foi realizada, sendo este vírus quantificado somente por métodos moleculares.

A figura 2.9 apresenta um exemplo de resultado obtido com a aplicação do ensaio de placas de lise para quantificação de HAdV2.

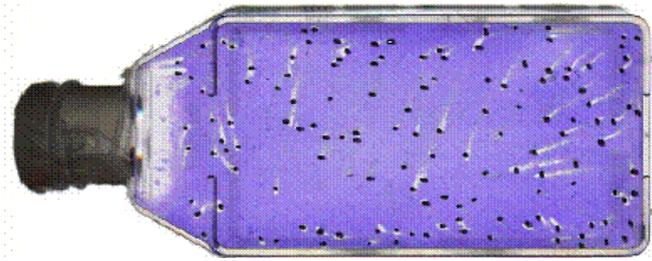


Figura 2.9: Formação de Placas de Lise em células A549 infectadas por HAdV2, em garrafas de cultivo celular de 25cm². As placas foram evidenciadas com a coloração por Cristal violeta e identificadas como placas translúcidas, que foram contadas e marcadas a caneta.

Fonte: <http://www.virobathe.org/Cyprus%20presentations/WP4.pdf>

2.4.3 Estabelecimento de um Protocolo para Detecção Molecular de MNV-1

O conjunto de iniciadores descrito por Baert et al. (2008), que tem como alvo a junção ORF1- ORF2 do genoma de MNV-1 apresentou o melhor sinal de amplificação e foi selecionado para ser utilizado nos ensaios posteriores.

A avaliação dos três kits comerciais de qRT-PCR resultou na seleção de *RNA UltraSense™ One-Step RT-PCR System*. Este kit apresentou melhor sensibilidade de detecção (Cts de valores mais baixos), maior intensidade da emissão de fluorescência da sonda e ausência de amplificação não específica nos controles negativos. A tabela 2.4 apresenta os valores de Ct obtidos com a utilização dos diferentes kits de amplificação testados

Tabela 2.4: Valores de Ct obtidos na avaliação de três kits comerciais para a amplificação de concentrações conhecidas de cópias genômicas de MNV-1. Os valores apresentados são referentes a ensaios realizados em triplicata.

Cópias Genômicas /reação	RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System	Platinum® Quantitative RT-PCR ThermoScript™ One-Step System	QuantiTect probe One-step RT-PCR
5 x 10³	27.7; 27.4; 27.8	28.9; 30.3; 29.5	33.05; 32.8; 33.2
5 x 10¹	35.1; 36.4; 35.4	36.3; No Ct; 35.7	No Ct; 39.8; 40.1

Com a análise dos parâmetros R^2 , *Slope*, eficiência da reação e máxima fluorescência, a avaliação das três diferentes curvas-padrão resultou na seleção da curva gerada com o uso de cRNA (Tabela 2.5).

Foi descrito que o uso de curvas-padrão produzidas com DNA, para a quantificação de amostras de RNA, não leva em consideração a etapa de transcrição reversa, o que conduz a eficiências de reação menores que 100% (84 a 98,6%) em comparação com os valores obtidos quando é usado RNA como padrão de quantificação (Fey et al., 2004). Portanto, a utilização de padrões produzidos com DNA, leva a uma quantificação subestimada do gene alvo, o que foi possível observar em nossos experimentos. Os resultados demonstraram que curvas-padrão de RNA obtido por transcrição reversa, podem ser utilizadas com sucesso para a quantificação do número de moléculas de RNA viral.

Levando em consideração, que uma PFU de MNV-1 corresponde a aproximadamente de 100 cópias de DNA genômico (como foi observado durante este estudo), pode-se supor que a eficiência do uso de RNA extraído de partículas virais de MNV-1 é semelhante ao rendimento obtido através do uso de cRNA. No entanto, os parâmetros da curva-padrão obtidos com cRNA apresentaram valores de qualidade superior.

Tabela 2.5: Valores de Ct e parâmetros obtidos na análise de três diferentes curvas-padrão geradas para quantificar MNV-1. Os valores mostrados são referentes a três replicas por ensaio.

Número de cópias genômicas esperadas ou PFU/reação	Curva-padrão de cRNA	Curva-padrão de DNA plasmidial	Curva-padrão de partículas virais
10⁵	23. 5; 23; 23.1	25; 25.2; 25	14.9; 14.7; 15
10⁴	26.4; 26.5; 26.9	28.7; 29; 28.7	18.5; 18.8; 19
10³	30.7; 29.8; 29.4	31.3; 31.6; 32	21.8; 21.4; 21.8
10²	33.2; 33.8; 33.2	35.4; 35.2; 35.3	25.4; 25.8; 26.5
10¹	35.9; 36.1; 36.3	38.8, 38.7, 37.6	30.7; 30.7; 30.2
10⁰	No Ct	No Ct, No Ct, 39.1	31.1; 31.8; 32
Parâmetros da Curva Padrão			
<i>Slope</i>	-3.33	-3.28	-3.58
R²	1.0	0.99	0.98
Eficiência	99.4%	101.4%	90.1%
Máxima Fluorescencia	7	3	6

2.4.4 Detecção Molecular de HAdV2 e JCPyV

O protocolo de qPCR aplicado neste estudo para a quantificação da cópias genômicas de HAdV2 e JCPyV, foi de acordo com metodologias previamente estabelecidas no laboratório da Universidade de Barcelona. As curvas-padrão geradas a partir de plasmídeos linearizados, contendo as regiões-alvo para cada um dos vírus estão apresentadas na figura 2.10, bem como os parâmetros que indicam uma linearidade na amplificação gênica.

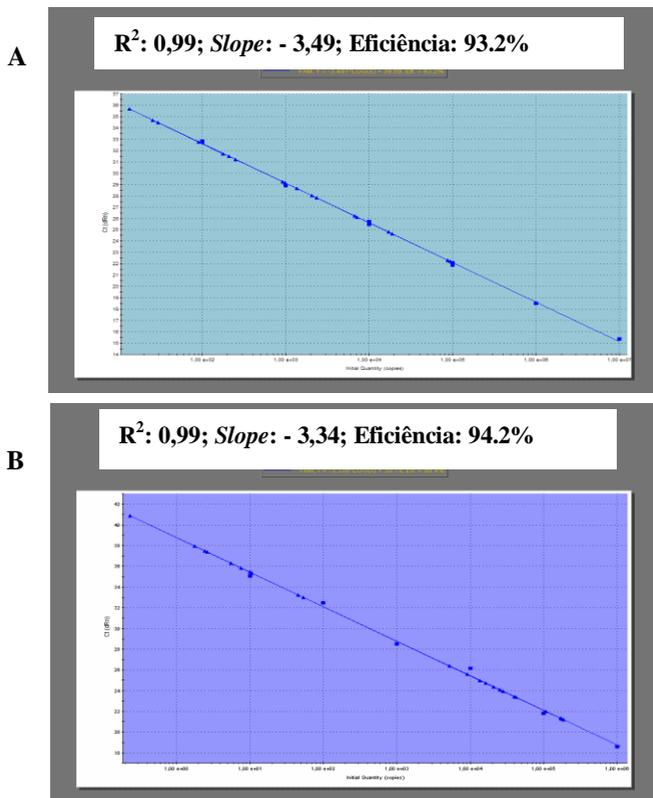


Figura 2.10: Curva Padrão de DNA obtida com diluições seriadas na base 10 de plamídeos contendo a região alvo de HAAdV2 (A) e JCPyV (B)

2.4.5 Ensaios de Desinfecção por Cloro Livre

2.4.5.1 Demanda de Cloro Livre em Água do Mar Natural e Artificial nos Ensaios de Desinfecção

A taxa e a extensão da demanda de cloro livre nas duas águas testadas foram determinadas simultaneamente à coleta de amostras para a desinfecção viral. De acordo com a figura 2.11, ambas as águas apresentaram uma demanda de cloro livre, na qual uma concentração residual do desinfetante diminuiu ao longo do tempo. Com a concentração inicial de 2,5mg/l, houve um rápido consumo de cloro livre em ambas as águas já nos primeiros 30s (um consumo de 40%),

atingindo 80% de redução no cloro disponível ao final do experimento (60 min).

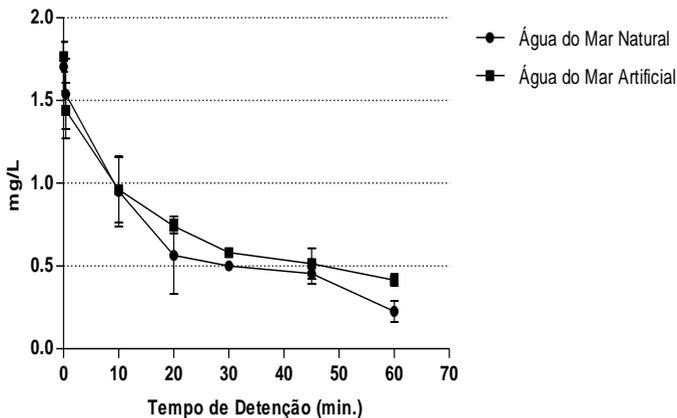


Figura 2.11: Curva de decaimento de cloro livre durante os ensaios de desinfecção com água do mar natural e artificial

2.4.5.2 Cinética de Desinfecção

Os resultados obtidos na avaliação da cinética de desinfecção por cloro livre foram inicialmente analisados com auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) para avaliar a tendência das curvas de decaimento viral. De acordo com os parâmetros estatísticos obtidos, a redução na concentração viral seguiu uma cinética com tendência exponencial negativa. Os dados completos estão em processo de análise estatística, a qual está sendo realizada pelo Professor Dr. Miquel Calvo, do Departamento de Estatística, da Faculdade de Biologia, Universidade de Barcelona.

Os dados de desinfecção referentes aos valores absolutos de concentração viral em cada amostra, por métodos moleculares e de cultivo celular, estão apresentados na forma de gráficos construídos com o programa *GraphPad Prism 5.0*.

Para a avaliação do decaimento logarítmico, em cada experimento, a concentração viral nas amostras controle (sem adição de cloro), no primeiro tempo analisado ($t = 30s$), foi expressa como N_0 . A concentração viral nas amostras tratadas com cloro, em cada tempo de coleta (t), foi denominada de N_t . A redução viral em cada tempo “ t ” foi computada como: concentração viral em cada tempo t (N_t)/concentração

viral inicial (No) (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003). Os valores obtidos foram então transformados para Log10 ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$); valores maiores que 4 significam uma redução de 99,99% das partículas virais inicialmente quantificadas (EPA, 2003).

2.4.5.2.1 HAdV2

A cinética de desinfecção de HAdV2 indicou que este vírus apresenta, de forma geral, uma resistência ao tratamento com cloro livre, para ambas as águas testadas. Baseado nos resultados de quantificação de cópias genômicas por qPCR, HAdV2 apresentou uma redução logarítmica de $\sim 2,5\log_{10}$ e $\sim 2,3\log_{10}$, nos primeiros 10 min de contato com o cloro livre, em água do mar natural e artificial, respectivamente. Ao final de 60 min, foi observada uma redução de mais de $3,5\log_{10}$ para ambas as águas, indicando uma remoção de 99,9% da concentração inicial de HAdV2.

Quando foi avaliada a quantificação por ensaio de placas de lise, foi possível observar que HAdV2, apesar da diminuição da concentração viral, manteve-se infeccioso ao final dos ensaios. Quando o qPCR foi precedido de um tratamento enzimático com DNase I, em 30 min foi observada uma redução em torno de $2,5\log_{10}$ redução a qual foi similar ao observado nas análises de infecciosidade.

A Tabela 2.6 apresenta um sumário dos resultados obtidos em cada um dos tempos de amostragem, calculados na forma de redução logarítmica. As Figuras 2.12 e 2.13 apresentam os valores absolutos de quantificação em CG/ml (por qPCR e ET-qPCR) e PFU/ml (por Ensaio de Placas de Lise), obtidos para ambas as águas testadas.

Tabela 2.6: Sumário dos valores de redução logarítmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para HAdV2 após desinfecção por cloro livre em água do mar natural e artificial. A concentração residual de cloro foi medida de 0,5 a 60 min. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes, avaliados por qPCR, ET-qPCR e Ensaios de Infeciosidade viral.

Tempo (min)	Cloro Livre mg/l	qPCR	ET-qPCR	Infeciosidade
Água do Mar Natural				
0	2,50	0,00	0,00	0,00
0,5	1,70	-0,73	-1,20	-0,30
10	1,54	-2,50	NA	NA
20	0,95	-3,15	NA	NA
30	0,56	-3,00	-2,50	-2,25
45	0,50	-3,60	NA	NA
60	0,45	-3,60	-3,35	-2,35
Água do Mar Artificial				
0	2,50	0,00	0,00	0,00
0,5	1,76	-0,75	-1,22	-0,04
10	1,44	-2,30	NA	NA
20	0,96	-2,00	NA	NA
30	0,74	-3,10	-2,66	-2,40
45	0,58	-3,70	NA	NA
60	0,51	-3,70	-2,70	-3,30

NA: Não analisado

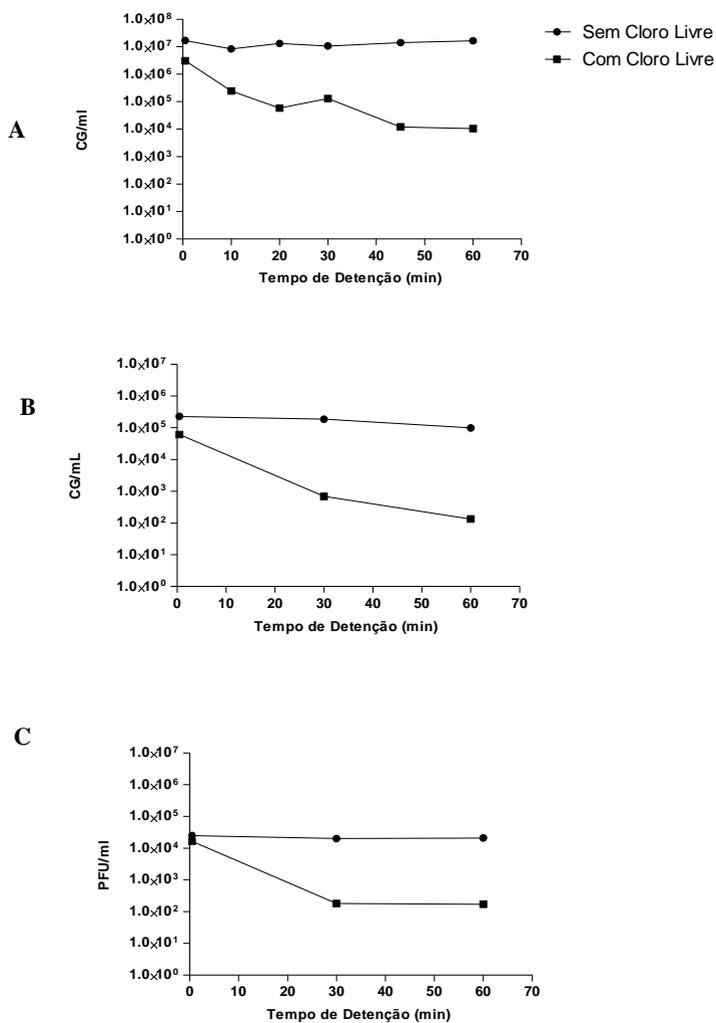


Figura 2.12: Curva de decaimento de HAdV2 após desinfecção em água do mar natural tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes, avaliados por qPCR (A), ET-qPCR (B) e Ensaios de Infeciosidade viral (C).

