

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ADRIANA DE ABREU CORRÊA**

**Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo  
(*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com  
*Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**

**Florianópolis**

**Fevereiro  
2006**

**ADRIANA DE ABREU CORRÊA**

**Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo  
(*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com  
*Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia na Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Célia Regina Monte Barardi**

**Florianópolis**

**Fevereiro  
2006**

CORRÊA, Adriana de Abreu

Estudo sobre a dinâmica de depuração de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*) artificialmente contaminadas com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium/ Adriana de Abreu Corrêa. Florianópolis, 2006. 113p.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia.

1. Ostras *Crassostrea gigas* – 2. Depuração – 3. *Salmonella* Typhimurium - 4. PCR – 5. Hibridização Molecular

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Célia Regina Monte Barardi pela oportunidade e confiança para o desenvolvimento deste estudo.

Aos professores: Cláudia Simões pelas sugestões, apoio e contribuições científicas para esse trabalho e Carlos Pinto, pelo grande auxílio na análise estatística.

À 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 Dr. Carlos Rogério Poli, gerente especial de Aqüicultura e Pesca do Estado de Santa Catarina pela atenção e esforço em obter todo o necessário para a plena realização e divulgação deste trabalho.

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

Ao Sr. José Marcatti, presidente da Associação de Maricultores do Norte da Ilha (AMANI), pelo auxílio na disponibilização do espaço físico para a realização dos experimentos de depuração.

Ao pessoal dos Laboratórios do terceiro andar do MIP (Imunologia Aplicada e Protozoologia); em especial às amigas Dayse e Ana Paula, colegas de mestrado, pela amizade nestes dois anos de convivência.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA): Márcia, Cláudia Figueiredo, Thaís, Alexandre, Vanessa Müller, Carla, Luciane, Jadel, Thiago, Deise, Flávio, Juliana e Débora, pelo trabalho em equipe e companheirismo em todas as horas.

Aos grandes companheiros de bancada, no LVA: Javier, Jonas, Vanessa Moresco e Cristiane, pela amizade e valiosa ajuda.

Aos meus pais, pelo carinho e total apoio à minha escolha pela vida acadêmica.

Ao Adriano...pelo amor e pelo companheirismo de todos os dias.

*Este trabalho foi realizado com financiamento do CNPq, FAPESC e Blue Water Aquaculture Ltda. e recebeu apoio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, através da concessão de uma bolsa de estudos pela CAPES/MEC. Este trabalho também teve suporte parcial da Emenda Parlamentar do Deputado Federal Edison Andrino de Oliveira, liberada através da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca da Presidência da República - FOME ZERO.*

## RESUMO

Devido ao hábito alimentar filtrador dos moluscos bivalves, estes organismos podem concentrar, em seus tecidos, microrganismos patogênicos presentes nas águas de cultivo, sendo associados com intoxicações alimentares, como a salmonelose. O Estado de Santa Catarina, por suas características geográficas e da qualidade das águas litorâneas, tornou-se um ambiente ideal para o cultivo de organismos marinhos, especialmente moluscos bivalves, como ostras da espécie *Crassostrea gigas*. Considerando registros recentes de contaminação por patógenos entéricos em alguns locais de cultivo de moluscos na Ilha de Santa Catarina, a produção e comércio de moluscos necessitam ser monitorados. Com o objetivo de expandir a maricultura na costa do Estado de Santa Catarina e garantir um produto final com alto valor comercial, um sistema de depuração de moluscos foi desenvolvido pela empresa *Blue Water Aquaculture* e avaliado em relação à eliminação de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium por ostras da espécie *C.gigas*. Inicialmente, foi padronizado o método para detecção da presença de *S. Typhimurium* em tecido digestivo de ostras. Esta metodologia consistiu em dissecação do tecido digestivo de ostras, pré-enriquecimento da amostra em meio de cultura não seletivo, extração do DNA bacteriano, e PCR seguida de hibridização molecular utilizando como sonda o produto de PCR de *S.Typhimurium* marcado com digoxigenina. Como resultado da padronização da metodologia de detecção molecular, foi desenvolvido um método sensível para detectar baixos níveis de *S. Typhimurium* em tecido digestivo de ostras (0.1UFC/g). Simultaneamente aos trabalhos de depuração, um dos pontos de cultivo de ostras de Florianópolis foi monitorado, no período entre março e outubro de 2005, em relação à qualidade microbiológica da água e da carne dos moluscos ali cultivados. Como resultado foi observado um alto índice de contaminação fecal nas águas e presença de *Salmonella* spp. nas ostras, enfatizando ainda mais esta necessidade de validação de um sistema de depuração. O sistema de depuração utilizado foi um sistema fechado, no qual 1000 L de água recircularam por 24h. Parâmetros como o tempo de depuração e o tratamento da água utilizada na recirculação foram também avaliados. Durante a recirculação, a água foi esterilizada com luz Ultra Violeta, cloro e associação dos dois tratamentos. Para a validação do sistema de depuração, ostras cultivadas em Santa Catarina (*C.gigas*) foram inicialmente contaminadas com *S. Typhimurium*. As ostras foram amostradas após 0, 6, 12, 18 e 24h para avaliar a dinâmica de depuração. Após cada coleta, as amostras foram analisadas por métodos clássicos de microbiologia para quantificar as bactérias viáveis no tecido digestivo das ostras. Os ensaios de depuração com água tratada com UV e Cloro, separadamente, mostraram uma crescente eliminação de bactérias viáveis durante os períodos de depuração, com 90% da contaminação eliminada em 24h. A associação destes tratamentos mostrou a total eliminação das bactérias dentro de 12h. A PCR apresentou uma variável detecção do genoma bacteriano em todos os métodos para esterilização da água, demonstrando que a detecção molecular, nesse caso, não é uma boa metodologia, já que não é indicadora da viabilidade bacteriana, podendo detectar fragmentos de DNA de bactérias inviáveis. Este tipo de trabalho é pioneiro no Brasil e, considerando que o Estado de Santa Catarina apresenta liderança na produção de moluscos no Brasil e que até o momento não há um programa sanitário para regulamentar a exportação da produção, os resultados encontrados apresentam uma grande contribuição para a economia e o desenvolvimento sustentável do país.

Palavras-chave: Ostras *Crassostrea gigas*, depuração, *Salmonella* Typhimurium, PCR, hibridização molecular

## ABSTRACT

Shellfish are filter feeders, and able to concentrate pathogens from the surrounding waters within their tissues. For this reason, they have been widely associated with outbreaks illness, as salmonellosis. Due the existence of countless environmental preservation areas, such as bays and estuaries, associated with the good quality of the water, the coast of Santa Catarina State, Brazil, has become ideal for marine organisms cultures, especially bivalve mollusks such as the oyster species *Crassostrea gigas*. In regard to recent records of contamination by enteric pathogens in some of the cultivation sites of the Santa Catarina Island, the production and trade of bivalve mollusks need to be monitored. Aiming to expand the mariculture in the coast of Santa Catarina and to guarantee a final product with high commercial value, a system of bivalve mollusk depuration is being developed by Blue Water Aquaculture and evaluated to elimination of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from the oysters tissue. First, a method for the detection of *S. Typhimurium* presence in oysters was standardized. This methodology consisted of dissection of the gastrointestinal oyster tract, sample pre-enrichment in non-selective medium, DNA extraction, and PCR followed by molecular hybridization using a *S. Typhimurium* amplicon digoxigenin-labeled probe. In this study, the result of the detection methodology standardization, a sensitive method to detect low levels of *S. Typhimurium* in oyster tissue was developed (0.1 CFU/g). Simultaneously to the depuration work, one of the oyster cultivation site in Florianópolis had the water and the mollusk meat quality monitored during the period between March and October, 2005. A high degree of fecal contamination in the water and the presence of *Salmonella* spp. in the oysters were observed, underlining the necessity of validating a depuration system even more. The depuration plant used in this work was a closed system, in which 1,000 L of water recirculate during 24h. Parameters such as time and treatment of the water used in the depuration were also optimized. In the process of recirculation, the water was sterilized with Ultraviolet light, chlorine and an association of both treatments. For the depuration plant validation, oysters cultivated in Santa Catarina State (*C. gigas*) were first artificially contaminated with *S. Typhimurium*. Animals were harvested after 0h, 6h, 12h, 18h and 24h in order to evaluate the dynamics of the oysters depuration. After each depuration process, oyster samples were analyzed by classical microbiological methods to count the viable bacteria in the oyster meat and by molecular detection, as describe above. As results of depuration assays, using microbiological methods the UV and chlorine treatment of the water showed a crescent elimination of viable bacteria during the depuration periods with 90% of elimination in 24h. The association of UV and chlorine showed a total elimination of the seeded bacteria within 12h. The PCR showed a variable detection of the bacteria genome in all the three methods used for water sterilization, proving that genome detection, in this case, is not a good parameter since it is not an indication of the viability of the microorganism. This type of work is pioneer in Brazil and, since the State of Santa Catarina responds as the leader in mollusk production in Brazil and, up to now, it has no sanitary program to regulate the exportation of these mollusks; this kind of work is a good contribution for the economy and the sustainable development of the country.