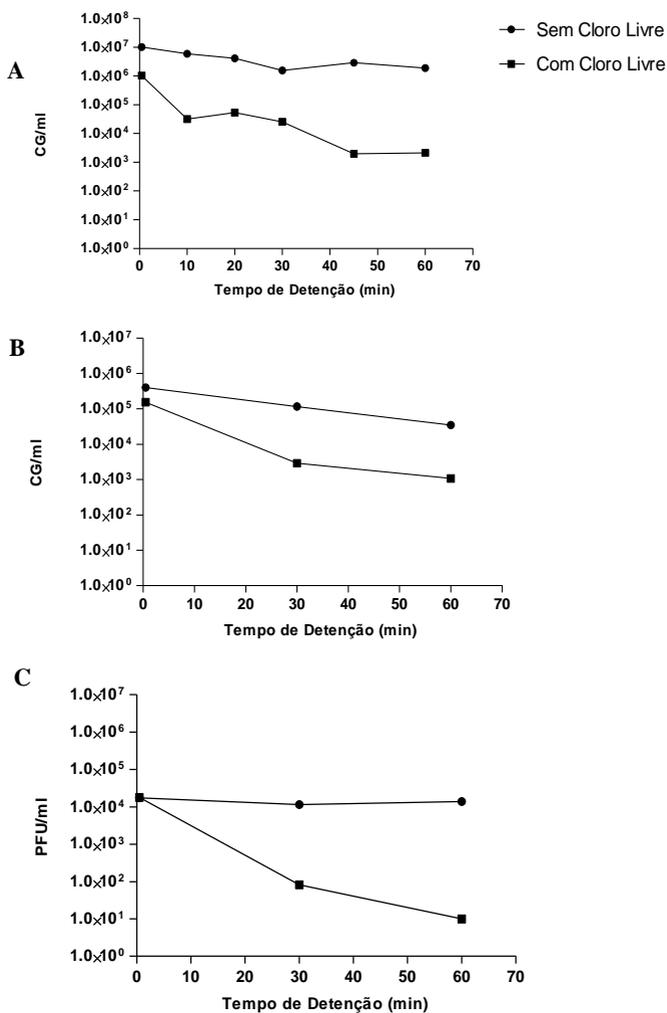


Figura 2.13: Curva de decaimento de HAdV2 após desinfecção em água do mar artificial tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes, avaliados por qPCR (A), ET-qPCR (B) e Ensaio de Infeciosidade viral (C).

2.4.5.2 MNV-1

Os resultados obtidos para a cinética de desinfecção de MNV-1 indicam uma maior sensibilidade deste vírus ao tratamento com cloro livre, quando comparado a HAdV2 e JCPyV, tanto em água do mar natural como em artificial. A curva de decaimento de cópias genômicas por RT-qPCR e ET RT-qPCR (Figuras 2.14 e 2.15) indica a presença do genoma viral em todos os tempos analisados. No entanto, nas análises de placas de lise, a partir de 20 min de contato com cloro livre, não foram mais detectados MNV-1 infecciosos, o que permite inferir que houve uma redução de 99,99% da concentração viral presente no início do ensaio.

De acordo com a Tabela 2.7, os dados obtidos com RT-qPCR precedido por tratamento enzimático com RNase A, indicaram uma redução superior a $4,0\log_{10}$, valor este similar ao obtido com a análise de infecciosidade e inferior aos obtidos por RT-qPCR sem tratamento.

A Tabela 2.7 apresenta um sumário dos resultados obtidos em cada um dos tempos de amostragem, calculados na forma de redução logarítmica. As Figuras 2.14 e 2.15 apresentam os valores absolutos de quantificação em CG/ml (por qPCR e ET q(RT)PCR) e PFU/ml (por Ensaio de Placas de Lise), obtidos para ambas as águas testadas.

Tabela 2.7: Sumário dos valores de redução logarítmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para MNV-1 após desinfecção por cloro livre em água do mar natural e artificial. A concentração residual de cloro foi medida de 0,5 a 60 min. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes, avaliados por qPCR, ET-qPCR e Ensaio de Infeciosidade viral.

Tempo (min)	Cloro Livre mg/l	qPCR	ET-qPCR	Infeciosidade
Água do Mar Natural				
0	2,50	0,00	0,00	0,00
0,5	1,70	-0,52	-1,90	-1,75
10	1,54	-0,42	NA	-2,65
20	0,95	-1,46	NA	-4,2
30	0,56	-2,05	-2,51	NA
45	0,50	-1,85	NA	NA
60	0,45	-2,10	-4,2	NA
Água do Mar Artificial				
0	2,50	0,00	0,00	0,00
0,5	1,76	-1,10	-1,80	-1,35
10	1,44	-1,27	NA	-2,42
20	0,96	-2,10	NA	-4,37
30	0,74	-1,81	-3,47	NA
45	0,58	-3,53	NA	NA
60	0,51	-3,83	-4,73	NA

NA: Não analisado

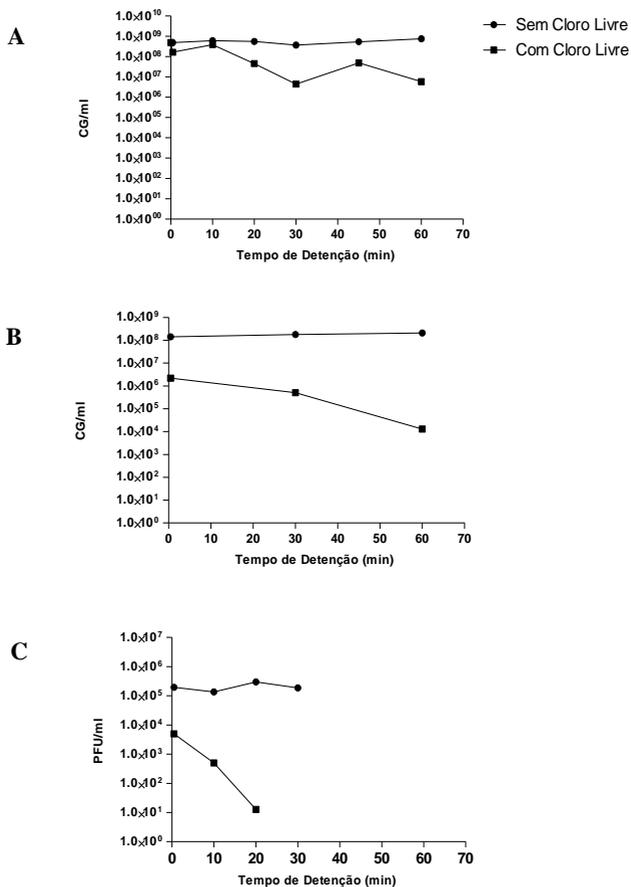


Figura 2.14: Curva de decaimento de MNV-1 após desinfecção em água do mar natural tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes, avaliados por qRT-PCR (A), ET-qRT-PCR (B) e Ensaio de Infeciosidade viral (C). ↓: limite de detecção do ensaio de placas de lise

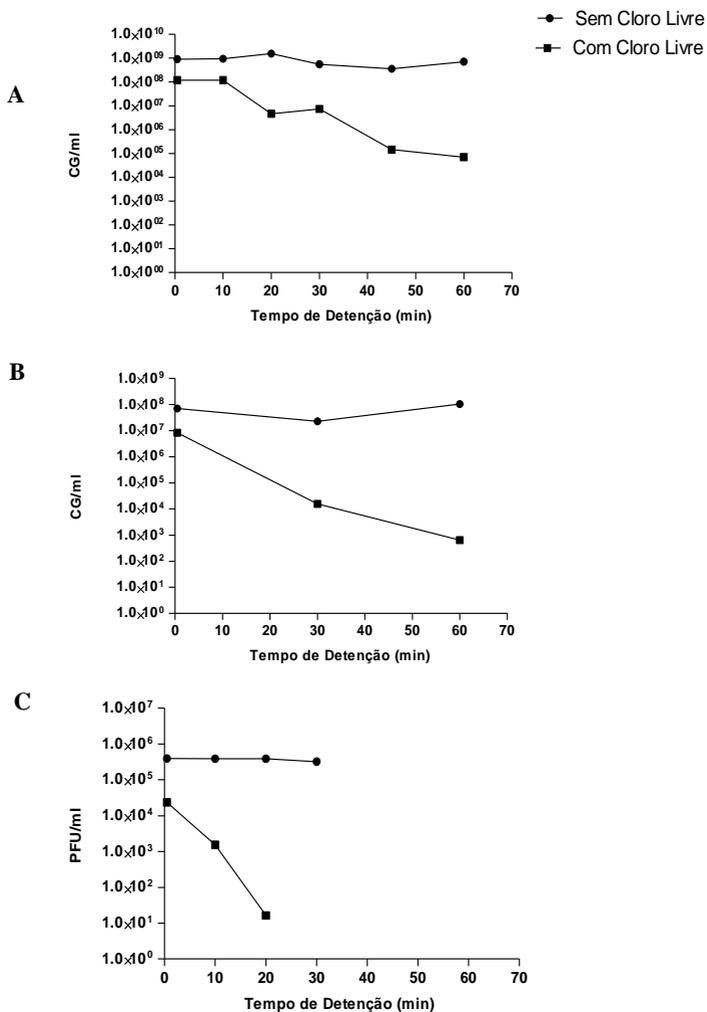


Figura 2.15: Curva de decaimento de MNV-1 após desinfecção em água do mar artificial tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes, avaliados por qRT-PCR (A), ET-qRT-PCR (B) e Ensaio de Infeciosidade viral (C). ↓: limite de detecção do ensaio de placas de lise

2.4.5.3 JCPyV

Entre os três vírus analisados, JCPyV apresentou maior estabilidade do genoma ao tratamento com cloro livre. Não foi possível inferir sobre a infecciosidade das partículas virais íntegras, devido à limitação da técnica de IFA para este tipo de matriz ambiental.

De acordo com os dados obtidos, foi possível a detecção do genoma viral em todos os tempos amostrados. Em 30 min de contato com cloro livre, ocorreu uma redução logarítmica não superior a $1,6\log_{10}$ em ambas as águas testadas. Este valor não sofreu alterações significativas até o final de 60 min (Tabela 2.8).

Baseado nos resultados de quantificação de cópias genômicas por qPCR precedido de tratamento com DNase I, a redução logarítmica, da mesma forma, foi observada uma pequena diminuição na concentração viral inicial ($1,5\log_{10}$ e $1,33\log_{10}$, para água natural e água artificial, respectivamente). A Tabela 2.8 apresenta um sumário dos resultados obtidos em cada um dos tempos de amostragem, calculados na forma de redução logarítmica. As figuras 2.16 e 2.17 apresentam os valores absolutos de quantificação em CG/ml (por qPCR e ET-qPCR), obtidos para ambas as águas testadas.

Tabela 2.8: Sumário dos valores de redução logaritmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para JCPyV após desinfecção por cloro livre em água do mar natural e artificial. A concentração residual de cloro foi medida de 0,5 a 60 min. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes, avaliados por qPCR e ET-qPCR.

Tempo (min)	Cloro Livre mg/l	qPCR	ET-qPCR
Água do Mar Natural			
0	2,50	0,00	0,00
0,5	1,70	-0,25	-0,75
10	1,54	-1,45	NA
20	0,95	-1,52	NA
30	0,56	-1,63	-1,56
45	0,50	-1,71	NA
60	0,45	-1,67	-1,51
Água do Mar Artificial			
0	2,50	0,00	0,00
0,5	1,76	-0,44	-0,30
10	1,44	-0,92	NA
20	0,96	-1,27	NA
30	0,74	-1,31	-1,12
45	0,58	-1,27	NA
60	0,51	-1,31	-1,33

NA: Não analisado

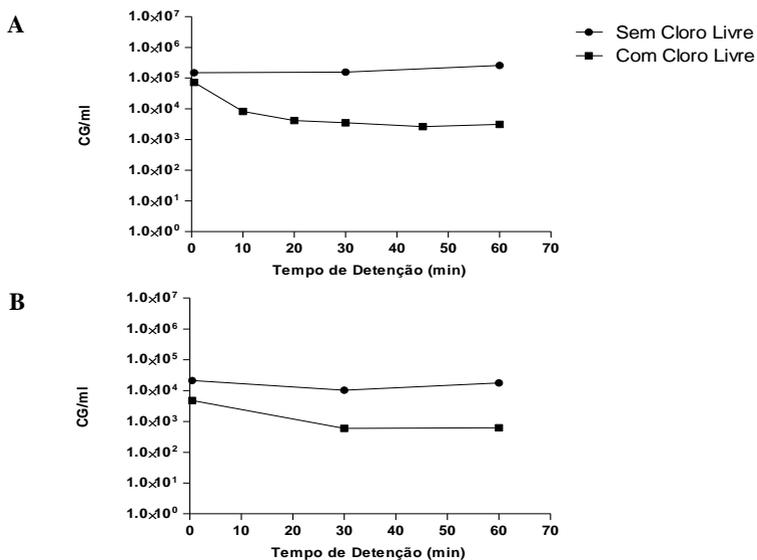


Figura 2.16: Curva de decaimento de JCPyV após desinfecção em água do mar natural tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes, avaliados por qPCR (A) e ET-qPCR (B).

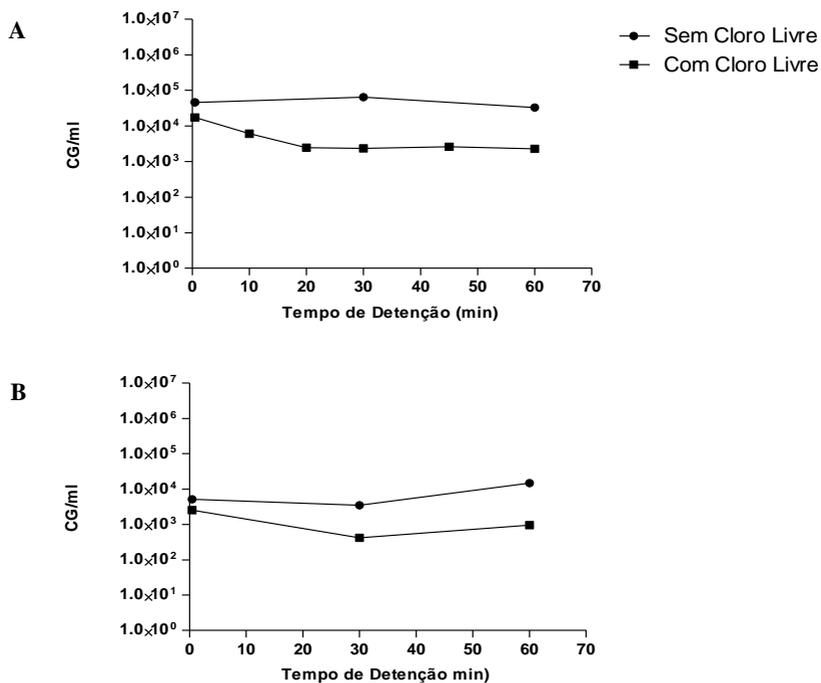


Figura 2.17: Curva de decaimento viral de JCPyV após desinfecção em água do mar artificial tratada inicialmente com 2.5mg/l de cloro livre. Os resultados apresentados representam a média de dois experimentos independentes, avaliados por qPCR (A) e ET-qPCR (B).

2.5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi investigar a capacidade de cloro em promover a desinfecção simultânea de MNV-1, HAdV2 e JCPyV, em água do mar natural e artificial. Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo descrevendo o uso da cloração da água do mar, fornecendo informações para a sua aplicação em sistemas de aquíicultura. Foram observadas diferenças nas taxas de desinfecção entre os vírus utilizados, tanto para a persistência dos genomas virais, como para a infecciosidade viral. Previamente aos ensaios de desinfecção por cloro livre, foram estabelecidas e otimizadas diferentes técnicas que permitiram uma análise mais completa da cinética de desinfecção destes vírus.

Existem poucos estudos sobre a cloração da água do mar (DUURSMA; PARSI, 1976; WONG; DAVIDSON, 1977; HAAG, 1981, WONG; OATTS, 1984; DIN et al., 2000) e de todos eles, parece claro que quando o cloro é adicionado, ocorre uma redução da sua concentração inicial, ao longo do tempo, em duas fases. Em uma cinética típica de decaimento de cloro, o cloro livre decai rapidamente após sua adição inicial, mas com o passar do tempo a taxa de decaimento torna-se mais lenta. Na primeira fase, ocorre um rápido decréscimo de concentração. Este é seguido de uma segunda fase, na qual ocorre uma redução mais lenta e constante na concentração de cloro, evidenciando um equilíbrio químico das formas de cloro disponíveis nesta fase (DIN et al., 2000).

Uma concentração de cloro livre suficiente deve ser adicionada à água, para que mesmo reagindo com qualquer uma das substâncias presentes, seja possível a permanência de um pequeno excesso de cloro para garantir a desinfecção completa (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, IRLANDA, 1998). Desta forma, de acordo com as Figuras 2.6 e 2.7, diferentes concentrações iniciais de cloro livre (1 a 2,5mg/l) foram testadas para a determinação da demanda de cloro nos dois tipos de águas, e selecionar a concentração inicial que permitisse uma disponibilidade de cloro em todos os tempos amostrados.