Key-words: Oysters *Crassostrea gigas*, depuration, *Salmonella* Typhimurium, PCR, Molecular Hybridization

## LISTA DE ABREVIATURAS

**EPAGRI:** Empresa de Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
**LCMM:** Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos  
**LCM:** Laboratório de Camarões Marinhos  
**ACAq:** Associação Catarinense de Aquicultura  
**FAMASC:** Federação das Associações de Maricultores do Estado de Santa Catarina  
**BWA:** Blue Water Aquaculture Ltda.  
**UFC:** Unidades Formadoras de Colônias  
**FDA:** *Food and Drug Administration*  
**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
**SIF:** Serviço de Inspeção Federal  
**MAPA:** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
**CONAMA:** Conselho Nacional do Meio Ambiente  
**IBAMA:** Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis  
**CF:** Coliformes Fecais  
**NMP:** Número mais Provável  
**NSSP:** *National Shellfish Sanitation Program*  
**APHA:** American American public health association.  
**DSP:** *Diarrhetic Shellfish Poison*  
**PSP:** *Paralytic Shellfish Poison*  
**UV:** UltraVioleta  
**ppm:** partes por milhão  
**PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase ( *Polimerase Chain Reaction*)  
**PM:** Peso Molecular  
**ATCC :** *American Type Culture Collection*  
**BHI:** *Brain Heart Infusion* (Caldo Infuso de Cérebro e Coração)  
**XLD:** Xilose-Lisina Deoxicolato de Sódio  
**TE:** Tampão Tris -EDTA  
**EDTA:** Ácido etilenodiaminatetracético  
**CTAB:** Brometo de cetiltrimetilamônio  
**SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio  
**D.O.:** Densidade óptica  
**dNTP:** deoxinucleotídeo trifosfato  
**pb:** pares de bases  
**TES:** Tampão Tris-EDTA-SDS  
**SLS:** Lauril Sarcosina de Sódio  
**NBT:** Nitro Blue Tetrazolium  
**BCIP:** 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato  
**AOAC:** *Association of Official Analytical Chemists*  
**DT90:** Tempo necessário para eliminar 90% da contaminação bacteriana nas ostras  
**DIG:** Digoxigenina  
**CEFAS:** *Center for Environmental, Fisheries and Aquaculture Science*



## ÍNDICE

1 Introdução .....	1
1.1 Moluscos Bivalves .....	1
1.1.1 Maricultura em Santa Catarina .....	1
1.1.2 Espécies em produção comercial .....	2
1.1.3 Hábito alimentar e capacidade de bioacumulação .....	3
1.2 Contaminação ambiental e doenças associadas ao consumo de moluscos. ....	4
1.3 Bactéria entéricas .....	6
1.3.1 Gênero <i>Salmonella</i> .....	7
1.3.1.1 Transmissão e epidemiologia da salmonelose humana relacionada ao consumo de moluscos .....	8
1.4 Controle sanitário da produção de moluscos .....	9
1.4.1 Legislação Nacional .....	10
1.4.2 Legislação Internacional .....	11
1.4.3 Métodos de purificação de moluscos bivalves .....	13
1.5 Depuração de moluscos .....	13
1.5.1 Sistemas de depuração .....	15
1.5.2 Parâmetros a serem controlados no processo de depuração .....	16
1.5.3 Tratamentos da água .....	17
1.5.3.1 Desinfecção Química .....	17
1.5.3.2 Esterilização com radiação Ultra Violeta .....	18
1.6 Metodologia de detecção de microrganismos patogênicos em amostras ambientais .....	19
2 Objetivos .....	21
2.1 Objetivo Geral .....	21
2.2 Objetivos Específicos .....	21
3 Materiais e métodos .....	22
3.1 Bactérias .....	22
3.1.1 <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovar Typhimurium .. . . . .	22
3.1.2 Crescimento, manutenção e quantificação da cepa bacteriana de <i>S.</i> Typhimurium. ....	22
3.2 Ostras .....	23
3.2.1 Dissecção do tecido digestivo das ostras .....	23

3.3 Isolamento do material genético a partir da cultura pura de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	23
3.4 Quantificação do DNA total de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	24
3.5 Reação de PCR para detecção de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	25
3.5.1 Visualização dos produtos de amplificação de DNA isolado de <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> . . . . .	25
3.5.2 Curva de concentração dos iniciadores na reação de PCR para a detecção de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	26
3.6 Hibridização Molecular para detecção do DNA amplificado de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	26
3.6.1 Produção e marcação da sonda de 387 pb referente ao produto de amplificação de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	27
3.6.2 Aplicação dos produtos de PCR de <i>S. Typhimurium</i> em membrana de nylon. . . . .	27
3.6.2.1 <i>Southern-Blot</i> . . . . .	27
3.6.3 Procedimento de Hibridização Molecular da sonda marcada por digoxigenina aos produtos de PCR de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	28
3.6.3.1 Pre-Hibridização . . . . .	28
3.6.3.2 Hibridização . . . . .	28
3.6.4 Detecção Imunológica . . . . .	28
3.7 Determinação do limite de sensibilidade da detecção de <i>S. Typhimurium</i> , por PCR e Hibridização Molecular . . . . .	29
3.8 Recuperação e isolamento do material genético bacteriano a partir de tecido digestivo de ostras contaminadas artificialmente por <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	29
3.8.1 Detecção do DNA bacteriano de <i>S. Typhimurium</i> diretamente de tecido digestivo dissecado de ostras . . . . .	30
3.8.2 Detecção do DNA bacteriano de <i>S. Typhimurium</i> a partir de um enriquecimento em meios de cultura da amostra de tecido digestivo dissecado de ostras. . . . .	30
3.8.3 Distintos períodos de incubação em meios de cultura na detecção do DNA de <i>S. Typhimurium</i> em tecido digestivo dissecado de ostras . . . . .	31
3.9 Determinação do limite de sensibilidade da PCR e Hibridização Molecular para detecção de <i>S. Typhimurium</i> em tecido digestivo de ostras. . . . .	31
3.10 Ensaio de bioacumulação de <i>S. Typhimurium</i> por ostras <i>C. gigas</i> . . . . .	32
3.10.1 Aquários e Ostras . . . . .	32

3.10.2 Bioacumulação de <i>S. Typhimurium</i> por ostras <i>C. gigas</i> . . . . .	32
3.11 Ensaio de depuração de <i>S. Typhimurium</i> por ostras <i>C. gigas</i> . . . . .	34
3.11.1 Ensaio-piloto de Depuração . . . . .	34
3.11.2 Sistema de Depuração comercial . . . . .	34
3.11.3 Ensaio de Depuração de <i>S. Typhimurium</i> por ostras <i>C. gigas</i> no tanque de depuração . . . . .	36
3.11.4 Sistemas de tratamentos da água no tanque de depuração. . . . .	37
3.11.4.1 Esterilização da água através de tratamento com UV. . . . .	37
3.11.4.2 Esterilização da água através de tratamento com 1ppm de Cloro. . . . .	37
3.11.4.3 Esterilização da água através de tratamento simultâneo com radiação Ultra Violeta e 1ppm de Cloro. . . . .	38
3.12 Quantificação de <i>S. Typhimurium</i> presente no tecido digestivo de ostras . . . . .	38
3.13 Análise mensal de amostras de campo . . . . .	39
3.13.1 Coleta e processamento . . . . .	39
3.13.2 Avaliação da contaminação por <i>Salmonella</i> spp em amostras de ostras coletadas entre março e outubro de 2005. . . . .	39
3.13.3 Determinação dos níveis de coliformes em águas de Cultivo . . . . .	40
3.14 Análise estatística dos ensaios de depuração comercial. . . . .	41
4. Resultados . . . . .	42
4.1 Quantificação do inóculo bacteriano de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	42
4.2 Reação de PCR para detecção de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	42
4.3 Hibridização Molecular para detecção de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	44
4.3.1 Produção da sonda de 387 pb . . . . .	44
4.4 Determinação do limite de sensibilidade da detecção de <i>S. Typhimurium</i> com uso da reação de PCR e da hibridização molecular . . . . .	45
4.5 Análise dos diferentes protocolos de extração e purificação de material genético de <i>S. Typhimurium</i> a partir do tecido digestivo de ostras. . . . .	45
4.6 Distintos períodos de incubação em meio de cultura para detecção do DNA de <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> em ostras . . . . .	47
4.7 Determinação do limite de sensibilidade da detecção de <i>S. Typhimurium</i> em ostras com o uso da reação de PCR e da hibridização molecular. . . . .	48

4.8 Ensaio de depuração de ostras de cultivo artificialmente contaminadas por <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	49
4.8.1 Ensaio- piloto de depuração em aquários. . . . .	49
4.8.2 Ensaio de depuração comercial . . . . .	51
4.8.2.1 Tratamento da água com radiação ultra violeta . . . . .	51
4.8.2.2 Tratamento da água com 1ppm de Cloro . . . . .	55
4.8.2.3 Tratamento simultâneo da com 1ppm de Cloro e radiação ultra violeta. . . . .	59
4.8.2.4 Análise Estatística dos resultados da depuração comercial . . . . .	63
4.9 Avaliação da contaminação bacteriológica das águas de cultivo e da carne de ostras cultivadas em um ponto de cultivo da Ilha de Florianópolis. . . . .	64
5 Discussão . . . . .	66
5.1 Avaliação dos protocolos para isolamento e purificação do material genético a partir de tecido digestivo dissecado de ostras artificialmente contaminadas com <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	66
5.2 Reação de PCR para detecção de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	69
5.3 Hibridização molecular como avaliação confirmatória da reação de PCR para a detecção de <i>S. Typhimurium</i> . . . . .	70
5.4 Comparação dos limites de sensibilidade de <i>S. Typhimurium</i> obtidos com o tecido digestivo de ostras, por PCR e hibridização molecular . . . . .	72
5.5 Sistemas de depuração e dinâmica de acumulação e de eliminação de <i>S.</i> <i>Typhimurium</i> por ostras de cultivo . . . . .	73
5.5.1 Avaliação da eficiência dos diferentes tratamentos da água utilizada no sistema comercial de depuração. . . . .	76
5.5.2 Avaliação das técnicas utilizadas para o monitoramento do processo de depuração . . . . .	80
5.5.3 Otimização do sistema de depuração . . . . .	81
5.6 Determinação da contaminação microbiológica das amostras de campo, coletadas entre março e outubro de 2005 . . . . .	83
5.6.1 Determinação dos níveis de coliformes nas águas de cultivo . . . . .	83
5.6.2 Determinação da presença de <i>Salmonella</i> spp no tecido dos moluscos . . . . .	84
6. Conclusões . . . . .	86

7. Considerações finais e perspectivas .....	87
Referências .....	88

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Moluscos Bivalves**

#### **1.1.1 Maricultura em Santa Catarina**

A maricultura, que envolve o cultivo de moluscos, algas, crustáceos e peixes, é uma atividade que vem adquirindo grande importância como fonte de proteína animal. Dentre os países produtores que ocupam posições de destaque estão China, Espanha, Nova Zelândia, Chile, Japão, Coreia, Itália e Brasil.