Uma fração significativa da demanda de cloro observada em nosso estudo foi causada pela reação entre este e compostos orgânicos que estão naturalmente presentes na água do mar, reduzindo a disponibilidade para a desinfecção. Substâncias inorgânicas, tais como a amônia (NH_3) e Ferro (Fe_2) reagem rapidamente com o cloro, gerando uma demanda instantânea (WARTON et al., 2006). Desta forma, o cloro livre é somente disponível momentaneamente antes de sua combinação

com o nitrogênio amoniacal, formando monocloramina, a qual apresenta reduzida, mas sustentada, ação desinfetante (DIN et al., 2000). A presença simultânea de cloro livre e cloro combinado produz a curva bifásica de reação (HAVELAAR; NIEUWSTAD, 1985), conforme foi observado na Figura 2.10.

Considerando-se que água do mar apresenta um pH aproximado de 8,0, a reação pela adição de cloro com água do mar resulta na formação de HOCl, OCl, HOBr e OBr; estes compostos agirão de forma a criar um ambiente hostil para os organismos vivos, influenciando positivamente no processo de desinfecção (DIN et al., 2000). Este fenômeno pode explicar o fato de que, no presente estudo, mesmo em baixas concentrações, o cloro livre disponível foi capaz de inativar os vírus analisados.

De acordo com Urakami et al. (2007) e Shin e Sobsey (2008) é amplamente aceito que o cloro livre perde a sua atividade virucida e bactericida na presença de substâncias orgânicas, tais como componentes celulares e proteínas dos meios de cultivo (MEM, por exemplo, contém agentes redutores, tais como a cisteína, o que interfere na atividade do hipoclorito de sódio). Portanto, a utilização de uma suspensão viral em PBS evitou um maior consumo de cloro em todos os experimentos realizados.

Para o estabelecimento de um protocolo de quantificação dos genomas de MNV-1, por RT-qPCR, foram necessárias diferentes etapas para otimizar as condições deste ensaio. A opção pelo uso de kits comerciais de RT-qPCR permitiu que as análises fossem realizadas em somente uma etapa para a quantificação do RNA de MNV-1. A vantagem do uso de protocolo de uso de síntese de cDNA e PCR é minimizar a variação experimental, pois a etapa de transcrição reversa do RNA e a amplificação gênica ocorrem em um mesmo tubo de reação, evitando a manipulação excessiva e uma possível contaminação na reação.

A quantificação absoluta de MNV-1 nas amostras de água, exigiu o desenvolvimento prévio de uma curva-padrão de concentrações conhecidas do número de genomas virais. Uma curva-padrão produz uma relação linear entre os valores de Ct e a quantidade inicial do RNA ou cDNA, permitindo a determinação de concentrações do gene alvo, em amostras desconhecidas, baseada nos valores de Ct dados pela curva-padrão (HEID et al., 1996).

Uma curva-padrão de qPCR utiliza fragmentos de DNA dupla-fita, DNA simples fita ou cRNA, que contenham a seqüência gênica de interesse. Curvas-padrão baseadas em DNA apresentam uma maior

sensibilidade e estabilidade que curvas baseadas em RNA. No entanto, uma curva-padrão de DNA não é confiável para ser utilizada em ensaios nos quais o alvo seja RNA, devido à ausência da etapa de transcrição reversa (WONG; MENDRANO, 2005). De acordo com estas informações, neste trabalho três diferentes curvas-padrão foram avaliadas quanto a sua eficiência de amplificação, analisando-se o limite de sensibilidade de cada uma e os valores obtidos para o *slope* e R^2 .

Com a análise dos parâmetros selecionados e apresentados na Tabela 2.5, a avaliação das três curvas resultou na seleção da curva-padrão de cRNA, devido a uma maior eficiência em relação as outras curvas geradas. Foi descrito que o uso de curvas de DNA não leva em consideração a transcrição reversa do RNA, o que conduz a valores de eficiência entre 84 e 98,6% (FEY et al., 2004). Portanto, a utilização destas curvas pode subestimar a concentração inicial do gene-alvo. Os resultados demonstraram que uma curva de cRNA obtida por transcrição reversa *in vitro* pode ser utilizada com sucesso para a quantificação do número inicial de moléculas de RNA viral.

Considerando que agentes oxidantes fortes, como o cloro, atacam tanto o capsídeo viral como os ácidos nucleicos, há a possibilidade de ainda obter-se resultados positivos por métodos moleculares, mesmo após a degradação do capsídeo (NUANUALSUWAN; CLIVER, 2003). Neste contexto, dois tratamentos enzimáticos foram aplicados neste estudo para avaliar a infecciosidade viral, através de qPCR, apresentando resultados promissores, principalmente para os resultados de JCPyV, para o qual não foi possível a finalização dos ensaios de infecciosidade. Estes tratamentos enzimáticos podem diferenciar vírus inativados de vírus viáveis, com base na capacidade do seu capsídeo protéico proteger o ácido nucleico da ação de proteases e nucleases (NUANUALSUWAN; CLIVER, 2002; PECSON et al., 2009), o que facilitaria estudos de desinfecção de vírus que não são adaptados ao cultivo celular, como o HuNoV.

Embora as técnicas baseadas em qPCR forneçam dados sobre a detecção de genomas virais de forma rápida, sensível e específica em amostras ambientais, devido à persistência de genomas de vírus inativados (que ficam parcial ou totalmente intactos no ambiente), seus resultados podem superestimar a contaminação viral real nas amostras (PECSON et al., 2009).

Alguns estudos de desinfecção viral com cloro demonstram curvas de inativação com uma rápida inativação inicial, seguida por uma inativação gradual (LEE et al., 2003; PAGE et al., 2009). No entanto,

talvez mais significativa seja a atividade das espécies de cloro presentes durante o processo de desinfecção em amostras ambientais (CROMEANS et al., 2010).

Neste estudo, diferentes curvas de inativação foram observadas, sugerindo que MNV-1 é mais sensível à desinfecção com cloro, quando comparado aos HAdV2 e JCPyV. MNV-1 mostrou uma rápida inativação inicial, medida por ensaios de placa de lise em ambas as águas testadas, como apresentado nas Figuras 2.14 e 2.15. Estes resultados estão de acordo com estudos publicados (CANNON et al., 2006; BELLLOT et al. 2008, SHIN; SOBSEY, 2008, CROMEANS et al., 2010) e essa redução provavelmente reflete uma maior sensibilidade da MNV-1 ao cloro livre, do que aos compostos de cloro combinado. Embora MNV-1 tenha apresentado uma inativação rápida, o tempo necessário para a redução de $4\log_{10}$ foi superior ao tempo observado nos estudos citados, sugerindo que a existência de fatores ambientais, tais como força iônica e compostos encontrados naturalmente na água do mar, possa estar retardando o processo de desinfecção, mas não sua eficiência.

Por outro lado, HAdV2 mostrou-se mais resistente, apresentando uma redução de $2,5\log_{10}$ nos primeiros 10 min de contato, mas mantendo uma infecciosidade residual até o final de 60 min, tanto em água do mar natural (Figura 2.12), como em artificial (Figura 2.13). Isto sugere que o comportamento de HAdV2 pode seguir curvas de inativação bi ou trifásicas, com uma fase inicial rápida de inativação, seguida por uma inativação gradual, dependendo da qualidade da água (TREE et al., 2003; PAGE et al., 2009). Este tipo de curvas de inativação pode ocorrer se os microorganismos são mais resistentes à desinfecção ou se estão agregados, o que proporciona maior resistência à desinfecção do que microrganismos individualizados (TREE et al., 2003). Outra possibilidade, de acordo com Cromeans et al. (2010), é que mais de um mecanismo de inativação possa afetar o HAdV2, o qual apresenta um capsídeo mais complexo do que MNV-1 e JCPyV, sugerindo que HAdV2 esteja sendo inativado de forma parcial, mas mais rápida pela ação do cloro livre e mais lentamente por cloraminas (cloro combinado), com partículas infecciosas até o final dos ensaios.

Num estudo mais recente, Page et al. (2010), sugere que HAdV2 submetidos a tratamentos com cloro livre, mantiveram a capacidade de se ligar a receptores de células A549, apesar de serem incapazes de formar placas de lise, indicando que os mecanismos de ação do cloro podem atuar em eventos iniciais do ciclo de replicação do vírus, como a expressão de proteínas virais precoces. Nesse mesmo

trabalho, o DNA isolado de HAdV2 inativado por cloro, foi amplificado por PCR, indicando que danos do genoma não são a única causa de inativação viral.

Neste trabalho, foi observada uma redução logarítmica média de $1,5\log_{10}$ para JCPyV, em ambos os tipos de águas testados, conforme apresentado nas Figuras 2.16 e 2.17, indicando uma resistência deste vírus ao tratamento aplicado, quando comparado ao comportamento de MNV- 1 e HAdV2. Embora JCPyV tenha sido descrito como um potencial indicador de contaminação fecal humana (BOFILL-MAS et al., 2010, FUMIAN et al., 2010) dados sobre a sua inativação por cloro não foram relatados até o momento, portanto este estudo apresenta os primeiros dados sobre a estabilidade e desinfecção química destes vírus em água do mar.

2.6 CONCLUSÕES

- Os ensaios realizados permitiram o desenvolvimento de um delineamento experimental adequado para a avaliação da inativação de HAdV2, MNV-1 e JCPyV em água do mar natural e artificial. Estes experimentos mostraram que algumas condições devem ser levadas em consideração para subseqüentes estudos de inativação viral por cloro livre, tais como: tratamento prévio de todo o material de vidro para a eliminação da demanda de cloro livre; uso de uma concentração inicial de cloro livre de 2,5 mg/L; uso de estoques virais preparados em PBS; manutenção das amostras a 4°C após uma etapa de ultracentrifugação e dissolução do sedimento em PBS e diluição das amostras dos ensaios de infecciosidade para evitar a citotoxicidade;
- A seleção do conjunto de iniciadores e sonda que amplificam a região da junção ORF1/ORF2, a seleção do kit de qRT-PCR RNA *UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR* e a o uso de cRNA como curva-padrão permitiram o desenvolvimento de um protocolo de qRT-PCR para MNV-1 mais sensível e específico para a quantificação de MNV-1 em água do mar;
- Foi possível o estabelecimento de um protocolo otimizado para a avaliação da infecciosidade de MNV-1 pelo método de Placas de Lise, sendo que o tempo de 48h de incubação e o uso de uma agarose de baixo ponto de fusão foram imprescindíveis na obtenção de resultados satisfatórios;
- Os resultados obtidos nos ensaios de desinfecção em água do mar mostraram diferenças na inativação de MNV-1, HAdV2 e JCPyV: após 60 min de tratamento com cloro livre em água natural e artificial;

- Os resultados obtidos para a desinfecção de JCPyV indicaram uma pequena redução de genomas virais em 60 min de contato com cloro livre, mas não foi possível analisar a infecciosidade deste vírus devido a questões técnicas da IFA; desta forma são necessários outros estudos para inferir sobre a cinética de desinfecção de JCPyV;
- Estes resultados confirmam que HAdV é um vírus particularmente mais resistente a processos de desinfecção, que os demais vírus, e necessitaria tempos mais longos para sua inativação. Estas diferenças na cinética estão provavelmente associadas às diferentes formas de cloro disponíveis, ao tempo de contato e às características estruturais de cada um dos vírus.

REFERÊNCIAS CAPÍTULO 2

- 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. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n.2, p. 477-484. 2008.
- BAERT, L.; WOBUS, C.E.; VAN COILLIE, E., 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. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n.2, p.543-546, 2008.
- BARARDI, C. R. M.; YIP, H.; EMSLIE, K. R.; VESEY, G. SHANKER, S.R.; WILLIAMS, K. L. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 49, p. 9-18, 1998.
- BELLIOT, G.J.S.; NOEL, J.F.; LI, Y.; SETO, C.D.; HUMPHREY, T.; ANDO, R.I.; MONROE, S.S. Characterization of capsid genes, expressed in the baculovirus system, of three new genetically distinct strains of Norwalk-like viruses. **J. Clin. Micr.**, v. 39, p. 4288-4295, 2008.
- BERG, G.; SANJAGHSAZ, H.; WANGWONGWATANA, S.; KCL potentiation of the virucidal effectiveness of free chlorine at pH 9.0. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 6, p. 1571-1575, 1990.
- BLOGOSLOWSKI, W. J. Influence of water quality on shellfish culture. Marine Comitee, Ref. Shellfish Comitee, International Council for the Exploration of the sea, Statuory Meeting; p. 1-35, Gothenburg, Sweden., 1983. apud RODRICK, G.E., SCHNEIDER, K. R., Molluscan Shellfish Depuration. In: VILLABOA, A., REGUERA, B., ROMALDE, J., REIS, R. (ed). Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Santiago de Compostela, Spain, 2002, june 4-8, Consellería de Pesca y Asuntos Maritimos de Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2003.
- BOFILL-MAS, S.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CARRATALA, A.; GIRONES, R. Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage

and may represent potential environmental contaminants. **Virol J**, v. 28, n.7, p. 141, 2010.

BOFILL-MAS, S.; FORMIGA-CRUZ, M.; CLEMENTE-CASARES, P.; CALAFELL, F.; GIRONES, R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. **J Virol**, v. 75, n. 21, p. 10290-10299, 2001.

BOYD, C. E. Chlorination and water quality in aquaculture ponds. **World Aquaculture**. v. 27, n. 3, p. 41-45, 1996.

BRUCHET, A.; DUGUET, J.P. Role of oxidants and disinfectants on the removal, masking and generation of tastes and odours. **Water Sci Technol**, v. 49, n. 9, p.297-306, 2004.

CANNON, J.L.E.; PAPAFRAGKOU, G.W.; PARK, J.; OSBORNE, L.A.; JAYKUS, R.; VINJE, J. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. **J. Food Prot**, v. 69, n.11, p. 2761-2765, 2006.

CHEREMISINOFF, N.P. Handbook of Water and Wasterwater Treatment Technologies. Ed. Butterworth Heinemann, Woburn, MA, USA, 2002.

CROMEANS, T.L.; KAHLER, A.M.; HILL, V.R. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 4, p. 1028-33. 2010.

DEBORDE, M.; VON GUNTEN, U. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: a critical review. **Water Res**, v. 42, n.1-2, p.13-51, 2008

DIN, A.M.S.; RASHEED, A.A.; HAMMOUD, A.A. On the chlorination of seawater. **Desalination**, v. 129, n.1, 53-62, 2000.

DUURSMA, E.K.; PARSI, P. Persistence of total and combined chlorine in seawater. **J. Sea Res**, v. 10, n.2, p. 192-214, 1976.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1998, Water Treatment Manuals: Disinfection. Wexford, Ireland.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008, Fisheries Technical Paper. Available on: http://www.fao.org/icalog/search/result.asp?subcat_id=36>, accessed at October 28, 2009.

FEY, A.; EICHLER, S.; FLAVIER, S.; CHRISTEN, R.; HÖFLE, M.G.; GUZMÁN, C.A. Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. **Appl Environ Microbiol**, v.70, n. 6, p. 3618-23, 2004.

FUMIAN, T.M.; GUIMARÃES, F.R.; PEREIRA, B.J.; DA SILVA, M.T.; MUYLEAERT, F.F.; BOFILL-MAS, S.; GIRONÉS, R.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. **J Water Health**, v. 8, n.3, p.438-445, 2010.

HAAG, W.R. On the Disappearance of Chlorine in Seawater. **Water Res**, v.15,p.937-940, 1981.

HAVELLAR, A.H.; NIEUWSTAD, T.J. Bacteriophages and fecal bacteria as indicators of chlorination efficiency of biologically treated wastewaters. **J. Water Poll**, v. 57, p. 1084-1088, 1985.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Res** v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

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. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 9, p. 4523-4533, 2002.

HSU, C.C.; RILEY, L.K.; LIVINGSTON, R.S. Molecular Characterization of three novel murine norovirus. **Virus Genes**, v. 34, 147-155, 2007.

KRASNER, S.W.; WEINBERG, H.S.; RICHARDSON, S.D.; PASTOR, S.J.; CHINN, R.; SCLIMENTI, M.J.; ONSTAD, G.D.; THRUSTON, A.D. Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. **Environ. Sc. Techn.**, v. 40, n. 23, p.7175-7185, 2006.

LEE, C.Y.; PANICKER, G.; BEJ, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink™ NH microwell plate sandwich hybridization. **J. Microbiol. Methods**, v. 53, p. 199–209, 2003.

NUANUALSUWAN, S.; CLIVER, D.O. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. **J. Virol. Methods**, v. 104, p.217-225, 2002.

PAGE, M.A.; SHISLER, J.L.; MARIÑAS, B.J. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. **Water Res.**, v. 43, n. 11, p.2916-2926, 2009.

PAGE, M.A.; SHISLER, J.L.; MARIÑAS, B.J. Mechanistic aspects of adenovirus serotype 2 inactivation with free chlorine. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 9, p. 2946-2954, 2010.

PECSON, B.M.; MARTIN, L.V.; KOHN, T. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, U.V.-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 17, p.5544-5554, 2009.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Anal. Biochem**, v. 77, n. 12, p. 3807-3838, 2005.

RIGOTTO, C.; SINCERO, T. C.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional PCR, nested-PCR and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Res.**, v.39, n. 2-3, p. 297-304, 2005.

RODRICK, G. E., SCHNEIDER, K.R. Molluscan Shellfish Depuration. In: VILLABOIA, A., REGUERA, B., ROMALDE, J., REIS, R. (ed). Proceedings of the 4th International Conference on Molluscan Shellfish

Safety, Santiago de Compostela, Spain, 2002, june 4-8, Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos de Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2003.

SHARP, D.G.; YOUNG, D.C.; FLOYD, R.; JOHNSON, J.D. Effect of ionic environment on the inactivation of poliovirus in water by chlorine. **Appl Environ Microbiol**, v. 39, n; 3, p. 530-534, 1980.

SHIN, G.A.; SOBSEY, M.D. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. **Water Res**, v. 42, n. 17, p.4562-4568. 2008.

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A.; HAAS, C.N.; JACANGELO, J.; GERBA, C.P. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. **Appl Environ Microbiol**, 69, 3979-3985, 2003.

TREE, J.A.; ADAMS, M.R.; LEES, D.N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, n. 4, p. 2038-2043, 2003.

URAKAMI, H.; IKARASHI, K.; OKAMOTO, K.; ABE, Y.; IKARASHI, T.; KONO, T.; KONAGAYA, Y.; TANAKA, N. Chlorine sensitivity of feline calicivirus, a norovirus surrogate. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 17, p. 5679-5682, 2007.

VINJÈ J. Center of Disease Control, Atlanta, United States, personal communication, 2007

WARTON, B.; HEITZ, A.; JOLL, C.; KAGI, R. A new method for calculation of the chlorine demand of natural and treated waters. **Water Res**, v. 40, n. 15, p.2877-2884, 2006.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p.75-85, 2005.

WONG, G.T.F.; OATTS, T.J. Dissolved Organic Matter and the Dissipation of Chlorine in Estuarine Water and Seawater. **Water Res**, v. 18, n. 4, p.501-504, 1984.

CAPÍTULO 3

Estudo da Estabilidade de Adenovírus Humano tipo 2, Norovírus Murino tipo 1 e Vírus da Hepatite A em Água do Mar Natural com e sem Tratamento por Radiação Ultra-Violeta

3.1 JUSTIFICATIVA

A desinfecção por radiação U.V. despertou o interesse das empresas de tratamento de águas por ter demonstrado ser efetiva contra oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, ambos considerados resistentes ao tratamento com cloro (HIJNEN; BEERENDONK; MEDEMA, 2006). Além disso, diferentemente de desinfetantes químicos, a radiação U.V. produz subprodutos de menor toxicidade que os gerados pela cloração (HAIDER et al., 2002). Os raios U.V. são conhecidos por atuarem sobre os ácidos nucleicos, causando danos progressivos aos microrganismos, pois o principal mecanismo de ação da radiação U.V. é a quebra da estrutura de dupla-hélice do DNA (UPADHYAYA et al., 2004). Quando o microrganismo absorve uma alta dose de radiação, ocorre a morte biológica do mesmo, mas para doses menores, ocorre uma transformação fotoquímica das bases pirimídicas, produzindo ligações sucessivas entre timinas na cadeia de DNA, formando dímeros, afetando a capacidade de replicação do microrganismo, tornando-o não infeccioso (HIJNEN; BEERENDONK; MEDEMA, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que a radiação U.V. pode inativar efetivamente a maioria dos microrganismos, incluindo agentes patogênicos, como bactérias entéricas, vírus, esporos de bactérias e cistos de protozoários transmitidos através da água (DUAN et al., 2003; LINDEN et al., 2002; ZIMMER; SLAWSON, 2002; HIJNEN; BEERENDONK; MEDEMA, 2006).

A radiação ultravioleta é o método de escolha para os sistemas de depuração de moluscos bivalves em muitos países, e uma vantagem sobre os demais métodos de desinfecção de água do mar é não alterar as propriedades físico-químicas da água, não interferindo na atividade de filtração dos moluscos (FAO, 2008). As limitações ao uso de radiação U.V. em água do mar são a turbidez e sais dissolvidos na água. Esses fatores afetam a transmissão eficaz dos raios U.V. pela coluna de água, reduzindo, portanto, a ação biocida deste processo (RICHARDS et al., 2010). A preocupação é que os patógenos associados a partículas em suspensão podem ser protegidos de desinfecção por U.V., resultando em uma menor taxa de inativação do que seria esperado. No entanto, o uso de um filtro de areia, para a eliminação de sólidos grosseiros na água do mar, é indicado para diminuir a turbidez desta água (RODRICK; SCHNEIDER, 2003).

O efeito reconhecido de parâmetros ambientais sobre a estabilidade e decaimento viral no ambiente marinho varia muito de acordo com o tipo de vírus estudado. A temperatura e radiação U.V. são as que mais afetam a estabilidade das partículas virais em água do mar, enquanto a salinidade foi considerada como um fator secundário na inativação viral (BITTON, 1980; 1999; LE GUYADER et al., 1994; GANTZER et al., 1998). A salinidade, no entanto, foi indicada como fator importante no aumento da agregação de partículas virais, contribuindo para a redução do título viral em amostras de água do mar (GERBA; SCAIBERGER, 1975). De acordo com Wets et al. (2004), geralmente ocorre um decaimento de 99,9% das partículas virais de Poliovirus, em água do mar, entre 2 e 5 dias, a temperaturas de 22 a 30°C.

Sinton et al. (2002) encontraram que as taxas de inativação de bacteriófagos pela luz solar é 10 vezes maior do que as suas taxas de inativação, quando não há incidência de radiação solar. Isto é consistente com o observado por Johnson et al. (1997), que observou 90% e 99,9% de inativação de Poliovirus em água do mar após 24h de incubação no escuro e exposição ao sol, respectivamente. Apesar de sua sensibilidade à radiação U.V., os vírus são mais resistentes do que muitos outros agentes patogênicos e bactérias indicadoras (FUJIOKA et al., 2002). Além disso, os vírus de DNA ou RNA fita dupla são mais estáveis quando expostos à radiação U.V. (GERBA et al., 2002).

No entanto, em água do mar, pouco ainda é conhecido sobre a desinfecção e estabilidade de patógenos entéricos virais. Além dos fatores ambientais citados anteriormente, outros devem ser levados em consideração em estudos de estabilidade viral no ambiente marinho: a associação das partículas virais em material orgânico particulado, a concentração de nutrientes e presença de microorganismos predadores (TANI et al., 1995; LIPP et al., 2001; FONG; LIPP, 2005). Estes fatores podem influenciar na dinâmica de desinfecção viral neste tipo de água, sendo necessários maiores estudos nesta área.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo Geral

Verificar a estabilidade de Adenovírus Humano tipo 2 (HAdV2), Vírus da Hepatite A (HAV) e Norovírus Murino tipo 1 (MNV-1), em água do mar, numa depuradora de moluscos bivalves na presença e ausência de radiação Ultravioleta (U.V.).

3.2.2 Objetivos Específicos

- Produzir e titular suspensões-estoque dos vírus da hepatite A (cepa HM 175), Adenovírus Humano (cepa HAdV2) e Norovirus Murino 1 em células FRhK-4, Hep-2 e RAW 264.7, respectivamente;
- Padronizar as metodologias de ICC-RT-PCR (RT-PCR Integrado a Cultura Celular) e Citometria de Fluxo, para a análise da infecciosidade de HAdV2;
- Avaliar a desinfecção viral em água do mar natural, em um sistema de depuração de moluscos bivalves, utilizando radiação U.V. para tratamento da água do mar recirculada;
- Avaliar a estabilidade viral em água do mar natural não tratada por radiação ultravioleta;
- Concentrar os vírus presentes nas amostras de água do mar através do uso da metodologia da floculação orgânica e extrair os ácidos nucléicos totais das mesmas para a quantificação de genomas virais através de qPCR e qRT-PCR;
- Avaliar a infecciosidade de HAdV2 e MNV-1 nas amostras de água do mar, utilizando técnicas previamente estabelecidas;

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Delineamento Experimental

Os experimentos e resultados apresentados neste capítulo foram realizados no período compreendido entre os meses de março e setembro de 2010 e divididos em duas etapas: estabelecimento de condições experimentais (padronização de técnicas) e aplicação destas condições em ensaios de desinfecção de água do mar, por radiação U.V., em um sistema comercial de depuração de moluscos bivalves. A Figura 3.1 apresenta o fluxograma das atividades realizadas neste período.

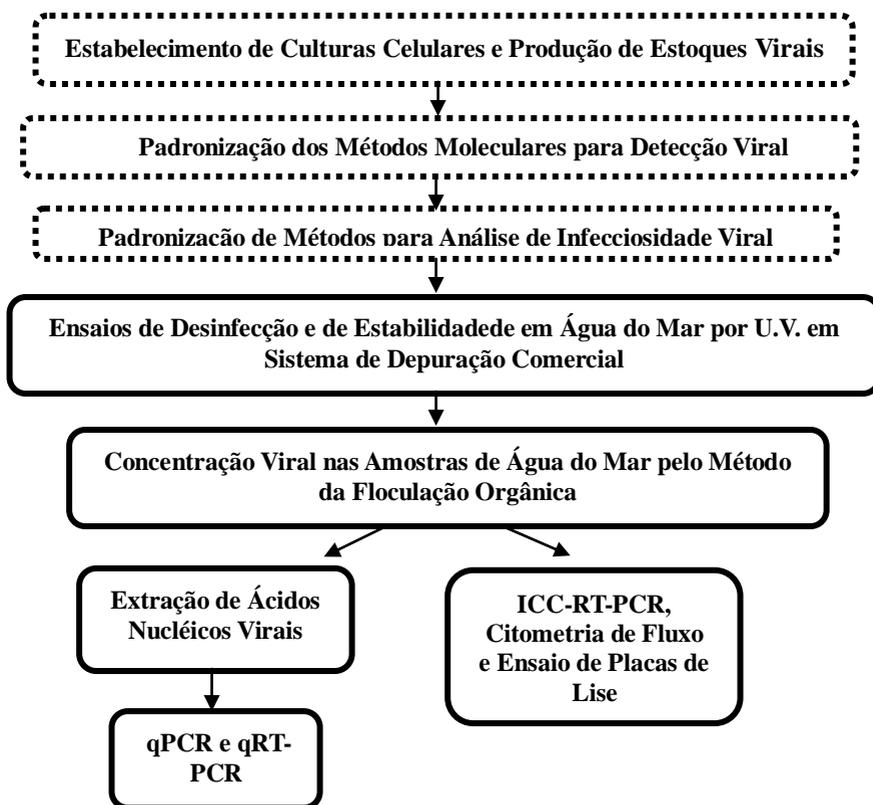


Figura 3.1: Fluxograma representativo das etapas experimentais seguidas para os experimentos de depuração viral. Linha tracejada: etapas de padronização dos métodos; Linha inteira: etapas de aplicação dos métodos.

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

3.3.2 Depuradoras e Água do Mar

O sistema de depuração comercial, utilizado no presente trabalho, foi projetado pela empresa de consultoria em Aquicultura *Blue Water Aquaculture* e construído graças a recursos do projeto CNPq/MAPA/2008. O mesmo foi alocado no Laboratório de Virologia Aplicada.

Este sistema foi planejado em sistema fechado de circulação de água (1.800l/h), composto por um tanque plástico com capacidade para 300 l de água do mar, uma bomba de recirculação da água e um sistema de radiação Ultra Violeta (36W, ATMAN II, baixa pressão, luz monocromática 254nm, intensidade estimada em $12\text{mJ}/\text{cm}^2$ por passagem pela luz U.V.) (Figura 3.2). O fluxo de água deste tanque permite que o volume de 300l de água do mar entre em contato com a luz U.V. 6X a cada hora, desta forma, a dose de U.V. aplicada é acumulada em $72\text{mJ}/\text{cm}^2$. O tanque da depuradora comporta 50 dúzias de ostras, distribuídas em quatro caixas plásticas vazadas, apoiadas em um suporte inferior, destinado a evitar o contato direto com material excretado pelos moluscos.

A água do mar utilizada neste estudo foi proveniente da Barra da Lagoa, Florianópolis. Previamente ao uso, esta água foi filtrada em filtro de areia para remoção de sólidos em suspensão.

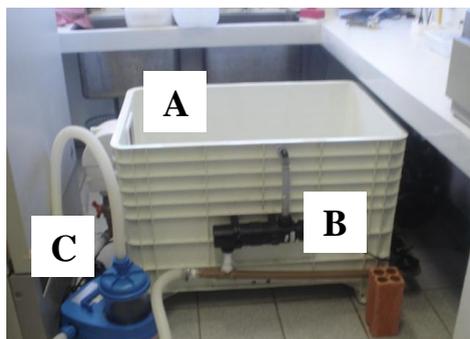


Figura 3.2: Sistema de Depuração. **A:** Tanque Plástico com capacidade para 300L de água e 50 dúzias de ostras. **B:** Lâmpada de Ultra Violeta (36W); **C:** Bomba de recirculação de água.

3.3.3 Ensaio de Desinfecção e Estabilidade Viral em Água do Mar

Os estudos de desinfecção e estabilidade viral em água do mar sob tratamento, ou não, com radiação U.V., foram realizados em triplicata (três semanas distintas), e para cada ensaio foram utilizados dois tanques de depuração. Cada um destes tanques foi preenchido com 300L de água do mar previamente filtrada e semeado com os três vírus selecionados. Um destes tanques foi conectado ao sistema de radiação U.V. de 36W, e o outro não foi submetido a este tratamento.

Anteriormente à adição dos vírus na água nos tanques de depuração, 1l de água do mar foi semeado simultaneamente com os três vírus, e este foi utilizado como inóculo viral para a semeadura dos 299L de água do mar restantes (já contidos nos tanques de depuração), totalizando 300L. Após esta diluição, a concentração final de cada um dos vírus foi de aproximadamente 2×10^1 FFU, 2×10^3 PFU e 3×10^3 FFU por ml de água do mar, de HAV, MNV e HAdV2, respectivamente. Deste inoculo, foi retirado 1ml para posterior análise viral, o qual foi considerado como tempo 0h.

A água do mar contida nestes tanques foi submetida a um processo de recirculação por um período de 120h. A cada 24h, foram realizadas coletas de 1l de água do mar, totalizando 5 amostragens (24, 48, 72, 96 e 120h). Imediatamente após cada coleta, as amostras foram concentradas pelo método da floculação orgânica, descrito no item 3.3.4. A temperatura e o pH foram monitorados a cada período de amostragem.

Outro ensaio de estabilidade viral também foi realizado, em escala menor, em água do mar semeada com HAdV2 e MNV-1 em concentrações mais elevadas. O ensaio consistiu em um recipiente contendo 10L de água do mar semeado com as concentrações finais de 10^8 FFU e 10^7 PFU por ml de água do mar, de HAdV2 e MNV-1, respectivamente. Esta água foi mantida sob agitação constante, por um período de 120h. A cada 24h foram realizadas coletas de 1l de água, o qual foi submetido imediatamente ao processo de concentração (item 3.3.4). A semeadura destes 10l foi realizada da mesma forma como descrita acima.

3.3.4 Concentração Viral em Amostras de Água do Mar pelo Método da Floculação Orgânica

A metodologia padronizada no presente trabalho baseou-se no método descrito por Cálgua et al. (2008). Esta metodologia utiliza apenas um passo na concentração das amostras, economizando tempo, reagentes e evitando a manipulação excessiva das mesmas, o que pode provocar possíveis perdas nas recuperações virais.

Após a coleta de 1L de água do mar, em cada um dos tempos de amostragem, as mesmas foram acidificadas com HCl 0,1N a pH 3,5. Em seguida, adicionou-se às amostras 10ml de uma solução de leite desnatado acidificado (pH 3,5) preparado em água do mar artificial (*Pre-flocculated Skimmed Milk PSM*, 0,1%, Sigma). Em pH ácido, esta solução forma flocos, nos quais as partículas virais presentes irão agregar-se, promovendo assim, a concentração viral. Após a acidificação das amostras, estas foram submetidas à agitação por um período de 8h, seguida de 8h de repouso, para a formação de um precipitado (Figura 3.3).