No Brasil, o cultivo de moluscos marinhos (malacocultura) possui maior representatividade através da produção de ostras e mexilhões. Os principais Estados produtores são Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e, sendo que o primeiro ocupa a liderança nacional (SOUZA, 2003)

O projeto de expansão da maricultura no Brasil foi impulsionado pela Agência de Cooperação Internacional do governo do Canadá (em inglês, CIDA), a partir da criação do Programa Brasileiro de Maricultura (*Brazilian Mariculture Linkage Program*). Deste Programa, além da Universidade Federal de Santa Catarina, participaram as Universidades Federais da Bahia, do Maranhão, do Rio Grande do Norte e do Espírito Santo, juntamente com instituições canadenses. O objetivo desse convênio foi aumentar o incentivo à maricultura tropical, respeitando o meio ambiente, para gerar alimentos saudáveis de boa qualidade para os mercados locais e internacionais (BARARDI; SANTOS; SIMÕES, 2001).

Em Santa Catarina, a maricultura é uma atividade recente, tendo surgido no final da década de 80, como uma alternativa para substituir a pesca artesanal decadente, em decorrência do aumento da pesca industrial e do desrespeito do período de reprodução de certas espécies (SOUZA, 2003). Os primeiros trabalhos voltados para o cultivo de moluscos marinhos em Santa Catarina, foram iniciados em meados de 1988, a partir de uma parceria entre a Associação de Crédito e Assistência Pesqueira de Santa Catarina (Acarpesc), atual

EPAGRI, e o Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina – LCMM/UFSC. Desde então, o crescimento da atividade e sua consolidação como alternativa de renda às populações tradicionais das comunidades pesqueiras elevaram o Estado à condição de referência nacional no setor (OLIVEIRA NETO, 2005).

Apesar de ser uma atividade relativamente nova nas águas catarinenses, a malacocultura tende a se expandir cada vez mais, devido às condições oceanográficas favoráveis ao cultivo de moluscos, como a existência de inúmeras áreas de preservação ambiental, formadas por baías, enseadas e estuários e também pela qualidade da água. Essas características tornam o litoral do Estado de Santa Catarina um local ideal para a criação de organismos marinhos, principalmente ostras, da espécie *Crassostrea gigas*, e mexilhões, da espécie *Perna perna* (LCMM, 2001).

Atualmente, existem 786 maricultores organizados em uma associação estadual (Associação Catarinense da Aqüicultura - ACAq); 20 associações locais, parte delas congregadas em uma federação estadual (Federação das Associações de Maricultores do Estado de Santa Catarina - FAMASC), e 5 cooperativas (OLIVEIRA NETO, 2005).

Em um período de 14 anos (1991-2004), a produção de moluscos aumentou progressivamente. Desde o início da implantação do cultivo de moluscos bivalves no litoral catarinense, a produção de ostras alcançou a marca de 2.512 toneladas no ano de 2004, e a produção de mexilhões chegou a cerca de 9.800 toneladas. De acordo com essa evolução da produção, há expectativas de que, em 2005, a produção de ostras tenha duplicado (Epagri/CEDAP, 2004; OLIVEIRA NETO, 2005).

### **1.1.2 Espécies em produção comercial**

A espécie de ostra cultivada comercialmente no Estado é *C. gigas*, também conhecida como ostra-do-Pacífico, ou ostra japonesa. Pertence ao Filo Mollusca e à classe Bivalvia. É uma espécie exótica, nativa do sudoeste asiático, cultivada mundialmente por ser bem adaptada ao cultivo planejado. Apesar de ser originária de locais mais frios, essa espécie adaptou-se muito bem às águas do litoral catarinense. Esta espécie é um dos moluscos marinhos mais cultivados mundialmente e sua produção vem aumentando ano a ano. De acordo com dados de *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2006), a produção mundial desta espécie de ostras em 1950 foi de 156.231 toneladas, alcançando, em

2003 a marca de 4.376.802 toneladas. A introdução da ostra do Pacífico no Estado de Santa Catarina deu-se em 1987, a partir da introdução de sementes de ostra do pacífico, produzidas no Chile. Os maiores volumes de produção de ostras estão concentrados nos municípios de Florianópolis e Palhoça, com 61,4% e 27,9% da produção estadual, respectivamente (SOUZA, 2003).

Embora esta não seja a única espécie possível de ser cultivada, é a que detém a tecnologia de produção mais desenvolvida. Além desta, o Estado de Santa Catarina reúne excelentes condições para diversificar a produção de vieira ou “coquille” (*Nodipecten nodosus*) e a ostra do mangue (*C. rhizophorae*) com boa aceitação tanto no mercado nacional como no internacional. A principal vantagem é que são espécies brasileiras, o que amplia as suas perspectivas de mercado para exportação.

### **1.1.3 Hábito alimentar e capacidade de bioacumulação**

Os moluscos bivalves possuem hábito alimentar filtrador, portanto se alimentam de partículas em suspensão na água. Suas duas valvas são mantidas ligeiramente abertas por onde entra a sua alimentação. O alimento provém de um fluxo de água, que passa através das cavidades do manto, pelas brânquias. Essas funcionam como um filtro e concentram partículas orgânicas, algas microscópicas e organismos planctônicos que servem como alimento para o animal. A capacidade filtradora de uma ostra pode chegar a 10 L de água por hora e cerca de 200L por dia (WARD, 1996). Por essa característica, são considerados também reservatórios de inúmeros patógenos humanos, já que podem bioacumular primariamente bactérias, como as dos gêneros *Salmonella* e *Shigella*, vírus entéricos e protozoários, devido à contaminação fecal nos locais de cultivo (LEE; PANICKER; BEJ, 2003).

De acordo com Liang et al, 2004, esses moluscos também podem concentrar contaminantes químicos como metais pesados, compostos organoclorados, hidrocarbonetos e elementos radioativos. Devido a essa capacidade de bioacumular, os moluscos bivalves são importantes bioindicadores de alterações ambientais, assim como biomarcadores para o monitoramento de contaminação no ambiente aquático.

Quando ostras e mexilhões filtram águas contaminadas com patógenos humanos, os mesmos não apresentam sinal externo de contaminação, como mudança de cor e sabor ou

odor ruim. No entanto, ao serem ingeridos crus ou mal cozidos, funcionam como veículos de transmissão, podendo provocar sintomas e doenças sérias aos seres humanos (STEINERT et al., 1998).

## **1.2 Contaminação ambiental e doenças associadas ao consumo de moluscos**

Nos últimos anos foi detectado um aumento da poluição dos locais de cultivo de moluscos no Estado de Santa Catarina, com a detecção da presença de patógenos virais e bacterianos nos moluscos e nas águas de cultivo (COELHO et al., 2003; TOSO et al., 2004; RIGOTTO et al., 2005, SINCERO et al., 2006). Desta forma, um controle sanitário dessas águas e dos produtos de maricultura torna-se urgente.

O risco de doenças infecciosas oriundas do consumo de moluscos é um problema amplamente reconhecido há vários anos, tanto pela indústria de alimentos quanto pelas agências de saúde. Nos Estados Unidos, de todos os casos de doenças alimentares, o consumo de moluscos e de outros frutos do mar responde por 10-19% dos casos, sendo que 9% vão a óbito. Em quinze anos de estudos sobre surtos dessas doenças em Nova Iorque, os frutos do mar foram indicados como veículos de transmissão em 19% dos casos. Os moluscos bivalves (ostras e mexilhões) foram responsáveis por 64% das intoxicações. O agente causador pôde ser confirmado em 44% desses surtos e, destes, 47% foram causados por vírus e 9% por bactérias. Em países com grande consumo de frutos do mar, ou onde esses são tradicionalmente consumidos crus, uma grande porcentagem dos surtos está relacionada ao consumo dos moluscos. Na Austrália, 20% das intoxicações alimentares são relacionadas a esse consumo; na China, a ingestão de frutos do mar responde por 70% das intoxicações (BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004).

Conforme Lee e Younger (2002), os microrganismos que podem ser considerados um risco à saúde são bactérias patogênicas, tais como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* enteropatogênica (cepa O157), *Staphylococcus aureus*, *Yersinia* spp., *Vibrios* spp., *Bacillus cereus*, e *Clostridium perfringens*; protozoários patogênicos, tais como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* e *Entamoeba histolytica*; e vírus, tais como os norovírus, rotavírus, vírus da hepatite A, dentre outros. Qualquer um desses microrganismos, se presente em águas estuarinas ou marinhas, como contaminação ou como residente natural, pode conseqüentemente contaminar os moluscos bivalves.



Segundo Gabutti et al. (2000), o tempo necessário para eliminar 90% da contaminação em águas salinas varia conforme os microrganismos envolvidos. Neste estudo, os coliformes fecais são mais rapidamente eliminados do que outros patógenos, como *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. Para a eliminação de 90% da população de coliformes fecais, são necessárias 48-72h; para eliminar *Salmonella* spp., são necessárias 56-80h, e para *Staphylococcus aureus* o tempo necessário é de 88-104h. Portanto, a ausência de coliformes não é garantia de boas condições sanitárias.

Com relação às doenças causadas por bactérias patogênicas, associadas ao consumo de moluscos, as mesmas podem ser divididas em dois principais grupos, conforme a fonte de contaminação. Essas doenças podem ser causadas por bactérias naturalmente residentes no ecossistema aquático ou por bactérias presentes nesse ambiente como resultado da contaminação por fezes animais (FELDHUSEN, 2000).

No primeiro caso, um exemplo é o gênero *Vibrio*, pertencente à família *Vibrionaceae*, que apresenta espécies residentes naturais do ambiente marinho em regiões tropicais e temperadas. Este gênero é apontado como uma das principais causas de gastroenterites nos Estados Unidos e Europa, sendo que a espécie *V. parahaemolyticus* é a mais comum associada a infecções humanas, seguida de *V. vulnificus* e *V. cholerae*. A ocorrência deste patógeno nem sempre está associada à presença de organismos indicadores, mas sim a alterações físico-químicas do ambiente, como pH, salinidade e temperatura (DALSGAARD, 1998). Além das espécies do gênero *Vibrio*, o gênero *Aeromonas*, também pertencente à família *Vibrionaceae*, é amplamente encontrado em ambientes aquáticos, apresentando linhagens consideradas importantes patógenos de frutos do mar, podendo ser isoladas em diversas áreas geográficas (BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004).

Em relação às bactérias provenientes de contaminação fecal, os gêneros *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia* estão entre os principais veiculados por moluscos bivalves. O gênero *Salmonella* é o responsável pelos grandes surtos de gastroenterites de ocorrência mundial, apresentando uma dose infectiva a partir de  $10^2$  UFC/g de carne, dependendo da linhagem. Países com uma alta produção de moluscos bivalves exigem, em suas regulamentações, a ausência de *Salmonella* spp. nos dos moluscos. O gênero *Shigella* apresenta uma dose infectiva baixa, que varia de 10 a  $10^2$  UFC/g de carne, com um longo período de sobrevivência no tecido dos moluscos. *E. coli* é utilizada como organismo indicador de contaminação fecal, mas algumas linhagens podem ser patogênicas, como a linhagem

O157:H7, produtora de uma toxina que pode causar síndrome urêmica hemolítica e morte (FELDHUSEN, 2000).

O que agrava esta situação é que a regulamentação corrente na maioria dos países exportadores para a qualidade dos moluscos e águas de cultivo é baseada somente em parâmetros bacterianos (coliformes e *E. coli*). No entanto, esses microrganismos somente indicam a presença de contaminação fecal, e, por isso, não apresentam total confiabilidade em relação à presença dos outros patógenos (MUNIAIN-MUJICA et al, 2002). Diante destes fatos, o ideal é sempre optar-se por algum processo de purificação antes da comercialização e consumo, como a depuração, na qual, através da filtração natural, os moluscos eliminam os patógenos em seus tecidos.

Além de doenças relacionadas com a presença de bactérias, vírus e protozoários, ainda há a possibilidade de doenças causadas por ingestão de moluscos bivalves contaminados por biotoxinas produzidas por esses microrganismos e também por microalgas, como dinoflagelados. Essas biotoxinas podem ser causadoras de diarreias (*Diarrhetic Shellfish Poison - DSP*) e paralisias (*Paralytic Shellfish Poison – PSP*), por exemplo (YEN et al.,2005).

### 1.3 Bactérias entéricas

A família *Enterobacteriaceae* inclui bactérias que habitam o trato gastrintestinal de humanos e de outros animais de sangue quente. Algumas espécies são residentes permanentes, outras são encontradas somente em uma fração da população e outras, ainda, são somente agentes de doenças. Alguns dos gêneros incluídos nesta família são *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia* e *Enterobacter* (TORTORA; KUNKE; CASE, 2002).

Esta família é distribuída mundialmente e apresenta uma ecologia bastante heterogênea, pois espécies desta família podem ser patógenos potenciais para humanos, para alguns animais invertebrados, como insetos, e até para vegetais. Um grande número de espécies causa doenças diarreicas, incluindo febre tifóide e disenteria bacilar. Outras, não são normalmente associadas a quadros de gastroenterites, mas são patógenos oportunistas, causando uma variedade de doenças como bacteremia, meningite, infecções urinárias e respiratórias. A família das enterobactérias é responsável por 50% das infecções nosocomiais,

que são freqüentemente causadas por *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. e *Serratia* spp. (BERGEYS MANUAL, 1994).

### 1.3.1 Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. É composto por bacilos com 0,7-1,5 x 2-5µm, gram negativos, usualmente móveis com flagelos peritríquios. Os organismos deste gênero são quimiorganotróficos, anaeróbios facultativos com metabolismo tanto fermentativo, como respiratório (BERGEYS MANUAL, 1994). São patógenos causadores de febre tifóide, febre entérica, gastroenterites e septicemia e, há muito tempo, esse gênero é reconhecido como um importante agente etiológico de doenças relacionadas a alimentos em todo o mundo (LI; BOUDJELLAB; ZHAO, 2000).

A classificação taxonômica deste gênero por muito tempo manteve-se confusa devido à diversidade existente, sendo isso uma barreira para a diferenciação em espécies. Atualmente, o gênero *Salmonella* é composto por 2.463 sorovares (ou sorotipos) reconhecidas internacionalmente. A classificação destes sorotipos é baseada em antígenos flagelares (H) e somáticos (O), além do antígeno capsular (Vi) (TIZARD, 2004).

Historicamente, sorovares de *Salmonella* spp. foram consideradas como espécies, e por essa razão, os nomes foram italizados. Na década de 70, análises moleculares das seqüências nucleotídicas demonstraram que as espécies eram intimamente relacionadas e, portanto, passaram a ser consideradas com uma espécie única, *Salmonella enterica*, surgindo mais tarde outras duas espécies, *S. bongori* e *S. subterranea*. A espécie *S. enterica* foi dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *houtanea*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *indica* e *S. enterica* subsp. *salamae*. Dentro das subespécies ocorre a divisão em sorovares, e as sorovares tipicamente associadas a salmonelose em mamíferos pertencem à subespécie entérica. Para simplificar a nomenclatura, quando citado primeiramente, os nome das espécies e subespécies devem aparecer preferencialmente por completo, incluindo o sorotipo, como exemplo *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium; e para as demais citações, pode-se apenas colocar *Salmonella* sorovar Typhimurium ou *S. Typhimurium*. O sorotipo deverá aparecer com a inicial maiúscula e não italizado (HAESEBRUCK et al., 2005).

Os sorotipos mais comuns em humanos são *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, sendo estes responsáveis por 75% dos casos das doenças. *S. Enteritidis* é muito associada ao consumo de produtos aviários, particularmente ovos, e, *S. Typhimurium* é relacionada à contaminação dos demais alimentos de origem animal. Alguns sorotipos, caracterizados pela presença de

genes de bacteriófagos inseridos em seu genoma (fagotipos), como o DT104, são multirresistentes e apresentam riscos à saúde pública (LIEBANA, 2002).

Dentro do gênero *Salmonella* nem todos os sorotipos são patogênicos, mas a patogenicidade está relacionada a uma variedade de fatores de virulência e resistência a antibióticos. Muitos dos fatores de virulência estão presentes em regiões denominadas ilhas de patogenicidade, localizadas no cromossomo bacteriano. No entanto, outros fatores são codificados em plasmídeos e bacteriófagos. A presença/ausência e a composição destes elementos genéticos móveis é que determinam os variados graus de virulência entre diferentes linhagens de *Salmonella*, mas fatores codificados cromossomicamente podem atuar na expressão dos fatores codificados nos plasmídeos. Os plasmídeos apresentam alto grau de plasticidade, o que pode ajudar na adaptação da bactéria a um ambiente particular ou a um hospedeiro específico. Esta flexibilidade torna os sorotipos de *Salmonella* spp. potencialmente mais perigosos, já que podem facilmente adquirir novos elementos genéticos, e adaptar-se ao ambiente (PATEL et al., 2005).

### **1.3.1.1 Transmissão e epidemiologia da salmonelose humana relacionada ao consumo de moluscos**

A incidência de salmonelose humana vem aumentando em várias partes do mundo, mesmo com todo o desenvolvimento tecnológico utilizado na produção de alimentos e adoção de melhores medidas higiênicas. De acordo com Guimarães et al (2001), apenas 10% do número real de casos de salmonelose são notificados e confirmados, pois nem sempre esses casos são devidamente diagnosticados pelo médico.

Em países desenvolvidos e nos em desenvolvimento, *Salmonella* é o gênero envolvido nos surtos de intoxicação alimentar e, na maioria dos casos, a intoxicação está associada ao consumo de ovos, carne de frango, de porco e de gado, e, mais recentemente, ao consumo de produtos da aquicultura. (IIDA et al., 1993; FELDHUSEN, 2000; DAL CERRO et al., 2002; BUTT; ALDRIDGE; SANDERS, 2004). Nos Estados Unidos, 7% dos casos de salmonelose estão diretamente ligados ao consumo de moluscos bivalves (BEAN et al., 1997).

De acordo com dados do FDA (*United States Food & Drug Administration*), de 1990 a 1998, foi observada a incidência de 1,3% de contaminação por *Salmonella* spp. em frutos do mar produzidos nos Estados Unidos e 7,2% nos produtos importados. Já no Japão, em 21%

dos pontos de cultivo de moluscos foi encontrada incidência deste patógeno. (KUMAR et al., 2003).

Nos Estados Unidos, as salmonelas causam, por ano, cerca de 1,3 milhões de casos, 15.000 hospitalizações e 500 mortes. Além disso, a emergência de salmonelas multirresistentes a drogas tem sido a causa de surtos de salmonelose nesse país (LI; BOUDJELLAB; ZHAO, 2000). O uso irrestrito de antibióticos, na criação de animais em fazendas, levou ao surgimento de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a múltiplos fármacos. Com isso, na década de 60, na Inglaterra, ocorreu o primeiro surto de salmonelose causada por uma cepa multirresistente, denominada DT29. O tratamento dos animais acometidos pela doença foi realizado com antibióticos, o que facilitou o aumento do espectro de resistência desta cepa. Já na década de 90, foi isolado o fagotipo DT104 em vários países, como Alemanha, Emirados Árabes, Filipinas e Estados Unidos, demonstrando o potencial das cepas multirresistentes de se difundirem rapidamente pelo mundo (RABSCH; TSCHAPE; BAUMLER, 2001; FLUIT, 2004;).

No Brasil, os surtos de doenças veiculadas por consumo de frutos do mar e água contaminados certamente ocorrem, mas os altos índices de subnotificação aliados ao grande número de turistas provenientes de diversas regiões do Brasil e do mundo contribuem para a falta de um maior conhecimento destes dados.

#### **1.4 Controle sanitário da produção de moluscos**

A legislação referente aos níveis aceitáveis de contaminação em águas destinadas à criação de moluscos bivalves e para os próprios moluscos varia de acordo com cada país. As normas vigentes, nos principais mercados produtores de moluscos no mundo, para a avaliação da qualidade sanitária dos frutos do mar cultivados para a comercialização são asseguradas pela análise físico-química das águas salinas, bem como pelo monitoramento dos níveis de coliformes que estejam presentes nas águas de cultivo e/ou dos próprios animais. Sendo assim, serão apresentadas a seguir as legislações nacional e internacional que norteiam esta produção.