Ao final destas 16h, o sobrenadante foi aspirado (aproximadamente 900ml), restando o precipitado de 100ml (Figura 3.3) o qual foi centrifugado a $7.000\times g$, a 4°C , por 30 min. O sobrenadante após esta centrifugação foi descartado e o precipitado final (concentrado viral) foi solubilizado em 1ml de tampão fosfato (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,2M 1:2v/v) com o objetivo de neutralizar o pH. O concentrado final foi armazenado em freezer -80°C para posteriores análises moleculares e de infecciosidade viral.

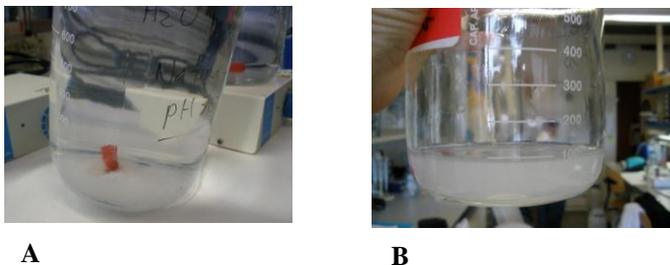


Figura 3.3: Formação do precipitado pelo método da floculação orgânica. **A**: flocos obtidos após 8h de agitação seguida de 8h de repouso; **B**: concentração da amostra em um volume de 100ml.

VÍRUS E CÉLULAS

3.3.5 Vírus e Células

A produção de estoques virais e o cultivo das respectivas linhagens celulares foram realizados de acordo com os itens 2.4.7 (MNV-1 e células RAW 264.7), 2.4.8 (HAdV5 e células A549) e 1.3.2 e 1.3.3 (HAV e células FRhK-4).

A titulação de HAdV2 e HAV foi realizada por IFA (item 1.3.3) e de MNV-1, por ensaios de placa de lise (item 2.3.12).

ANÁLISES DE INFECCIOSIDADE VIRAL

3.3.6 ICC- RT-PCR para HAdV2

A padronização desta técnica foi realizada utilizando suspensões virais de HAdV2 inativados por calor (inativação em autoclave, 20 min/121°C/1 atm) e suspensões virais de HAdV2 viáveis, ambas na concentração de $6,5 \times 10^9$ FFU/ml

Estas suspensões foram diluídas seriadamente em meio de manutenção, e 200 µl de cada uma das diluições 10^{-2} ($6,5 \times 10^7$ FFU/ml) e 10^{-4} ($6,5 \times 10^5$ FFU/ml) foram inoculados em monocamadas confluentes de células A549, em placas de 24 poços, preparadas 24h antes de cada ensaio (2×10^5 células/ml). Após um período de 1h, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, para a adsorção viral, o inóculo viral foi aspirado e substituído por meio de manutenção (1ml/poço). As placas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂, por um período de 48h.

Posteriormente a este período de incubação, o meio de manutenção foi removido e as células foram submetidas a extração de ácidos nucleicos utilizando-se o reagente Trizol[®], de acordo com instruções do fabricante, para a obtenção do mRNA viral. Para eliminar o DNA contaminante, as amostras foram tratadas com DNase, antes de serem submetidas a amplificação gênica. Este etapa consistiu no tratamento de 1µg do RNA extraído com a enzima DNase I (QIAGEN, Valencia, CA, USA n), utilizando-se 4U desta enzima, adicionada ao tampão de reação na concentração final de 1X (provido juntamente com a enzima), 20U de inibidor de RNase (*RNase Out*, InvitrogenTM, CA, USA) e água livre de RNase, para um volume final de 20 µl. Esta mistura de reativos foi incubada por 15 min a TA. Posteriormente, 2,5 mM de EDTA foram adicionados para interromper a atividade da enzima e esta foi degradada por tratamento a 65°C/10 min. O material genético resultante foi imediatamente submetido a uma transcrição reversa, de acordo com o descrito no item 1.3.9.1.

Para a análise da infecciosidade de HAdV2 presentes nas amostras de desinfecção por U.V., estas foram previamente tratadas com antibiótico/antifúngico (penicilina G 100U/ml; estreptomicina 100µg/ml e anfotericina B 0,25µg/ml) e diluídas a diluições não citotóxicas (item 2.4.9). O procedimento para a infecção de células A549 e posterior isolamento do RNA foi realizado de acordo com a metodologia descrita acima para a padronização desta técnica.

Após a transcrição reversa, a amplificação gênica foi realizada por Nested-PCR, conforme descrito no item 1.3.9.1. Foram também incluídas amostras controles que não foram submetidas à etapa de transcrição reversa, a fim de confirmar a ausência de DNA viral nas amostras.

3.3.7 Citometria de Fluxo para HAdV2

Para a padronização deste método, inicialmente foram realizados testes para averiguar as melhores condições para a reação (número de lavagens após a incubação com anticorpos, diluições dos anticorpos primário e secundário e limite de sensibilidade para a aplicação em amostras ambientais). Para todos estes ensaios, foram utilizadas células A549 em placas de 24 poços, preparadas 24h antes de cada ensaio, na concentração de 2×10^5 células/poço (conforme item 1.3.10) e estoques virais de HAdV2 previamente titulados por IFA. As condições experimentais foram realizadas de acordo com Barardi et al. (1998), com algumas modificações.

Primeiramente, foi avaliado o número de lavagens após a incubação com os anticorpos primário e secundário, utilizando-se somente controles celulares, sem a presença de vírus. Esta etapa teve por objetivo, analisar qual o número de lavagens com solução de bloqueio (BSA 1%, Tween 20 0,05%, EDTA 5 mM, preparada em PBS 1X) seria adequado para eliminar a fluorescência de fundo (*Background*). As condições de incubação dos anticorpos foram as mesmas utilizadas para o ensaio de IFA (item 2.3.10).

Para a análise no citômetro de fluxo, as células foram retiradas da placa por tratamento com 150µl de tripsina/poço; após este tratamento, cada amostra foi transferida a um microtubo de 1,7ml, centrifugada a 1500xg/3 min, e ressuspensas em 200µl de solução de bloqueio. Posteriormente, as células foram fixadas com 800µl de metanol gelado, por 5 min e centrifugadas novamente, para descartar o metanol. As células foram ressuspensas em 500µl de solução de bloqueio, e mantidas sob agitação, a temperatura ambiente, por 30 min.

Após o período de bloqueio, as células foram novamente centrifugadas, ressuspendidas em 100µl de solução de bloqueio contendo anticorpo primário diluído 1:200 e mantidas a 37°C por 60 min sob agitação.

Após esta incubação, foram iniciadas as lavagens com 300µl de solução de bloqueio, por 5 min cada vez, sob agitação. Foram feitas análises com uma, duas e três lavagens. Depois de cada lavagem, as células sempre foram centrifugadas para descartar a solução anterior. Posteriormente, foi realizada a incubação com 100µl do anticorpo secundário conjugado a FITC, diluído 1:100 em solução de bloqueio, durante 15 min, sob agitação. Esta incubação foi seguida de lavagens com solução de bloqueio, da mesma forma descrita anteriormente.

Ao final, as células foram centrifugadas novamente, solubilizadas em 1ml de solução de bloqueio e transferidas para tubos plásticos próprios para citometria de fluxo (BD Biosciences, San Jose, CA). A leitura foi realizada em citômetro BD FACSCanto II *Flow Cytometer* (BD Biosciences, San Jose, CA), analisando-se 10.000 eventos (células).

Após o estabelecimento do melhor número de lavagens com solução de bloqueio, foram realizados ensaios com concentrações conhecidas de HAdV2 (10^4 e 10^6 FFU/poço, incubadas por um período de infecção de 72h) para a otimização da diluição dos anticorpos primário (1:200;1:400; 1:800 e 1:100) e secundário (1:100;1:200 e 1:400). Além disso, foram realizados ensaios para avaliação do limite de sensibilidade desta técnica, utilizando-se HAdV2, diluído seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} , em meio para manutenção e em água do mar floculada (de acordo com o método descrito no item 3.3.4).

Uma vez estabelecidas as melhores condições para os ensaios, as amostras de água do mar foram tratadas com antibiótico/antifúngico (penicilina G 100U/ml; estreptomicina 100µg/ml e anfotericina B 0,25µg/mL), diluídas a diluições não citotóxicas (item 2.4.10) e aplicadas em células A549, para a avaliação da infecciosidade de HAdV2.

3.3.8 Ensaio de Placa de Lise para MNV-1

A análise da infecciosidade de MNV-1 recuperados das amostras de água do mar dos ensaios de desinfecção e estabilidade viral foi realizada de acordo com o método descrito no item 2.4.11. As amostras foram diluídas previamente a diluições não citotóxicas (item 2.3.10) e aplicadas, em duplicata, em cultivo celular de células RAW 264.7.

Foi realizado um ensaio para avaliação do limite de sensibilidade desta técnica. Utilizou-se um estoque viral de MNV-1, diluído

seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} , em meio de manutenção e em água do mar floculada (de acordo com o método descrito no item 3.3.4), para averiguar se os componentes presentes na água do mar poderiam inibir a infecção viral e consequentemente, a formação de placas de lise.

ANÁLISES MOLECULARES

3.3.9 qPCR para HAV

Para a produção da curvas-padrão aplicada na quantificação por qRT-PCR para HAV, foi utilizado o plasmídeo *pGEM®-T Easy Vector* (Promega, Madison, USA) contendo a região 5'UTR (*Untranslated Region*) do genoma de HAV (gentilmente cedido pela Dr. Rosina Gironés Llop, do Departamento de Microbiologia, da Universidade da Barcelona). Bactérias competentes *Escherichia coli* JM109 (Promega, Madison, WI, USA) foram transformadas com o plasmídeo, e este foi purificado das bactérias com o uso do kit *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, e o DNA obtido, foi quantificado por espectrofotometria.

Para reduzir a possibilidade de contaminação por DNA plasmidial nos laboratórios, o plasmídeo foi linearizado com a enzima de restrição BSAA-1 (Promega, Madison, WI), de acordo com as instruções do fabricante. O produto da reação enzimática foi purificado e novamente quantificado; diluições seriadas na base 10 foram preparadas em tampão TE, variando de 10^7 CG/10 μ l a 10^{-2} CG/10 μ l. Estas diluições foram alíquotadas e armazenadas a -80°C para uso posterior.

Para a quantificação de HAV, utilizou-se o kit *RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), em um volume final de reação de 25 μ l. Foram utilizados os iniciadores HAV-F (5'-GGTAGGCTACGGGTGAAAC-3') e HAV-R (5'-GCGGATATTGGTGAGTTGTT-3'), na concentração final de 250 nM cada, com a sonda: HAV-P (5'-CTTAGGCTAATACTTTATGAAGAGATGC-3'), na concentração final de 100nM (JOTHIKUMAR et al., 2005).

A quantificação foi realizada com o uso do termociclador utilizando o termociclador *StepOne™ Plus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, CA, USA), com as seguintes condições de amplificação: transcrição reversa por 30 min a 50°C seguida por 15 min a 95°C (ativação da enzima) e 45 ciclos de amplificação (10s a 95°C , 20s a 55°C e 15s a 72°C). Para evitar inibição da amplificação e aumentar a sensibilidade da reação, as amostras sempre foram

analisadas em duplicata, e em diluições 1:10 dos ácidos nucléicos.

3.3.10 qPCR para HAdV2 e qRT-PCR para MNV-1

A preparação das curvas-padrão utilizadas para a quantificação de HAdV2 e MNV-1 estão descritas nos itens Item 2.3.13.1 e 2.3.14.2, respectivamente.

As condições de amplificação, iniciadores e sonda foram os descritos nos itens 2.3.13.2 (para HAdV2) e 2.3.14.2 (para MNV-1).

Da mesma forma descrita no item anterior, as amostras sempre foram analisadas em duplicatas e em diluições 1:10 dos ácidos nucléicos.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Padronização do ICC RT-PCR para HAdV2

Os resultados obtidos com a padronização desta técnica, utilizando-se HAdV2 viáveis e inativados por calor úmido, demonstraram que somente o DNA transcrito a partir do RNA de partículas virais viáveis foi amplificado. A eficiência do método foi comprovada pela ausência de amplificação gênica nas amostras inativadas e nos controles não submetidos à transcrição reversa (Figura 3.4).

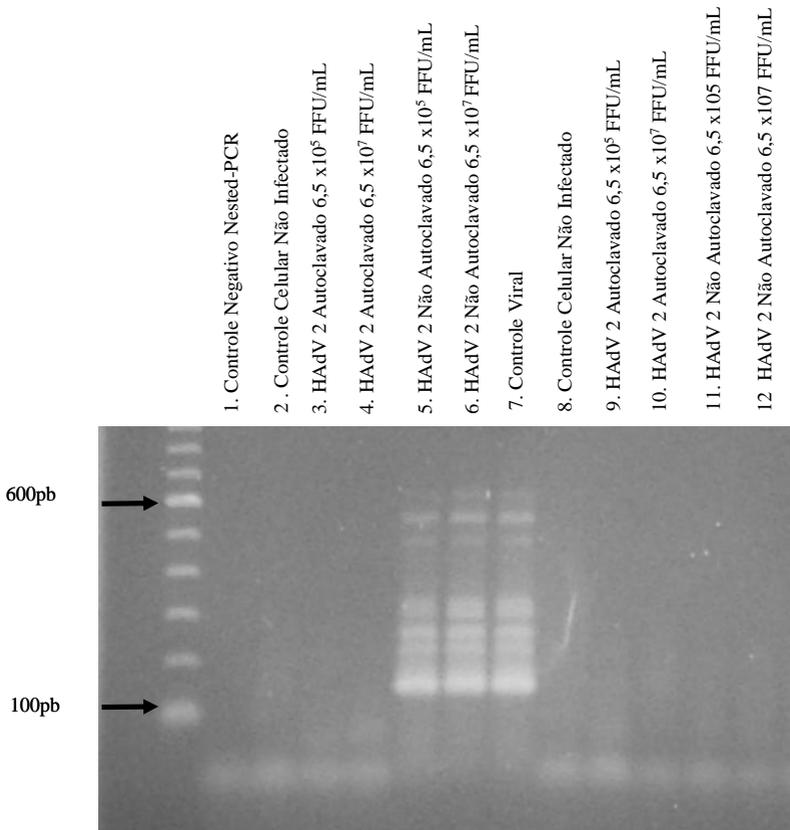


Figura 3.4: Eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos de nested-PCR referentes à avaliação da viabilidade viral de HAdV2 por ICC- RT-PCR. 1-7 e 14: Amostras submetidas a transcrição reversa; 8-13: Amostras submetidas a transcrição reversa.

3.4.2 Sensibilidade do Ensaio de Placa de Lise para MNV-1

Para obter estes resultados, uma suspensão viral de MNV-1 foi diluída seriadamente (10^{-1} a 10^{-7}) utilizando-se como diluente água do mar natural floculada em concentrações não citotóxicas; estas diluições foram submetidas ao ensaio de placas de lise, realizado em duplicata. Paralelamente, esta mesma suspensão viral foi diluída e titulada da mesma forma, no entanto, utilizou-se como diluente o meio de cultivo

MEM 1X. Como resultado, não foram observadas diferenças significativas nos valores obtidos para o título viral de MNV-1 (5×10^6 PFU/ml em água do mar e 10^7 PFU/ml em meio de cultivo MEM 1X), indicando a não interferência dos componentes da água do mar sobre a infecção viral. A figura 3.5 apresenta o resultado da quantificação de placas de lise em diferentes diluições, as quais apresentaram um número de placas possível de ser quantificado.

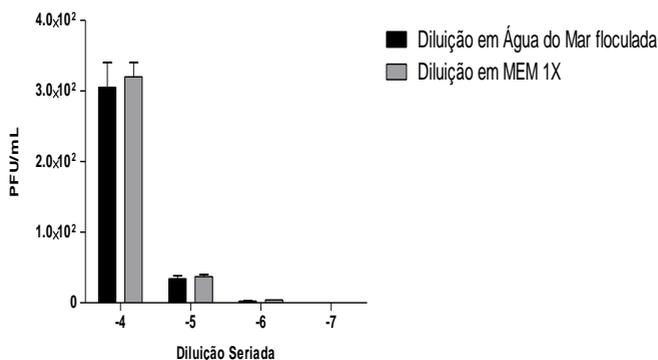


Figura 3.5: Comparação do número de placas de lise de MNV-1 quantificadas em distintas diluições seriadas de base 10, utilizando dois diferentes diluentes.