### 1.4.1 Legislação Nacional

No caso do Brasil, de acordo com a atual legislação, a resolução n. 12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, não é realizada a avaliação de coliformes termotolerantes para moluscos “in natura”, exigindo unicamente a análise para *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva (ANVISA, 2001). A portaria nº. 685, de 27 de agosto de 1998 (BRASIL, 1998) estabelece os limites máximos de tolerância de contaminantes químicos para os alimentos. Para peixes e produtos de pesca, os metais pesados avaliados são antimônio, chumbo, arsênio, cobre, cádmio, cromo, mercúrio, níquel e zinco.

Os níveis de coliformes termotolerantes e *E. coli* é exigência somente para a qualidade das águas de cultivo, conforme resolução no. 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005). Nessa mesma resolução são dados os parâmetros físico-químicos das águas de cultivo que devem ser monitorados, como carbono orgânico total, pH, oxigênio dissolvido e presença de elementos químicos como os metais pesados chumbo e mercúrio.

A comercialização de moluscos bivalves para fora das 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 conseguí-lo o produtor precisa seguir uma série de determinações do Ministério da Agricultura, que vão desde medidas para construção das instalações, roupa utilizada por funcionários e uma certificação da qualidade microbiológica da origem dos moluscos (RIGOTTO, 2003).

O estabelecimento de um programa de monitoramento das águas de cultivo segue a legislação do CONAMA citada anteriormente. Para esse monitoramento, é necessário um mapeamento das áreas e avaliação, tanto microbiológica, como físico-química dessas águas. Para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a legislação preconiza que a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes na água de cultivo, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deve exceder 43 por 100 mL, e o percentil 90% não deve ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mL. Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras. A *E. coli* pode ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com

limites estabelecidos pelo próprio Conselho Nacional do Meio Ambiente. De acordo com Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA), a partir de 1995, o controle da qualidade das áreas de cultivo tornou-se responsabilidade dos próprios maricultores (SUPLICY, 1998).

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, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Agência Nacional, 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.

Devido ao crescente aumento da produção de moluscos bivalves no Brasil, torna-se necessário um monitoramento das águas de cultivo e de um controle de qualidade mais exigente, com a finalidade de agregar valor aos moluscos, que são amplamente consumidos pela população.

#### **1.4.2 Legislação Internacional**

A legislação internacional para a produção e comercialização de moluscos bivalves é extremamente rigorosa, considerando os altos números de casos de doenças vinculados ao consumo de frutos do mar contaminados (RICHARDS, 2003; YOUNGER; LEES; LEE, 2003). A maioria das nações que produzem alimentos de origem marinha apresentam legislação própria, baseadas em regulamentações de grandes mercados como a União Européia e os Estados Unidos.

A Diretriz Européia 91/492/EEC, de 15 de Julho de 1991 (EUROPEAN COMMUNITIES, 1991), estabelece as normas sanitárias que regem a produção e a colocação no mercado de moluscos bivalves vivos no mercado comum europeu. As áreas demarcadas para o cultivo são classificadas de acordo com a qualidade microbiológica da carne dos moluscos produzidos nestas áreas.

As áreas classificadas como classe A, apresentam 90% das amostras de moluscos coletadas para análise com uma concentração de coliformes fecais (CF) menor que 300 NMP/100g (número mais provável/ 100 g de carne) e uma concentração de *E. coli* menor que 230 NMP/100g. Neste caso, os moluscos provenientes destas áreas podem ser introduzidos



diretamente no mercado para consumo humano. As áreas nas quais os moluscos cultivados não excedem 6.000 NMP de CF por 100g e 4.600 NMP de *E. coli* por 100g, são classificadas como classe B. As áreas são classificadas como classe C se os moluscos apresentam um número entre 6.000 NMP e 60.000 NMP de CF por 100g de carne.

Conforme esta classificação, é avaliado qual tratamento deve ser utilizado para a produção de moluscos ser comercializada. A produção proveniente de áreas classe B devem ser colocadas no mercado somente após um tratamento em um centro de purificação ou após transposição para áreas de classe A por um tempo determinado pela regulamentação. Os moluscos cultivados em áreas de classe C devem, obrigatoriamente, passar por um período de, no mínimo, 2 meses de transposição, combinado com uma purificação.

Para que a produção de moluscos possa ser considerada adequada para a comercialização, além dos parâmetros citados acima, não deve apresentar *Salmonella* spp. em 25g de carne e ter sido analisada quanto à presença de elementos radioativos e toxinas paralisantes e diarréicas.

Os Estados Unidos apresentam um programa de controle sanitário da produção de moluscos bivalves (*National Shellfish Sanitation Program*), o qual apresenta medidas regulamentadas a partir de acordos comerciais interestaduais, reconhecidas pelo FDA (NSSP-FDA, 2003). Este programa tem por finalidade promover e valorizar a produção de moluscos no país, padronizando a regulamentação entre os Estados americanos.

A legislação americana baseia-se na qualidade microbiológica das águas de cultivo (NSSP-FDA, 2003). As áreas classificadas como aprovadas devem apresentar uma média geométrica, de no mínimo 2 amostras/ano, que não deve exceder 14 NMP CF/100mL. Nas áreas avaliadas como restritas, a média geométrica, de no mínimo 5 amostras anuais, não deve exceder 88 NMP/100mL. Se houver presença de fontes pontuais e não pontuais de poluição, as áreas podem ser avaliadas como condicionalmente aprovadas e condicionalmente restritas, significando que estas áreas necessitam de um plano diretor para adequarem-se às normas exigidas para a produção de moluscos (NSSP-FDA, 2003). A produção de moluscos provenientes de áreas classificadas como restritas, deve obrigatoriamente, como na legislação da União Européia, passar por um sistema de purificação ou ser transportada para áreas de qualidade microbiológica superior, previamente à sua introdução no mercado.

### 1.4.3 Métodos de purificação de moluscos bivalves

Os métodos de processamento têm sido o principal fator na redução das doenças relacionadas ao consumo de moluscos. As técnicas mais efetivas incluem o cozimento, a transposição, a depuração e alta pressão hidrostática. Esses métodos são praticados em diversos países europeus, assim como Estados Unidos, Austrália e Canadá.

O cozimento, incluindo a pasteurização e o envazamento, aumenta a validade do produto, considerando que o tratamento com altas temperaturas é eficiente para inativar bactérias e vírus. A pasteurização é praticada em moluscos desconchados que serão vendidos congelados (RICHARDS, 2001), bem como em moluscos enlatados (HARRISON, 2005).

O tratamento com alta pressão hidrostática é um novo conceito para desinfecção de moluscos, o qual necessita ainda de estudos para determinar a eficiência. Este tipo de tratamento tem demonstrado ser efetivo na eliminação de espécies do gênero *Vibrio* e de alguns vírus como Norovírus e Vírus da Hepatite A (LOPEZ-CABALLERO et al, 2000; KINGSLEY et al, 2002;). A alta pressão, apesar de matar os moluscos, não altera o sabor.

Os métodos de purificação que são amplamente utilizados e que mantêm os moluscos bivalves vivos são a transposição e a depuração. Ambos processos baseiam-se na capacidade de filtração dos moluscos, considerando que naturalmente serão eliminados os microrganismos de seus tecidos. De acordo com a legislação européia e norte americana, citadas anteriormente, o processo de transposição de moluscos provenientes de áreas de cultivo com alguma restrição microbiológica deve, obrigatoriamente, ser realizado em áreas de cultivo consideradas aprovadas microbiologicamente. Dependendo da qualidade da produção dos moluscos, esse processo deverá ser combinado com outro, denominado depuração. Durante o período de transposição, os moluscos naturalmente irão eliminar de seus tecidos os microrganismos contaminantes (RICHARDS, 1991).

### 1.5 Depuração de moluscos

Essa metodologia é bastante similar à transposição, no entanto é um processo monitorado, considerando que os moluscos não ficam diretamente no ambiente marinho, mas sim em tanques com água salina. A depuração de moluscos bivalves é praticada há

aproximadamente 100 anos e iniciou-se com a associação de surtos de febre tifóide ao consumo de moluscos crus no Reino Unido (RODRICK; SCHNEIDER, 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 (bombeamento da água pelo molusco), os patógenos presentes nos tecidos sejam excretados nas fezes e pseudofezes (RICHARDS, 1988). Há poucos trabalhos relacionados à pesquisas sobre a dinâmica de depuração de microrganismos por moluscos bivalves, portanto, maiores estudos nessa área são fundamentais.

Pesquisas sobre depuração de ostras e mexilhões indicaram que ocorre uma eliminação diferencial de espécies de bactérias, em relação ao tempo, e que a *E. coli* é a primeira a ser eliminada quando comparada a patógenos como *Vibrios* spp. e *Salmonella* spp. (MURPHREE, TAMPLIN, 1991; CROCI et al. 2002; MARINO et al, 2005). Da mesma forma, ocorre uma depuração preferencial de patógenos bacterianos com relação a patógenos virais. De acordo com os resultados demonstrados nos estudos de Power e Collins (1989) com mexilhões da espécie *Mytilus edulis*, em uma depuração de 52h, a eliminação do Poliovírus não foi efetiva, considerando que, neste mesmo tempo, a contaminação por *E. coli* diminuiu significativamente. De acordo com Doré e Lees (1995), em uma depuração , visando a eliminação de *E. coli* e bacteriófago F+ (sugerido como indicador de contaminação viral no ambiente), de ostras (*C.gigas*) e mexilhões (*M. edulis*), foram necessárias 6,5h para eliminar 90% das bactérias e cerca de 45h para a eliminação de 90% dos bacteriófagos.

Uma depuração bem sucedida depende do conhecimento de que parâmetros ambientais associados à qualidade da água utilizada podem interferir no resultado final. Apesar de a depuração ser um processo natural para os moluscos bivalves, pode-se melhorar os resultados se o ambiente ao qual os moluscos são expostos (tanques de depuração) for trabalhado de forma a minimizar as variações ambientais (RICHARDS,1991). A temperatura da água, a salinidade, o conteúdo de oxigênio dissolvido, a turbidez e a concentração de fitoplâncton podem afetar o processo de eliminação de patógenos. Esses fatores devem ser cuidadosamente controlados pois a atividade fisiológica, a taxa de filtração e as respostas comportamentais dos moluscos podem variar em resposta ao ambiente de depuração (RODRICK; SCHNEIDER, 2003). Conforme Rowse e Fleet (1984), a depuração de *E. coli* e de *Salmonella* spp. por *C. commercialis* (*Sidney Rock Oyster*) foi altamente afetada por diferentes salinidades e temperaturas, sendo mais efetiva em temperaturas entre 18° - 22°C e salinidades entre 3,2 - 4,7‰.

### 1.5.1 Sistemas de depuração

Existem basicamente três tipos de sistemas de depuração: os tanques de depuração que funcionam com água limpa e fresca injetada continuamente através de uma bomba (sistema de fluxo contínuo), os tanques onde a água pode ser substituída em intervalos determinados (*Batch-process*) ou ainda tanques com água recirculada (sistema fechado de circulação) (RICHARDS, 2003).

O fluxo contínuo é o mais econômico caso os sistemas de depuração estejam localizados em locais próximos a fonte de água limpa, mas apesar disso, o uso de um tratamento de desinfecção prévio da água, como ultra-violeta e cloração, melhora a eficiência do processo. O *batch-process*, assim como o fluxo contínuo também apresenta a necessidade de uma fonte adequada de água, mas a ausência de movimentação dessa água nos tanques torna esse processo ineficiente. Os sistemas fechados de circulação de água, são os mais utilizados e necessitam igualmente de uma fonte de água limpa, mas essa água, uma vez coletada é recirculada pelo sistema, passando, durante o processo de recirculação, por tratamentos para descontaminação. (RODRICK; SCHNEIDER, 2003, RICHARDS, 2003).

Um vantagem do sistema fechado em relação ao de fluxo contínuo é a reutilização da água, o que evita o uso de grandes volumes de água marinha e de todo o processo de descontaminação anterior à liberação no ambiente. No entanto, nesse tipo de sistema há a possibilidade de produção de metabólitos tóxicos, como amônia. Além disso, há a necessidade de um controle mais preciso da demanda biológica de oxigênio, variação do pH e da formação de fezes e pseudofezes, as quais são fontes primárias de microrganismos.

Os principais aspectos a serem considerados na escolha do sistema são o custo de implantação, custo operacional, facilidade e custo de manutenção, desempenho (eficiência), efeitos residuais e tempo de contato necessário (SUPLICY, 1998). Com a diminuição da qualidade das águas costeiras, os sistemas de fluxo contínuo e *batch-process* estão mais raros, sendo, então, o sistema de recirculação o mais utilizado atualmente (RICHARDS, 2003).

### 1.5.2 Parâmetros controlados no processo de depuração

Em geral, o metabolismo dos moluscos é diretamente afetado pela temperatura do ambiente onde eles se encontram. Dependendo da espécie, com uma diminuição de temperatura, os moluscos podem ficar menos ativos e a remoção de contaminantes, como resultado, é diminuída. A manutenção da temperatura adequada é um fator crítico para a garantia de uma depuração bem sucedida. Cada espécie de molusco apresenta uma taxa de filtração dentro de uma faixa de temperatura a qual muitas vezes é substancialmente diferente entre as espécies. Moluscos obtidos de águas mais frias certamente apresentarão uma temperatura ótima de depuração menor que moluscos cultivados em águas mais aquecidas. (RICHARDS, 1991; DORÉ, 2001; RODRICK, SCHNEIDER, 2003). A ostra do pacífico (*C. gigas*), pode ser purificada com maior eficiência em temperaturas na faixa de 18°C a 22°C. Em geral, a temperatura adequada não deve variar daquela presente nas águas de origem do molusco (DORÉ, 2001).

A salinidade da água utilizada na depuração também é um fator crítico. Da mesma forma que a temperatura, a salinidade afeta a filtração e outros processos fisiológicos dos moluscos (MARINO et al., 2005). Conforme o *National Shellfish Sanitation Program* (NSSP-FDA, 2003), caso a salinidade da água para a depuração seja diferente da de onde os moluscos são coletados, haverá a necessidade de uma aclimatação antes de iniciar a depuração. Esse período de aclimatação é variável, mas deve ser o suficiente para que a atividade normal de filtração do molusco seja estabelecida. É recomendado que a salinidade não varie mais que 20% da salinidade da área de cultivo dos moluscos.

Para facilitar a atividade filtradora normal dos moluscos no processo de depuração, o oxigênio deve ser suficientemente suprido na água. O nível mínimo necessário de oxigênio dissolvido é de 50% de saturação. Por causa da demanda por oxigênio durante a depuração, este deve ser fornecido durante todo o processo, em uma taxa constante. Isto pode ser feito tanto por aeração como por borrifação diretamente na superfície do tanque. No entanto, deve-se produzir o mínimo de perturbação no tanque, já que o movimento da água acarreta movimentação das fezes e pseudofezes, assim como a produção de bolhas de ar podem inibir as trocas gasosas entre as brânquias e o ambiente. A solubilidade do oxigênio diminui com o aumento da temperatura e da salinidade. Sendo assim, é necessário controlar conjuntamente todos esses fatores (RICHARDS, 1991; RODRICK, SCHNEIDER, 2003).

Com a constante taxa de filtração dos moluscos, durante a depuração, ocorre a excreção de fezes e pseudofezes, as quais são identificadas como biodepósitos, pois são reservatórios potenciais de microrganismos e recontaminam os moluscos, tornando o processo de depuração mais longo. Caso o fluxo de água na depuradora diminua, os níveis de oxigênio caem rapidamente e pode ocorrer a produção de sulfeto de hidrogênio, e isso leva a intoxicação dos moluscos. Além disso, um alto grau de turbidez na água impede a descontaminação da água pela luz ultra violeta, já que os raios não conseguem penetrar e inativar os contaminantes (DORÉ, 2001).

### **1.5.3 Tratamentos da água**

#### **1.5.3.1 Desinfecção Química**

O tratamento químico da água utilizada nos sistemas de depuração é uma estratégia mais barata que outros tratamentos, no entanto, vários parâmetros devem ser considerados ao usar desinfetantes químicos, como exemplo, os subprodutos provenientes de reações químicas que venham a surgir durante o processo (RICHARDS, 1991).

O primeiro método de desinfecção química da água, utilizada para a purificação de moluscos, foi a cloração, por causa da conhecida capacidade desinfetante e da fácil manipulação. No entanto, o uso de formas livres de cloro tem sérias restrições, pois como muitos outros fatores, também afeta a capacidade de filtração dos moluscos. De acordo com Dogson, citado por Rodrick e Schneider (2003), foi detectado que, em contato com água clorada, mexilhões diminuam a taxa de filtração. Nesse mesmo estudo, foi observado que mesmo baixos níveis de cloro (aproximadamente 0,2ppm), limitavam muito ou cessavam completamente a atividade de filtração de ostras.

A estratégia para eliminar os efeitos do cloro sobre os moluscos é neutralizá-los com a adição de tiosulfato de sódio, mas, mesmo assim, esse sal também pode apresentar uma pequena taxa de inibição de filtração (BOYD, 1996). Além disso, o uso de água clorada pode apresentar efeitos sobre a qualidade do produto final, pois a aparência e o gosto dos moluscos podem ser modificados. A depuração com esse sistema de tratamento de água não é

amplamente utilizada e a maioria dos países opta pelo uso de outros métodos como radiação ultra violeta e gás ozônio (BLOGOSLAWSKI, 1983).

A utilização de gás ozônio no tratamento das águas nos sistemas de depuração é bastante freqüente na França e na Austrália. A grande vantagem do ozônio sobre o tratamento com cloro é a não alteração no gosto e na aparência dos moluscos. Quando esse gás entra em contato com os microrganismos, ele age imediatamente e inativa - os, podendo ainda reagir com outros compostos presentes na água do mar, e aumentar o efeito desinfetante. Além do uso do ozônio para inativar vírus e bactérias, a utilização deste também proporciona a oxidação de toxinas produzidas por dinoflagelados marinhos (RODRICK, SCHNEIDER, 2003). Poucas informações são fornecidas sobre o uso de iodóforos para o tratamento da água de depuração. De acordo com Richards (1991), uma rápida redução da presença de bactérias é observada na água de tanques de depuração com 0.1-0,4mg/L de iodóforos, e não ocorre efeitos adversos na filtração dos moluscos.

### **1.5.3.2 Esterilização com Radiação Ultra Violeta**

O processo de esterilização da água para depuração pelo tratamento com luz ultravioleta (UV) é um método amplamente utilizado nos Estados Unidos e Reino Unido (RODRICK, SCHNEIDER, 2003). Os raios ultravioleta são conhecidos por atuar sobre os ácidos nucléicos, causando danos progressivos à célula bacteriana. O principal mecanismo de ação da radiação UV é a quebra da estrutura de dupla- hélice do DNA e a formação de dímeros de timina. Quando a célula absorve uma alta dose de radiação, ocorre a ruptura da membrana celular, causando a morte biológica da mesma. No entanto, para doses menores de radiação, ocorre uma absorção por nucleoproteínas e ácidos nucléicos, o que causa uma transformação fotoquímica das bases pirimídicas, a qual produz ligações sucessivas entre timinas na cadeia de DNA, formando dímeros. Essa transformação afeta a capacidade de replicação do microrganismo, tornando-o não infeccioso, mas não resulta na total morte celular (UPADHYAYA et al., 2004).

Para muitas espécies de microrganismos, o efeito biocida é maior na faixa entre 250 e 280nm, mas comprimentos de onda na faixa de 320-400nm podem produzir efeitos de reparo no DNA (HERRINGTON, 1991). Vários estudos têm demonstrado que a utilização dessa metodologia se mostra eficaz para inativar bactérias e vírus (POWER; COLLINS, 1989;1990;

DORÉ, LEES, 1995). O efeito bactericida desta radiação foi avaliado por Murphree e Tamplin (1991), cujo estudo demonstrou que, para *V. cholerae*, *E. coli* e *S. Tallahasee*, o uso de UV foi efetivo, mas em tempos diferenciados de tratamentos. Para eliminar aquelas bactérias, foram necessárias 3,5, 1,0 e 2,5h, respectivamente, de contato da água semeada com bactérias com a radiação UV. No entanto, o tempo indicado para a garantia de uma água estéril é de, no mínimo, 12h de contato com a luz ultravioleta (DORÉ, 2001).