3.4.3 Padronização da Citometria de Fluxo para HAdV2

De acordo com os testes realizados para a otimização do número de lavagens após a incubação com os anticorpos primário e secundário, foi observado que 3 lavagens com solução de bloqueio foram necessárias para eliminar 99% da fluorescência de fundo (*Background*). Os testes com diferentes diluições dos anticorpos resultaram na padronização de uma diluição 1:400 do anticorpo primário, e 1:100 para o anticorpo secundário, em solução de bloqueio. Estas condições, portanto, foram utilizadas em todos os ensaios posteriores de citometria de fluxo.

Quando foi comparada a titulação de um estoque de HAdV2 diluindo-se este seriadamente (de 10^{-1} a 10^{-7}) em meio de manutenção e, paralelamente, em água do mar floculada, foi observada uma redução de 30% na sensibilidade da técnica, quando a diluição foi realizada em água do mar. Este resultado indica uma provável inibição da composição da água do mar, na reação de imunofluorescência, realizada no

citômetro de fluxo. A Figura 3.6 apresenta a comparação do número de células positivas para HAdV2 nas distintas matrizes avaliadas.

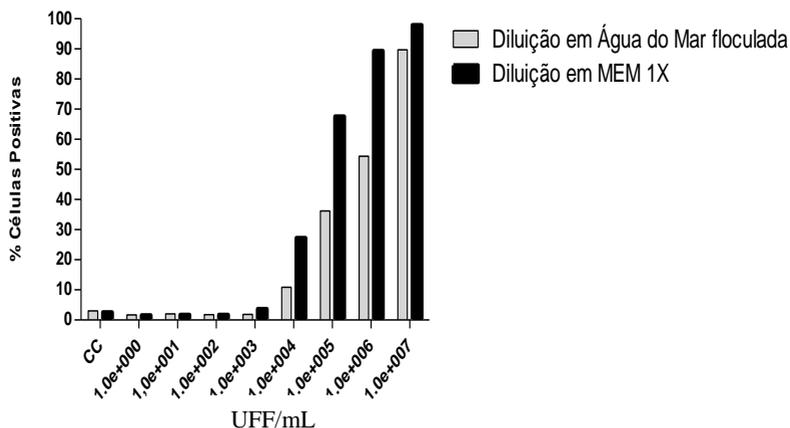


Figura 3.6: Comparação da porcentagem de células positivas por citometria de fluxo para quantificação de HAdV2, em distintas diluições seriadas de base 10, utilizando dois diferentes diluentes. UFF: Unidades Formadoras de Fluorescência; CC: Controle Celular.

3.4.3 Ensaios de Desinfecção de água do mar por Radiação U.V.

Os dados de desinfecção referentes à aos valores absolutos de concentração viral em cada amostra, por métodos moleculares e de cultivo celular, estão apresentados na forma de Figuras construídas com o programa *GraphPad Prism* 5.0. As análises estatísticas serão posteriormente realizadas para a submissão do manuscrito para publicação.

Para a avaliação do decaimento logarítmico, em cada experimento, a concentração viral nas amostras controle (sem tratamento com radiação U.V.), no primeiro tempo analisado ($t=0h$), foi expressa como N_0 . A concentração viral nas amostras tratadas com radiação U.V., em cada tempo de coleta (t), foi denominada de N_t . A redução viral em cada tempo “ t ” foi computada como: concentração viral em cada tempo t (N_t)/concentração viral inicial (N_0). Os valores obtidos foram então transformados para Log_{10} ($\text{Log}_{10}(N_t/N_0)$) (THUSTON-ENRIQUEZ et al., 2003). Considerando que também foi detectada uma redução no título viral nas amostras que não foram

submetidas ao tratamento com U.V., esta mesma avaliação de redução logarítmica foi realizada.

3.4.3.1 Parâmetros Avaliados durante os experimentos: temperatura e pH médios

A temperatura e o pH da água do mar utilizada em sistemas de depuração foram constantemente monitoradas, para garantir condições adequadas para as atividades fisiológicas dos moluscos (FAO, 2008). Em cada um dos experimentos realizados, os valores de temperatura e pH foram coletados. A Tabela 3.1 apresenta os dados médios destes parâmetros coletados nos três ensaios.

Tabela 3.1: Valores de Temperatura e pH da água do mar durante os ensaios de desinfecção viral por radiação U.V. Os resultados estão apresentados como a média de três experimentos independentes.

Tratamento Aplicado	Tempo (h)	Temperatura Média	pH Médio
Com Radiação U.V.	24	22,7	7,7
	48	23,8	7,7
	72	24,0	7,8
	96	24,2	7,7
	120	24,2	7,8
Sem Radiação U.V.	24	23,7	7,6
	48	25,8	7,5
	72	26,3	7,3
	96	26,3	7,0
	120	26,5	7,4

3.4.3.2 Cinética de Desinfecção de HAdV2

Baseado nos resultados de quantificação de cópias genômicas por qPCR, HAdV2 apresentou uma redução logarítmica de $2,4\log_{10}$ nas primeiras 24h de tratamento com radiação U.V. Ao final de 120h, foi observada uma redução de mais de $5\log_{10}$, indicando uma remoção de 99,99% da concentração inicial de genomas de HAdV2 (Tabela 3.3 e Figura 3.7).

As amostras de água do tanque controle, as quais não foram submetidas ao tratamento com U.V., da mesma forma, apresentaram uma redução no número de genomas quantificados em cada um dos tempos. Em 24h de recirculação da água, foi detectada uma redução de

0,25log₁₀, e ao final do período de 120h, o número de genomas virais reduziu 2,5 log₁₀ em relação à quantificação inicial. Estes resultados provavelmente estão relacionados á heterogeneidade da composição da água do mar, a qual pode interferir no padrão de agregação das partículas virais em suspensão ou degradando estas partículas em cada um dos tempos de amostragem.

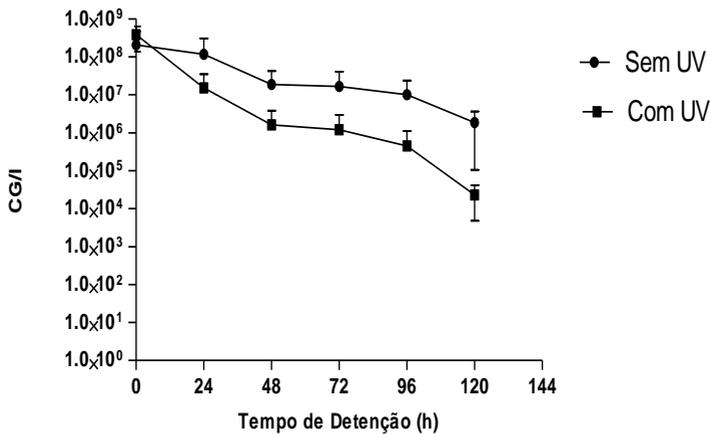


Figura 3.7 Curva de decaimento de genomas de HAdV2 em água do mar tratada e não tratada com radiação U.V. (36W). Os resultados apresentados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes, avaliados por qPCR.

A infecciosidade de HAdV2 foi avaliada por dois diferentes métodos. Com a aplicação do ICC RT-PCR, foi possível observar que este vírus manteve-se infeccioso apenas até 72h de recirculação da água (Tabela 3.2), tanto para amostras tratadas como não tratadas por radiação U.V., apesar da detecção de genomas virais em amostras coletadas em 120h.

Surpreendentemente, a análise por citometria de fluxo, não apresentou resultados satisfatórios para a detecção de HAdV2 infecciosos. A porcentagem de células infectadas nas amostras tratadas e não tratadas com U.V., até o período de 72h de recirculação da água, não

apresentaram diferença significativa, quando comparadas ao controle celular (Figura 3.8). Desta forma, os demais tempos não foram analisados.

Tabela 3.2: Resultados obtidos por ICC-RT PCR para HAdV2 em amostras de água do mar tratadas e não tratadas com radiação U.V., por um período de 120h. Os resultados estão indicados como o número de réplicas com resultados positivos na RT-PCR (n=3).

Tratamento Aplicado	Tempo (h)	ICC RT-PCR
Com Radiação U.V.	24	1/3
	48	0/3
	72	1/3
	96	0/3
	120	0/3
Sem Radiação U.V.	24	3/3
	48	2/3
	72	1/3
	96	0/3
	120	0/3

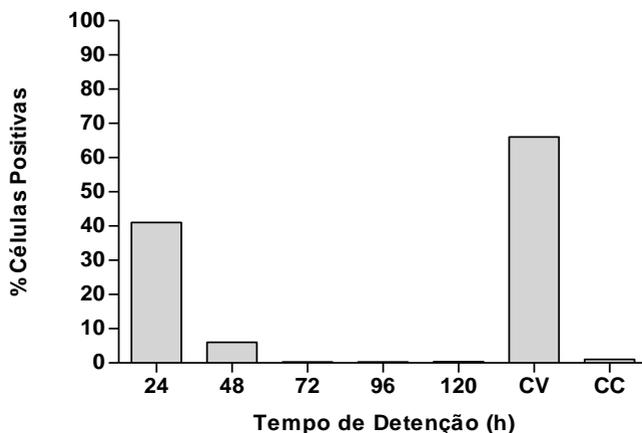


Figura 3.8: Citometria de Fluxo para análise da infecciosidade de HAdV2 em amostras de água do mar tratadas e não tratadas com radiação U.V., por um período de 72h. CC: Controle celular; CV: Controle Viral, infecção com 10^5 FFU de HAdV2.

3.4.3.3 Cinética de Desinfecção de MNV-1

Baseado nos resultados de qRT-PCR, MNV-1 apresentou uma redução logarítmica de $3,1\log_{10}$ nas primeiras 24h de tratamento com radiação U.V. Ao final de 120h, não foram mais detectados genomas virais, já que em 72h de tratamento, foi observada uma redução de $4,7\log_{10}$, indicando uma remoção de 99,99% da concentração inicial de MNV-1 (Tabela 3.3 e Figura 3.9).

As amostras de água não submetidas à radiação U.V., da mesma forma como foi observado para HAdV2, apresentaram uma instabilidade viral em água do mar. Houve uma redução no número de genomas quantificados em cada um dos tempos. Em 24h e ao final de 120h de recirculação de água nos tanques, reduções de $2\log_{10}$ e $3\log_{10}$ foram detectadas em relação à quantificação inicial.

O ensaio de placas de lise foi aplicado para a análise de MNV-1 viáveis nas amostras de água do mar. Como somente até 72h de tratamento com radiação U.V. foi observada a presença de genomas virais, este ensaio de viabilidade concentrou-se os tempos de 24, 48 e 72h. Foi possível observar a presença de MNV-1 em todos os tempos analisados (Figura 3.10), apesar de uma grande redução no número de

partículas virais quando comparadas ao número de cópias genômicas, tanto para amostras tratadas como não tratadas por radiação U.V.

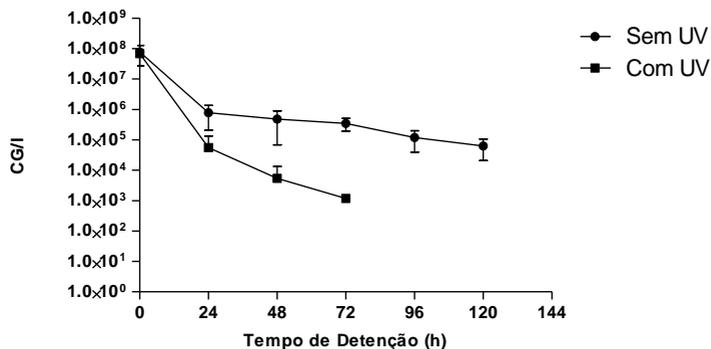


Figura 3.9 Curva de decaimento de genomas de MNV em água do mar tratada e não tratada com radiação U.V. (36W). Os resultados apresentados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes, avaliados por qRT-PCR.

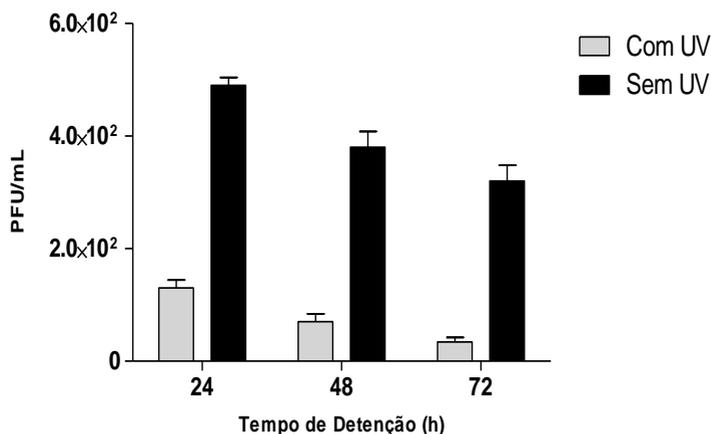


Figura 3.10: Ensaio de Placas de Lise para análise da infecciosidade de MNV-1 em amostras de água do mar tratadas e não tratadas com radiação U.V., por um período de 72h. Os resultados apresentados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes

3.4.3.4 Cinética de Desinfecção de HAV

Devido a problemas apresentados no cultivo celular de FRhK-4, não foram realizadas análises de infecciosidade para HAV. Desta forma, os resultados apresentados são somente referentes à quantificação de genomas deste vírus nas amostras de água do mar, por qRT-PCR.

Os resultados obtidos indicaram a presença de genomas de HAV em todos os tempos amostrados, com uma redução logarítmica de $2,1\log_{10}$ nas primeiras 24h de tratamento com radiação U.V. Ao final de 120h, foi detectada uma redução de $3,5\log_{10}$, em relação à concentração inicialmente detectada (Tabela 3.3 e Figura 3.11). Foi observada, como para os demais vírus analisados, uma redução na quantificação de genomas, nas amostras não submetidas ao tratamento com radiação U.V. Em 24h de recirculação da água, o número de genomas apresentou uma redução de $1,5\log_{10}$, no entanto, essa redução não sofreu variação significativa ao final de 120h, no qual foi observada uma redução de $1.7\log_{10}$ em cada um dos tempos de análise

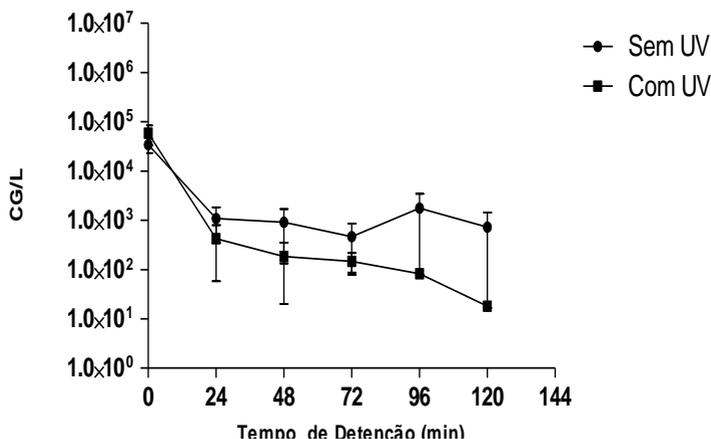


Figura 3.11 Curva de decaimento de genomas de HAV em água do mar tratada e não tratada com radiação U.V. (36W). Os resultados apresentados representam a média e desvio padrão de três experimentos independentes, avaliados por qRT-PCR.

Tabela 3.3: Sumário dos valores de redução logaritmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para HAdV2, HAV e MNV-1 em água do mar natural com e sem tratamento com radiação U.V., por um período de 120h. Os resultados apresentados representam a média de três experimentos independentes, avaliados por qPCR e qRT-PCR.

Tempo (h)	qPCR para HAdV2	qRT-PCR para HAV	qRT-PCR para MNV- 1
Com Radiação U.V.			
0	0,00	0,00	0,00
24	-2,40	-2,14	-3,10
48	-3,40	-2,50	-4,10
72	-3,54	-2,60	-4,750
96	-3,84	-2,86	-
120	-5,24	-3,52	-
Sem Radiação U.V.			
0	0,00	0,00	0,00
24	-0,25	-1,50	-1,99
48	-1,05	-1,58	-2,20
72	-1,10	-1,86	-2,35
96	-1,30	-1,29	-2,80
120	-2,05	-1,68	-3,10

3.4.4 Ensaios de Estabilidade

Com a finalidade de confirmar os resultados obtidos nas amostras de água do mar não submetidas ao tratamento com radiação U.V., foi realizado um experimento em escala menor (10L de água do mar), com concentrações mais elevadas de HAdV2 e MNV-1, por um período de 120h. Estas amostras foram quantificadas por qPCR e qRT-PCR, e analisadas por citometria de fluxo (HAdV2) e ensaios de placas de lise (MNV-1), para avaliação da infecciosidade de cada um dos vírus.

Como resultado, foi confirmado que ambos os vírus apresentam uma instabilidade em água do mar, apresentando redução significativas em suas concentrações de cópias genômicas a partir de 48h em contato com água do mar (Tabela 3.4). HAdV2, ao final de 120h de análise, apresentou uma redução de $1,7\log_{10}$ em sua concentração inicial de genomas; e MNV-1, uma redução de $1,5\log_{10}$ em cada um dos tempos de análise. Quando estas amostras foram submetidas ao cultivo celular, novamente foi observada a baixa sensibilidade do ensaio de Citometria de Fluxo para amostras de água do mar, para a detecção de HAdV2. De acordo com a figura 3.13, após 48h, não foi possível a detecção de células infectadas por HAdV2, pois os demais tempos de amostragem apresentaram resultados similares aos encontrados para o controle celular. Apesar deste experimento ter sido realizado uma única vez, os resultados de citometria de fluxo observados corroboram que a água do mar contribui para diminuir a estabilidade e infecciosidade viral. No entanto, o ensaio de placas de lise indicou a presença de MNV-1 infecciosos até o período de 96h de contato com água do mar.

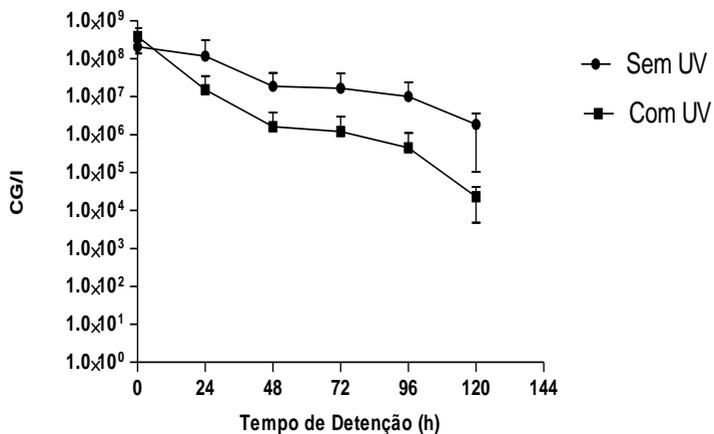


Figura 3.12 Curva de estabilidade de genomas de HAdV2 em água do mar, por um período de 120h, por qPCR.

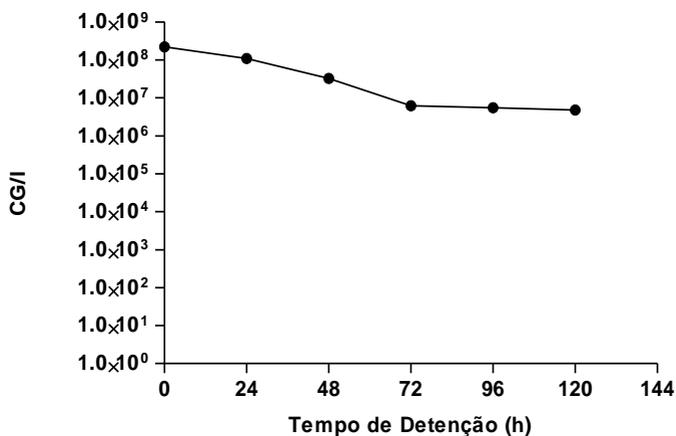


Figura 3.13 Estabilidade de HAdV2 em amostras de água do mar por um período de 120h por citometria de fluxo CC: Controle celular; CV: Controle Viral, infecção com 10^4 FFU de HAdV2.

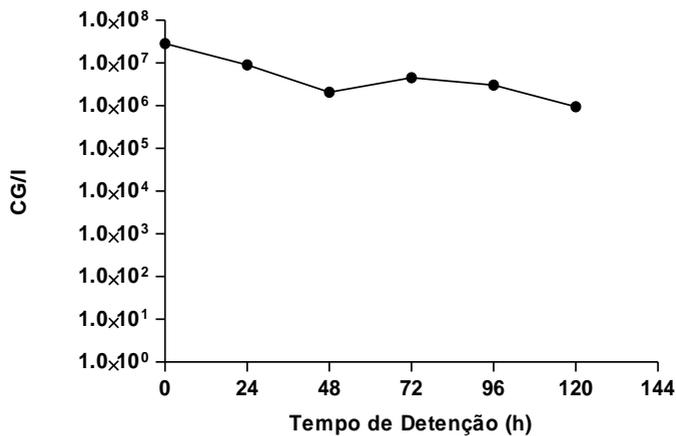


Figura 3.14 Curva de estabilidade de genomas de MNV-1 em água do mar, por um período de 120h, por qRT-PCR

Tabela 3.4: Sumário dos valores de redução logarítmica ($\text{Log}_{10}(\text{Nt}/\text{No})$) para HAdV2 e MNV-1 nos ensaios de estabilidade em água do mar natural, por um período de 120h.

Tempo (h)	qPCR para HAdV2	qRT-PCR para MNV-1
0	0,00	0,00
24	-0,31	-0,50
48	-0,83	-1,14
72	-1,55	-0,80
96	-1,60	-0,97
120	-1,66	-1,48

3.5 DISCUSSÃO

O uso de radiação U.V. para a desinfecção de água é muito empregado no tratamento de águas de reuso, para consumo humano e recreação (HIJNEN; BEERENDONK; MEDEMA, 2006). O interesse em avaliar um tratamento por U.V. em água do mar está diretamente relacionado com sua aplicação na aquicultura, especificamente em tanques de depuração de moluscos bivalves, os quais necessitam um suprimento de água do mar de boa qualidade microbiológica, e, de particular interesse em análises de bioacumulação e eliminação de patógenos entéricos nestes moluscos. No entanto, pesquisas sobre a desinfecção de água do mar para esta aplicação ainda são poucas principalmente as relacionadas à desinfecção de patógenos virais (HILL et al., 1967; 1970; CHANG et al., 2002).

Neste capítulo, avaliou-se a eficiência de outro sistema fechado de depuração de moluscos bivalves, distinto daquele utilizado no capítulo 1, na desinfecção simultânea, por radiação U.V., de três diferentes patógenos virais, bem como a estabilidade destes vírus em água do mar. O sistema de depuração utilizado neste estudo tem a capacidade para a depuração de 50 dúzias de ostras, com a recirculação de 300L de água do mar. Estas características indicam que este sistema pode ser utilizado para o uso em locais distantes de uma fonte de água do mar, como restaurantes, e por isso a eficiência de sistema de U.V. necessita ser avaliada. Os resultados observados indicaram uma taxa de desinfecção diferencial para HAdV2, MNV-1 e HAV e uma instabilidade das partículas virais em água do mar, ao longo de um período de 120h, sendo que HAdV2 apresentou uma maior resistência quando comparado aos outros dois vírus testados.

Estudos previamente publicados sobre desinfecção de diferentes sorotipos de HAdV, têm mostrado uma significativa resistência deste vírus aos processos padrão de desinfecção por U.V. (lâmpadas monocromáticas de baixa pressão), comparado a outros vírus, como coxsackievírus, rotavírus e calicivírus (BALLESTER et al., 2004; KO; CROMEANS; SOBSEY, 2005; EICHED; MEYER; LINDEN, 2009). Estes estudos mostraram que para atingir uma redução de 4-log_{10} no título viral de HAdV, são necessárias doses que variam entre 80 a 200 mJ/cm^2 , dependendo do sorotipo, enquanto que para os outros vírus, as doses exigidas são de 30 a 40 mJ/cm^2 . De acordo com os dados apresentados nas figuras 3.7 e na tabela 3.2, para HAdV2, observou-se uma redução de 99,9% do título viral inicial, e perda da infecciosidade, já em 72h de tratamento.

Os resultados observados no presente trabalho indicaram uma

desinfecção satisfatória de HAdV2 em água do mar tratada com radiação U.V., utilizando-se uma dose aproximada de 70 mJ/cm^2 . Apesar de esta dose ser menor que os valores observados nos estudos citados anteriormente, foi possível atingir uma alta redução logarítmica ($<5\text{-log}_{10}$) no número de genomas quantificados ao final de 120h, e uma inativação total de HAdV2. Isto provavelmente ocorreu porque este estudo foi realizado em um sistema de recirculação de água, no qual se deve levar em consideração o efeito cumulativo da dose de U.V. devido ao tempo de contato (120h).

Uma significativa quantidade de dados têm sido publicados sobre inativação de HAdV por radiação U.V., com a aplicação de ensaios de cultura celular para analisar a infecciosidade viral (EICHED et al., 2009; BAXTER et al., 2007; KO; SOBSEY, 2003, GERBA et al., 2002). Com esta proposta, neste estudo foram avaliados dois métodos para acessar a viabilidade de HAdV2 em água do mar e comparar os resultados com os obtidos por qPCR

A análise viral por ensaios de ICC-PCR combina o cultivo celular e detecção molecular do genoma viral. O cultivo celular prévio à amplificação gênica por PCR aumenta a concentração de partículas virais infecciosas, o que leva a uma maior sensibilidade da técnica, aumentando a probabilidade de detecção viral, mesmo daqueles vírus que não produzem um efeito citopático (CROMEANS et al., 2005). No entanto, mesmo pela utilização de um passo de cultivo celular não se pode descartar a possibilidade de detecção de vírus inativados que, apesar de permanecerem adsorvidos à superfície celular, não infectam e replicam no interior das células, o que levaria a resultados falso-positivos (SOBSEY et al., 1998; LI et al., 2010).

De acordo com Cromeans et al. (2000), a detecção do mRNA viral neste tipo de ensaio, ao invés de DNA, seria uma indicação da presença de partículas virais infecciosas nas amostras analisadas, já que somente vírus viáveis podem penetrar nas células e transcreeverem mRNA durante sua replicação. Neste contexto, foi utilizado neste trabalho o ensaio de ICC RT-PCR para a análise da viabilidade de HAdV2 nas amostras de desinfecção de água do mar.

Outro método que permite estudar a infecciosidade viral, e que foi usado neste estudo, foi baseado na citometria de fluxo. Este método permite a contagem e separação de uma suspensão celular em um ou mais grupos, de acordo com características de granulosidade, tamanho e fluorescência de cada tipo celular (QUIROS et al., 2007). O uso da citometria de fluxo para a detecção viral baseia-se na expressão de proteínas virais no interior das células durante os eventos de replicação

do vírus (HITT et al., 2000). Anticorpos específicos marcados com fluoróforos se ligam à proteína-alvo, o que resulta numa emissão de fluorescência a partir das células infectadas. Partículas virais que estejam localizadas fora das células, não são detectadas porque o tamanho os vírus está abaixo do limite de detecção deste método. Portanto, a detecção de células fluorescentes, é definitivamente uma indicação da presença de vírus infecciosos nas amostras analisadas (LI; HE; JIANG, 2010).

O uso de citometria de fluxo tem sido aplicado como estratégia para avaliar as diferentes populações virais no ambiente marinho (MARIE et al., 1999; DUHAMEL; JACQUET, 2006), e alguns trabalhos tem sido feitos para o uso deste método em amostras ambientais (BARARDI et al., 1999; CABALLERO et al., 2004; LI; HE; JIANG, 2010). O protocolo empregado neste trabalho apresentou um limite de sensibilidade baixo (Figura 3.6), o que dificultou a detecção de HAdV2 infecciosos nas amostras submetidas ao U.V. (Figura 3.8). Da mesma forma, devido à instabilidade destes vírus, com possível agregação e redução do título viral, mesmo em amostras sem U.V., a detecção viral não foi satisfatória. Da aplicação da citometria em amostras de água do mar, com objetivo de analisar infecciosidade viral após um processo de desinfecção, ainda não há registros a literatura. Assim, maiores estudos são necessários para a otimização deste método para este tipo de amostras.

O ICC-PCR, pelo fato de usar uma etapa de amplificação gênica, mostrou-se mais eficiente na detecção de partículas viáveis de HAdV2, conforme resultados da Tabela 3.4, mostrando HAdV2 infecciosos até 72h de contato ou não com U.V. Este método já foi reportado na literatura, atingindo resultados promissores em amostras ambientais (LI et al., 2010; CROMEANS et al., 2005).

Alguns trabalhos previamente publicados apresentam resultados divergentes sobre a dose de U.V. necessária para inativar HAdV (KO, CROMEANS E SOBSEY, 2005; MENG; GERBA, 1996; THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003). As razões para estas aparentes diferenças na resposta destes vírus à radiação U.V. ainda não estão bem esclarecidas, mas podem estar relacionadas a uma real diferença de estabilidade das partículas virais entre os sorotipos; variabilidade nos ensaios de infecciosidade aplicados; diferenças na preparação dos estoques virais (como número de congelamento e descongelamento, extração com clorofórmio) e diferenças nas condições experimentais em especial ao método de exposição a radiação U.V., pH e força iônica da matriz na qual os vírus estão diluídos.

Outro fator que usualmente não é citado, mas pode contar para as diferenças de resultados entre estudos de inativação de HAdV, é o tipo de linhagem celular utilizada nos ensaios de viabilidade (SIRIKANCHANA; JOANNA; SHISLER; MARINÃS, 2008). É interessante notar que os dados aqui apresentados estão próximos aos resultados obtidos por Eighed, Meyer e Linden (2009), os quais obtiveram uma inativação de 4-log_{10} para HAdV2, com a aplicação de 80mJ/cm^2 , utilizando células A549 para os ensaios de infecciosidade. Em outros estudos, as células utilizadas foram PLC/PRF/5 (THOMPSON et al, 2003), HeLa (THURSTON-ENRIQUEZ et al., 2003), e HEK-293 (KO; CROMEANS; SOBSEY, 2005). Para todos estes estudos, os resultados indicaram que HAdV são mais resistentes à radiação U.V. do que outros patógenos entéricos humanos estudados até o momento, necessitando de doses de U.V. maiores que 150mJ/cm^2 para uma redução de 4-log_{10} . Há evidências de que a avaliação de infecciosidade viral em diferentes linhagens celulares após a exposição à radiação U.V. pode fornecer resultados diferentes, ou seja, uma maior disponibilidade de enzimas de reparo pode resultar em um maior número de partículas virais resistentes ao tratamento com radiação U.V. (EICHED; MEYER; LINDEN, 2009).

Uma abordagem mais recente sobre desinfecção viral por U.V. é o uso de lâmpadas de média pressão (MP) e policromáticas, as quais emitem diferentes comprimentos de onda, incluindo aqueles que são absorvidos por proteínas, por isso tem o potencial de danificar o capsídeo e outras proteínas, além dos ácidos nucleicos, sendo mais eficientes na inativação viral. De acordo com Shin e Lee (2010), radiação U.V. MP foi mais efetiva que as lâmpadas de baixa pressão, tradicionalmente usadas em desinfecção de águas, em relação ao HAdV2. Uma inativação de 3-log_{10} foi atingida com a dose de 40mJ/cm^2 , quando comparada à redução de 1-log_{10} pela mesma dose de U.V., mas com lâmpada de baixa pressão. Em outro estudo, a inativação de HAdV2 por lâmpadas MP em dose de 90mJ/cm^2 , atingiu uma redução de 5.3-log_{10} (SHIN; LEE; LINDEN, 2009). Estes resultados indicam que lâmpadas de MP podem ser mais efetivas contra HAdV2 que LP, e que a eficiência de MP está relacionada ao maior dano causado à partícula viral, podendo impedir o processo de reparo de DNA.

De fato, HAdV de forma geral, tem sido reconhecido por ter uma taxa de desinfecção mais lenta que quaisquer outros patógenos entéricos (vírus, bactérias e protozoários) e o mecanismo de reparo de DNA é apontado como a razão para a alta resistência deste vírus ao U.V.

(EICHED; MEYER; LINDEN, 2009).

Apesar da importância de Norovírus, em relação à contaminação do ambiente aquático, sua persistência em diferentes condições ambientais e a eficiência da desinfecção por radiação U.V. não têm sido muito investigadas. Neste contexto, este trabalho avaliou a estabilidade em água do mar e inativação de MNV-1 como modelo para estudos de HuNoV.