As limitações ao uso de radiação UV são a turbidez, a cor e sais dissolvidos na água. Esses fatores afetam a transmissão eficaz dos raios UV pelo meio ambiente aquático, reduzindo, portanto, a ação biocida deste processo na coluna de água. No entanto, apesar destas limitações existirem, o uso de UV ainda é a metodologia de escolha para descontaminação da água nos sistemas de depuração (RODRICK, SCHNEIDER, 2003).

## **1.6 Metodologia de detecção de microrganismos patogênicos em amostras ambientais**

A ocorrência de organismos patogênicos nos moluscos e nas águas de cultivo pode ser muito subestimada devido à ineficiência dos métodos para detecção de contaminação em alimentos (NORDSTROM; DE PAOLA, 2003). Convencionalmente, patógenos associados a moluscos bivalves são identificados por métodos baseados em técnicas de cultivo em meios de cultura seletivos e não seletivos, seguidos de análises morfológicas e bioquímicas. Dependendo do organismo a ser isolado, o tempo de crescimento em meios de cultivo pode variar entre dois dias a uma semana, e os testes bioquímicos podem demorar oito dias (ROSSEN et al., 1992). Esses métodos apresentam baixas especificidade e reprodutibilidade, além de serem pouco sensíveis, exaustivos e laboriosos.

Um exemplo do emprego desses métodos clássicos é a detecção da presença de *Salmonella* spp. De acordo com o *Bacteriological Analytical Manual* (2005), fornecido por *U.S. Food & Drug Administration*, para esses procedimentos são utilizados cinco diferentes meios de cultivo para o crescimento inicial, 12 meios para os testes bioquímicos, além de testes sorológicos. Um resultado positivo pode demorar uma semana para ser confirmado.

A técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) permite uma detecção rápida e seletiva de microrganismos em diferentes matrizes, por detectar fragmentos específicos de genes. O principal ponto positivo para justificar a detecção de microrganismo em alimentos usando PCR é a sua alta sensibilidade e especificidade. A sensibilidade desta



técnica depende, não somente das condições de reação, mas principalmente da composição da amostra e do método de extração do DNA (SHEU; BERGHOF; STAHL, 1998).

Os métodos baseados na visualização dos produtos de amplificação gênica em gel de agarose são normalmente menos sensíveis que os métodos baseados na detecção por sondas. Por isso, a utilização combinada desses dois métodos aumenta a confiabilidade do resultado, podendo assim ser feita a detecção também de organismos que não podem ser identificados por métodos convencionais, ou não são cultiváveis em substratos artificiais (BEJ, 2003).

Devido à natureza complexa das amostras ambientais, a recuperação de ácidos nucleicos com suficiente pureza tem sido um desafio para os pesquisadores. A presença de inibidores enzimáticos, que são prevalentes nos tecidos dos moluscos, como lipídios e carboidratos, dificultam a detecção de pequenas concentrações de patógenos. Por isso, são necessários trabalhos extensivos de extração do DNA, com muitas diluições das amostras e/ou processos de enriquecimento (ROSSEN et al., 1992; SHEU; BERGHOF; STAHL, 1998; BLACKSTONE et al., 2003;).

Sendo assim, os avanços biotecnológicos tem permitido o desenvolvimento de novos métodos com a finalidade de diminuir o tempo de detecção, aumentar a sensibilidade e a especificidade de detecção além de avaliar com mais acuracidade a eficiência dos métodos de depuração de patógenos. Sendo assim, os métodos tradicionais têm sido gradativamente substituídos por kits enzimáticos de detecção rápida e ainda pelas técnicas moleculares baseadas na detecção do DNA bacteriano através de sondas específicas em reações de hibridização molecular, precedidas pela amplificação gênica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência de um sistema de depuração comercial de ostras de cultivo (*Crassostrea gigas*), artificialmente contaminadas por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, através da detecção deste patógeno por métodos microbiológicos clássicos e métodos moleculares

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar se o processo de depuração idealizado pela empresa BWA foi efetivo, para que ostras contaminadas atingissem o padrão microbiológico de ausência de *Salmonella* spp., através de 3 diferentes tratamentos da água utilizada neste sistema de depuração;
- Otimizar a técnica de extração de DNA e a reação de PCR, utilizando cepa de *S. Typhimurium* cultivada no laboratório e extratos de ostras artificialmente contaminados;
- Padronizar a hibridização molecular como avaliação confirmatória da reação de PCR para a detecção de *S. Typhimurium* no tecido digestivo de ostras;
- Verificar os limites de sensibilidade da reação de PCR e da hibridização molecular para a detecção de *S. Typhimurium*;
- Verificar a capacidade de bioacumulação e de depuração de *S. Typhimurium* por ostras *C. gigas*, através de técnicas microbiológicas clássicas;
- Monitorar o processo de depuração através de técnicas microbiológicas clássicas, combinadas com amplificação gênica;
- Avaliar a qualidade das águas de cultivo e da carne dos moluscos produzidos em um ponto de cultivo da Ilha de Florianópolis, através do uso de kits comerciais de detecção microbiológica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### Material Biológico

#### 3.1 Bactérias

##### 3.1.1 *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium

A cepa bacteriana *S. Typhimurium* (ATCC 14028) utilizada nos experimentos foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia Médica, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina.

##### 3.1.2 Crescimento, manutenção e quantificação da cepa bacteriana de *Salmonella Typhimurium*

As cepas de *S. Typhimurium* permaneceram estocadas em tubos de 1,7mL, no Laboratório de Virologia Aplicada, em freezer a -20°C, em meio de cultura Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI, OXOID), suplementado com 30% de glicerol. Para seu crescimento, foram descongeladas à temperatura ambiente. Uma vez descongeladas, as cepas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultivo BHI. Com o uso de uma alça de platina esterilizada, foi realizada a inoculação a partir de uma alçada. O inóculo foi incubado por 16h/37°C, para que o crescimento bacteriano chegasse à fase estacionária. A partir desse período de incubação, foi possível quantificar o inóculo utilizando a metodologia do plaqueamento em superfície, realizando-se o experimento em triplicatas. Um mL do inóculo bacteriano em fase estacionária de crescimento, foi diluído seriadamente, em 9mL de solução salina 0,85%, até a diluição  $10^{-8}$ . Em seguida, 0,1mL de cada uma dessas diluições, foi espalhado, com o auxílio de uma alça de Drigalski, na superfície de uma placa de petri contendo o meio de cultivo Ágar XLD (Xilose-lisina-desoxicolato de sódio, OXOID). Todas

as placas semeadas foram incubadas por 24h/37°C, para a posterior contagem de colônias. O resultado foi expresso em UFC/mL

### **3.2 Ostras**

As ostras da espécie *Crassostrea gigas* foram produzidas na fazenda de cultivo Água Marinha, localizada em Cacupé, ao norte da Ilha de Florianópolis/SC, sendo adquiridas pela empresa BWA.

#### **3.2.1 Dissecção do tecido digestivo das ostras**

Para a padronização das análises moleculares, as ostras foram dissecadas com a finalidade de se trabalhar somente com o tecido digestivo. Para a dissecção, as valvas foram abertas com auxílio de uma espátula estéril em ambiente asséptico (capela de fluxo laminar). Com o auxílio de bisturi e de uma pinça estéreis, a carne das brânquias e do manto foram retiradas para a separação do tecido digestivo, o qual foi imediatamente transferido para tubos de 50mL, mantidos em uma caixa com gelo. Após a dissecção, os tecidos obtidos foram homogeneizados com um homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax (Modelo T25 basic, IKA Labortechnik), para a obtenção de uma solução tecidual líquida e homogênea.

### **Metodologias para Detecção de *S. Typhimurium***

#### **3.3 Isolamento do material genético a partir da cultura pura de *S. Typhimurium***

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Chen et al (2000) com modificações. Para esse procedimento, 1,5mL de uma cultura de *S. Typhimurium*, em fase estacionária de crescimento, foram centrifugados a 1.400 ×g por 5min, em temperatura ambiente. O precipitado obtido foi ressuspenso em 564µL de tampão TE (Tris 10mM-EDTA 1mM) e, após, foram adicionados 30µL do detergente dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS 10%), na concentração final de 0,5%, e 6µL de proteinase K 10mg/mL, na

concentração final de 0,1mg/mL. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 56°C, durante 60min.

Após o período de incubação, 100µL de NaCl 5M (concentração final de 0,6M), e 80µL de brometo de cetiltrimetilamônio a 10% (CTAB 10%), em 0,7M de solução de NaCl, na concentração final de 1%, foram adicionados e agitados. Em seguida, os microtubos foram transferidos para um banho-maria a 65°C, por 10 min. Depois desta incubação, igual volume de uma solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, na proporção de 25:24:1, foi adicionado e os tubos foram agitados e centrifugados por 10min, a 14.000 ×g, a 4°C. Os sobrenadantes aquosos resultantes da centrifugação foram transferidos para novos microtubos, nos quais foi adicionado igual volume de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados por 10 min, a 14000 ×g, a 4°C. Os sobrenadantes, após a centrifugação, foram novamente transferidos para novos tubos. Para a precipitação do DNA, 2 volumes de isopropanol foram adicionados em cada tubo, os quais foram centrifugados por 12min, a 20.000 ×g a 4°C. Depois da precipitação, o isopropanol foi removido e o DNA precipitado foi lavado com 200µL de etanol a 70%. Após a remoção deste álcool, os ácidos nucleicos precipitados foram secos ao ar, ressuspensos em 100µL de tampão TE e congelados em freezer a -20°C.

A análise da integridade do DNA extraído foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e fotografados (*KodaK Color System*) em transluminador sob luz UV. O padrão de peso molecular utilizado na análise eletroforética foi o padrão comercial 1Kb *ladder* (Sigma, *Chemical Co.*).

### **3.4 Quantificação do DNA total de *S. Typhimurium***

A concentração do DNA bacteriano foi medida em espectrofotômetro Ultrospec 3.000 (*Pharmacia Biotech*), através da leitura da densidade óptica (D.O.), nos comprimentos de onda 260 e 280nm, simultaneamente para avaliar a quantidade e a qualidade do DNA extraído (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A contaminação por fenol foi analisada por leitura da amostra a 320nm.