Os resultados obtidos para a desinfecção de MNV-1 em amostras de água do mar indicaram uma susceptibilidade deste vírus frente à desinfecção por radiação U.V., tanto para a quantificação de genomas, como para a infeciosidade viral. De acordo com a Figura 3.9, a presença do genoma de MNV-1 em amostras tratadas por radiação U.V., foi detectada somente até 72h de recirculação da água, apresentando uma redução de $4,7\text{-log}_{10}$ (Tabela 3.3). Em amostras sem o tratamento de U.V., foi possível a detecção do genoma até 120h, indicando que uma eficiência da U.V. em degradar o genoma de RNA deste vírus.

Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo que descreve a estabilidade e desinfecção de MNV-1 em água do mar natural. No entanto os resultados obtidos podem ser comparados a outras matrizes. De acordo com Li, Zoh e Ko (2008), MNV-1 apresenta uma resistência ao tratamento por radiação U.V. maior que outros calicivirus também utilizados como modelo para estudos de HuNoV, sendo considerado adequado como modelo viral. Doses de U.V. de 10, 20 e 25 mJ/cm^2 permitiram uma redução de 1,0, 2,8 e 3,3- log_{10} no título viral de uma suspensão de MNV-1 em PBS. Estudos precedentes relataram uma redução de 4- log_{10} no valor de Calicivirus Felino (FCV) após o tratamento com uma dose de 19,4 mJ/cm^2 (TREE et al., 2005) e uma redução de 3- log_{10} para 12 mJ/cm^2 (DUIZER et al., 2004). No entanto, MNV-1 são muito mais suscetíveis aos raios U.V. do que outros vírus entéricos, tais como o HAdV2, como observado no presente trabalho.

A estabilidade de MNV-1 em água do mar sem tratamento com U.V. pode ter sido influenciada pela salinidade (Figuras 3.9 e 3.14). De acordo com Li, Zoh e Ko (2008), uma alta concentração de sal facilita a inativação do MNV-1, indicando que os Norovirus podem ser inativados mais rapidamente em água do mar do que em água doce, porque água do mar apresenta uma concentração de NaCl próxima a 3% (0,5M de NaCl). Os resultados obtidos por este grupo apresentaram uma redução de 2- log_{10} na presença de 0,5 M NaCl, em 72h de incubação à temperatura ambiente. Estes dados corroboram com os obtidos no presente trabalho, com uma redução de 2,3- log_{10} no título de MNV-1 em

72h de recirculação de água não tratada por U.V., e uma redução de $3,1\text{-log}_{10}$ em 120h, a 25°C .

Em relação aos resultados observados sobre a cinética de desinfecção de HAV, foi possível observar a presença do genoma viral em todos os tempos amostrais. Uma redução de $3,5\text{log}_{10}$ e de $1,7\text{log}_{10}$ foi observada para água tratada e não tratada com U.V., respectivamente (Figura 3.11 e Tabela 3.3). Estes valores de redução foram inferiores aos observados para os demais vírus analisados, no entanto, isso provavelmente foi devido ao título deste vírus estar mais baixo que o de MNV-1 e HAdV2, impedindo uma redução logarítmica mais elevada. De acordo com Battigelli, Sobsey e Lobe (1993), HAV (cepa HM 175) apresenta uma alta sensibilidade ao tratamento com U.V. A dose de U.V. necessária para a inativação de 99,99% de uma suspensão viral em PBS, foi de $16\text{mJ}/\text{cm}^2$; já em água tamponada essa redução foi de 3-log_{10} em uma dose $20\text{mJ}/\text{cm}^2$. Relatos de desinfecção deste vírus em diferentes tipos de águas, por tratamento com radiação U.V., não estão disponíveis na literatura.

De uma forma geral, os dados apresentados neste estudo indicam que em água do mar ocorre uma diminuição natural e gradual da viabilidade viral, e redução do título devido a fatores ambientais intrínsecos ao ambiente marinho, ao longo de 120h. O tratamento com radiação U.V. foi eficiente na desinfecção viral em água do mar, e que as diferentes cinéticas de inativação estão associadas diretamente às características físico-químicas das partículas virais, principalmente à estrutura do genoma, o qual é primeiramente afetado pela absorção de radiação U.V.

3.6 CONCLUSÕES

- Provavelmente devido à instabilidade do HAdV2 em água do mar, com possível agregação e drástica redução do título viral, mesmo em amostras sem tratamento com radiação U.V., o ensaio de Citometria de Fluxo não pode detectar vírus viáveis nas amostras analisadas, apesar de mostrar-se uma técnica viável para detectar células em cultura infectadas por quantidades variáveis de adenovírus;
- O ICC-RT-PCR mostrou-se mais eficiente na detecção de partículas viáveis de HAdV2, pelo fato de usar uma etapa de amplificação gênica;
- A técnica de placas de lise utilizada para os ensaios de viabilidade de MNV-1 apresentou-se como um método sensível, não

sendo observada inibição da infecção viral de partículas de MNV-1 presentes nas amostras de água do mar;

- O método da floculação orgânica apresentou-se como um método rápido, de baixo custo e eficiente para a concentração das partículas virais nas amostras de água do mar natural;
- Todos os três vírus analisados neste estudo apresentam uma instabilidade em água do mar, sendo observada uma diminuição gradual da concentração de partículas virais ao longo de 120h, em amostras não tratadas com U.V.; a diminuição natural da carga viral pode ser devido à existência de fatores ambientais, tais como força iônica e compostos encontrados naturalmente na água do mar.
- Em amostras submetidas ao tratamento com U.V., foi possível observar diferentes cinéticas de desinfecção para cada um dos três vírus. HAdV2 foi considerado mais resistente ao tratamento, seguido de HAV e MNV-1;
- O tratamento com U.V. foi eficiente para a desinfecção viral em um período de 72h, resultado o qual corrobora com o observado nas análises anteriores no sistema de depuração comercial (Capítulo 1), no qual foram necessárias 72h para a desinfecção viral (HAdV5 e HAV) de ostras submetidas à depuração em sistema fechado e desinfecção por U.V. (18W);
- Este trabalho confirmou que HAdV é um patógeno viral particularmente resistente a exige mais tempo para inativação quando comparado a HAV e MNV-1. Estes dados serão úteis para a otimização de desinfecção da água nos tanques de depuração de moluscos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Nos grandes mercados produtores de moluscos bivalves, a depuração destes organismos garante um produto final com alto valor comercial e com garantia de boas condições sanitárias. Para que a produção brasileira de ostras e mexilhões possa competir por um espaço no mercado internacional, é necessário que esta esteja de acordo com a legislação dos países concorrentes.

Apesar de a qualidade sanitária dos moluscos bivalves comercializados ser avaliada somente pela presença de bactérias (bactérias coliformes, *Escherichia coli* e *Salmonella*), tem sido claramente demonstrado que um controle baseado em parâmetros bacterianos não apresenta co-relação com presença de vírus nesses moluscos. Problemas de saúde humana associados ao consumo de ostras e mexilhões são bem descritos e contaminantes virais têm sido associados a muitos episódios de gastroenterites, considerando que estes moluscos são na maioria das vezes consumidos crus.

Estudos brasileiros sobre depuração de moluscos são raros, mas tornam-se necessários, considerando a necessidade de maior entendimento nesta área, com a finalidade de produzir conhecimento nacional para essa prática e evitar a importação de tecnologias estrangeiras. Nesta perspectiva, os resultados obtidos no presente trabalho são promissores para que a depuração de moluscos cultivados seja implementada no país. Sistemas de depuração de pequeno porte, permitem que esta tecnologia chegue mais facilmente a estabelecimentos comerciais como restaurantes e locais de venda de frutos do mar “in natura, o que traria grandes benefícios ao consumidor destes produtos.

Em breve a produção do Estado de Santa Catarina necessitará ultrapassar as fronteiras nacionais, devido ao grande aumento nos últimos anos. Desta forma, é de grande importância que as áreas de cultivo e a produção de moluscos apresentem uma qualidade microbiológica de acordo com a regulamentação vigente no País.

REFERÊNCIAS CAPÍTULO 3

- BALLESTER, N. A.; MALLEY, J. P. Sequential disinfection of adenovirus type 2 with U.V.-chlorine-chloramine. J. Am. Water Works Assoc, v. 96, p. 97–103, 2004.**
- BARARDI, C. R. M.; YIP, H.; EMSLIE, K. R.; VESEY, G. SHANKER, S.R.; WILLIAMS, K. L. Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 49, p. 9-18, 1998.
- BATTIGELLI, D.A; SOBSEY, M.D.; LOBE, D.C. Inactivation of Hepatitis A virus and other model viruses by U.V. irradiation. **Water Sci. Technol**, v. 27, n. 3-4, p. 339-342, 1993.
- BITTON, G., 1980. Introduction to Environmental Virology. Wiley-Interscience, New York. 326pp.
- BITTON, G., 1999. Wastewater Microbiology, second ed. John Wiley and Sons, Inc., New York. 578pp.
- CHANG, P.S.; CHEN, L.J.; WANG, Y.C. The effect of ultraviolet irradiation, heat, pH, ozone, salinity and chemical disinfectants on the infectivity of white spot syndrome baculovirus. **Aquaculture**, v. 166, p. 1–17, 1988.
- CALGUA, B.; MENGEWEIN, A.; GRUNERT, A.; BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; WYN-JONES, A.P.; LÓPEZ-PILA, J.M.; GIRONES, R. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. **J Virol Methods**, v. 153, n. 2, p. 79-83, 2008.
- DAN, L.I.; MIAO, H.E.; SUNNY, C.; JIANG, D. Detection of Infectious Adenoviruses in Environmental Waters by Fluorescence-Activated Cell Sorting Assay. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 5, p. 1442-1448, 2010.
- DUHAMEL, S.; JACQUET, S. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. **J Microbiol Methods**. v. 64, n. 3, p. 316-332, 2005.

DUIZER, E.; BIJKERK, P.; ROCKX, B.; DE GROOT, A.; TWISK, F.; KOOPMANS, M. Inactivation of calicivirus. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, p. 4538–4543, 2004.

EICHEID, A.C.; MEYER, J.E.; LINDEN, K.G. U.V. Disinfection of Adenoviruses: Molecular Indications of DNA Damage Efficiency. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 75, n. 2, p. 23–28, 2009.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008, Fisheries Technical Paper. Available on: <
http://www.fao.org/icatalog/search/result.asp?subcat_id=36>, accessed at October 28, 2009.

FUJIOKA, R.S.; YONEYAMA, B.S. Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. **Water Sci Technol.** v. 46, n. 11-12, p. 291-295, 2002.

FONG, T.T.; LIPP, E.K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 69, n. 2, p. 357-371, 2005.

GERBA, C.P.; SCHAIBERGER, G.E. Aggregation as a factor in loss of viral titer in seawater. **Water Res.** v. 9, p. 567–571, 1975.

GERBA, C.P.; GRAMO, D.M.; NWACHUKU, N. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by U.V. light. **Appl Environ Microbiol.** v. 68, n. 10, p. 5167-5169, 2002.

GANTZER, C.; DUBOIS, E.; CRANCE, J.M.; BILLAUDEL, S.; KOPECKA, H.; SCHWARTZBROD, L.; POMMEPUY, M.; LEGUYADER, F. Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. **Oceanologica Acta** v. 21, p. 983–992, 1998.

HIJNEN, W.A.M.; BEERENDONK, E.F.; MEDEMA, G.J. Inactivation credit of U.V. radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. **Water Res.** v. 40, n. 1, p. 3-22, 2006.

HILL, W. F.; HAMBLET, F. E.; AKIN, G.H; BENTON, W.H. Ultraviolet Deactivation of Eight Selected Enteric Viruses in Estuarine Water. **Applied Microbiology.** v. 19, n. 5, p. 805-812, 1970.

HILL, W. F.; HAMBLET, F. E.; AKIN, G.H; BENTON, W.H. Survival of Poliovirus in Flowing Turbid Seawater Treated with Ultraviolet Light. **Appl Environ Microbiol**, v. 15, n. 3, p. 533-536, 1967.

HITT, D. C.; BOOTH, J.L.; DANDAPANI, L. R.; PENNINGTON, J. M.; GIMBLE, J.K.; METCALF, J. A flow cytometric protocol for titering recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescent protein. **Mol. Biotechnol**, v. 14, p. 197–203, 2000.

JOTHIKUMAR, N.; CROMEANS, T.L.; SOBSEY, M.D.; ROBERTSON, B.H. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n.6, p. 3359-3363, 2005.

KO, G., T. L; CROMEANS, T.; SOBSEY, M.D.U.V. inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. **Water Res**, v. 39, p.3643–3649, 2005. LEE, J.;

KYUNGDUK, Z.; KO, G. Inactivation and U.V. Disinfection of Murine Norovirus with TiO₂ under Various Environmental Conditions. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 4, p. 2111–2117, 2008.

LE GUYADER, F.; DUBOIS, E.; MENARD, D.; POMMEPUY, M. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 3665-3671. 1994.

LINDEN, K.G; SHIN, G.A.; FAUBERT, G.; CAIRNS, W.; SOBSEY, M.D. U.V. disinfection of giardia lamblia cysts in water. **Environ Sci Technol**, v.36, n. 11; p. 2519-22, 2002.

LIPP, E.K.; KURZ, R.; VINCENT, R.; RODRIGUEZ-PALACIOS, C.; FARRAH, S.R.; ROSE, J.B. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. **Estuaries**, v. 24, p. 238–248, 2001.

QUIROS, C.M.; HERRERO, L. A.; GARCIA, M; DIAZ, M. Application of flow cytometry to segregated kinetic modeling based on the physiological states of microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 73, p. 3993–4000, 2007.

RICHARDS, G.P.; MCLEOD, C.; LE GUYADER, F. Processing Strategies to Inactivate Enteric Viruses in Shellfish. **Food Environ Virol**, v. 2, p. 183–193, 2010.

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

SINTON, L.W.; HALL, C.H.; LYNCH, P.A.; DAVIES-COLLEY, R.J. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 3, p. 1122-1131, 2002.

SIRIKANCHANA, K.; SHISLER, J.L.; MARIÑAS, B.J. Effect of exposure to U.V.-C irradiation and monochloramine on adenovirus serotype 2 early protein expression and DNA replication. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 12, p. 3774-3782, 2008.

SHIN, G.A.; LEE, J.K.; LINDEN, K.G. Enhanced effectiveness of medium-pressure ultraviolet lamps on human adenovirus 2 and its possible mechanism. **Water Sci Technol**. v. 60, n. 4, p. 851-877, 2009.

SHIN, G.A.; LINDEN, K.G.; SOBSEY, M.D. Low pressure ultraviolet inactivation of pathogenic enteric viruses and bacteriophages. **Environ. Eng. Sci**, v. 4, p.7–11, 2005.

THOMPSON, S. S.; JACKSON, J. L.; SUVA-CASTILLO, M.; YANKO, W. A.; JACK, Z. E.; KUO, J.; CHEN, C.L.; WILLIAMS, F. P.; SCHNURR, D. P. Detection of infectious human adenovirus in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. **Water Environ. Res**, v. 75, p.163–170, 2003.

THURSTON-ENRIQUEZ, J. A.; HAAS, C. N.; JACANGELO, J.; RILEY, K.; GERBA, C.P. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by U.V. irradiation. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 69, p.577–582, 2003.

UPADHYAYA, G.S.; CURRY, R.D.; NICHOLS, L. The Design and Comparison of Continuous and Pulsed Ultraviolet Reactors for Microbial Inactivation in Water. **Trans. Plasma Sc**, v. 32, n. 5, 2004.
TREE, J. A.;

ADAMS, M. R; LEES, D. Disinfection of feline calicivirus (a surrogate for *Norovirus*) in wastewaters. **J. Appl. Microbiol** v. 98, p.155–162, 2005.

WETZ, J.J.; LIPP, E.K.; GRIFFIN, D.W.; LUKASIK, J.; WAIT, D.; SOBSEY, M.D.; SCOTT, T.M.; ROSE, J.B. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. **Mar. Pollut. Bull**, v. 48, n.7-8, p. 698-704, 2004.

ZIMMER, J.L.; SLAWSON, R.M; Potential repair of *Escherichia coli* DNA following exposure to U.V. radiation from both medium- and low-pressure U.V. sources used in drinking water treatment.. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 7, p.3293-3299, 2002.