### 3.5 Reação de PCR para a detecção de *S. Typhimurium*

A padronização da PCR foi feita a partir do DNA genômico purificado diretamente do inóculo bacteriano. Foi realizada com o uso dos iniciadores Salm3 (5'-GCT GCG CGC GAA CGG CGA AG-3') e Salm4 (5'-TCC CGG CAG AGT TCC CAT T-3'), que amplificam um fragmento de 387 pares de bases e flanqueiam uma sequência conservada do gene *invA* de *Salmonella* spp. Este gene foi primeiramente caracterizado por Galan et al. (1992) e codifica uma proteína responsável pela invasão de células epiteliais. Estes iniciadores, de acordo com Cocollin et al (1998), demonstraram alta especificidade para *Salmonella* spp. em condições experimentais.

Para realizar a reação de PCR, a mistura dos reagentes foi previamente preparada em tubos estéreis, em ambiente adequado. A mistura de reação para a PCR foi composta de Tampão de reação de PCR (Tris-HCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, KCl 50 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM) na concentração final 1X, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), concentrações variadas de cada um dos iniciadores, 0,5U de Taq DNA polimerase (Biotools, Madrid) e água milliQ autoclavada em quantidade suficiente para completar o volume de 50µL por tubo.

Um volume de 45µL desta mistura foi distribuído em microtubos estéreis de 0,2mL e adicionou-se 5µL do DNA extraído. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas brevemente. A mistura foi submetida a 30 ciclos no termociclador (*Mendel Thermal Cycler, Techne*). As variáveis para um ciclo de amplificação foram de desnaturação por 30s a 94°C, ligação dos iniciadores por 30s a 62°C e extensão por 2min, a 72°C. Após o último ciclo, a mistura foi incubada por 10min a 72°C para extensão final. Foram utilizados controles negativos (isentos de DNA) e positivos (DNA purificado) em todos os experimentos da PCR.

#### 3.5.1 Visualização dos produtos de amplificação de DNA isolado de *S. Typhimurium*

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris/Borato/EDTA 1X (Tris-HCl 0,09M; ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M) (SAMBROOK, RUSSEL, 2001).

Uma alíquota de 10 $\mu$ L de cada amostra foi misturada a 2 $\mu$ L de tampão de corrida 6X (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%p/v em água Milli-Q), aplicadas ao gel e submetidas a uma corrida eletroforética em voltagem constante de 100V, em presença de tampão TBE 1X. Simultaneamente às amostras, foi aplicado no gel, 10 $\mu$ L um marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega), na concentração de 30ng/ $\mu$ L. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo (Sigma) a 1 $\mu$ g/mL em água. Os produtos amplificados foram expostos à luz UV em transluminador Pharmacia Biotech<sup>®</sup> e fotodocumentados com aparelho digital *Kodak Image System*. Um resultado positivo foi indicado por uma banda fluorescente no nível de 387pb.

### **3.5.2 Curva de concentração dos iniciadores na reação de PCR para a detecção de *S.Typhimurium***

Com a finalidade de otimizar a reação de PCR, foi realizada uma curva de iniciadores na reação de PCR. Para a realização deste procedimento, foram preparados tubos de reações, conforme descrito no item 3.5 contendo diferentes concentrações dos iniciadores. As concentrações dos iniciadores variaram de 10 a 50 pmoles. A concentração de iniciadores que apresentou um melhor perfil de amplificação do DNA após observação em gel de agarose 1,5% (brilho da banda, ausência de contaminação e de bandas inespecíficas) foi utilizada nos experimentos subseqüentes.

### **3.6 Hibridização Molecular para detecção do DNA amplificado de *S. Typhimurium***

A sonda utilizada na hibridização molecular foi o produto íntegro de 387pb de *S. Typhimurium*, marcado com digoxigenina (DIG), conforme descrito no item 3.6.1.

### **3.6.1 Produção e marcação da sonda de 387 pb referente ao produto de amplificação de *S. Typhimurium***

A produção de sondas não radioativas que foram utilizadas nos procedimentos de hibridização molecular foi realizada por PCR. Para esse procedimento, foi preparada uma solução de 10X dNTP 2mM, sendo que a proporção dUTP-DIG: dTTP foi de 1:20. Na reação de PCR, a concentração final foi de 1X esta solução (0,2mM). O protocolo para a reação de PCR foi realizado de acordo com os procedimentos descritos no item 3.5, utilizando-se 20 pmoles de cada iniciador.

Após esse procedimento, 1 $\mu$ L da reação foi retirado para testar a eficiência da marcação. Para isso, o procedimento de detecção foi realizado por detecção imunológica, conforme será descrito no item 3.6.5. Para verificar a eficiência de amplificação, 5 $\mu$ L foram utilizados para uma análise eletroforética em um gel de agarose, como descrito no item 3.5.1. O volume restante foi precipitado com acetato de sódio 3M, na concentração final de 0,3M, e 2,5 volumes de etanol 100%. A precipitação foi realizada por incubação por 30min a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou 2h a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Depois foi feita uma centrifugação a 14.000  $\times g$  por 30min, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após esse passo, o DNA foi seco e hidratado em 50 $\mu$ L de TES (10mM Tris, 1mM EDTA, SDS 10%, pH 7,5).

### **3.6.2 Aplicação dos produtos de PCR de *S. Typhimurium* em membrana de nylon**

#### **3.6.2.1 *Southern-Blot***

Os géis contendo os produtos de PCR corados com brometo de etídeo foram mergulhados por 15min, em solução de desnaturação (0,5M NaCl, 0,5M NaOH) em temperatura ambiente, sob agitação, para a desnaturação do DNA contido nos géis. Logo após, foi feita a imersão em solução de neutralização (0,5M Tris-HCl pH 7,5; 1,5M NaCl) por 15min, em temperatura ambiente sob agitação.

Os produtos de PCR contidos nos géis foram transferidos para duas membranas simultaneamente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O gel foi nivelado com o auxílio de um bisturi; as membranas e o gel foram umedecidos em tampão de transferência 2X SSC e a



transferência foi realizada por 18-20h para uma membrana de nylon carregada positivamente (Sigma). A fixação dos produtos de PCR na membrana de nylon após a transferência foi realizada com o uso do forno de ultravioleta Crosslinker UV500 (Amersham Biosciences), com uma lâmpada de 254nm, a uma intensidade de 150.000 $\mu$ J/cm<sup>2</sup>.

### **3.6.3 Procedimento de Hibridização Molecular da sonda marcada por digoxigenina aos produtos de PCR de *S. Typhimurium***

#### **3.6.3.1 Pré-Hibridização**

As membranas foram pré-hibridizadas em solução 5X SSC, 0,02% dodecil sulfato de sódio (SDS), 1% de solução bloqueadora e 0,1% de Lauryl Sarcosina de Sódio (SLS), a 65°C, por 60min, por 2X.

#### **3.6.3.2 Hibridização**

A hibridização foi realizada por 16h, a 65°C, sob agitação constante no mesmo tampão descrito para a pré-hibridização acrescido da sonda. Para a hibridização com a sonda de 387pb, foi utilizado um volume de 4 $\mu$ L da sonda para cada 1mL de solução de hibridização. Esta sonda, antes de ser utilizada, foi desnaturada por aquecimento a 100°C por 10min e colocada imediatamente no gelo por 5min, para prevenir a renaturação da mesma. Posteriormente, a membrana foi lavada 2X por 15min, em solução de lavagem 1 (2X SSC, 0,1% SDS) à temperatura ambiente. Depois, foi lavada mais 2X por 15min, em solução de lavagem 2 (0,5X SSC, 0,1% de SDS) à 65°C, sob agitação.

#### **3.6.4 Detecção Imunológica**

Inicialmente, a membrana foi embebida em solução de lavagem para detecção (0,1M Ácido Maléico, 0,15M NaCl, 0,3% de Tween 20, pH 7,5), por 5min. O procedimento de detecção iniciou-se com a incubação da membrana em solução bloqueadora (1% em Tampão

de ácido maléico), por 30min, seguido de incubação com solução do anticorpo anti-DIG diluído (1:10,000) por 30min. Após esses procedimentos, a membrana foi lavada 2X por 15min em tampão de lavagem para detecção. Por fim, a membrana foi equilibrada por 2-5min em tampão de detecção (0,1M Tris, 0,1M NaCl, pH 9.5) e depois incubada em solução do substrato (18,75mg/mL Nitro blue Tetrazolium/9,4mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolylphosphate em 10mL do tampão de detecção), no escuro e sem agitação. A reação colorimétrica desenvolveu-se entre 5min e 16h. Quando a coloração tornou-se azul intensa, a reação foi interrompida pela adição de água destilada. As membranas foram secas em papel filtro e fotodocumentada.

### **3.7 Determinação do limite de sensibilidade da detecção do DNA de *S. Typhimurium*, por PCR**

Foram realizadas diluições seriadas decimais da cultura pura, em fase estacionária de crescimento, de *S. Typhimurium* em solução salina 0,85 %. As diluições seriadas variaram de  $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ , e de cada diluição, 1mL foi utilizado para a extração do DNA bacteriano, seguida de PCR, de acordo com os itens 3.3 e 3.5. A quantificação bacteriana foi realizada a partir do plaqueamento de 100 $\mu$ L das mesmas diluições, com alça de Drigalski, em placas de meio de cultivo Agar XLD, incubadas a 37°C, por 24h.

### **3.8 Recuperação e isolamento do material genético bacteriano a partir de tecido digestivo de ostras contaminadas artificialmente por *S. Typhimurium***

Esta metodologia foi desenvolvida de duas maneiras: com enriquecimento prévio e sem enriquecimento em meios de cultivo. Para as duas técnicas, o homogenato do tecido digestivo de ostras foi contaminado com diferentes concentrações de células de *S. Typhimurium*. Após a extração do DNA, foi realizada a PCR conforme descrito no item 3.5.

### **3.8.1 Detecção do DNA de *S. Typhimurium* diretamente de tecido digestivo dissecado de ostras**

Para esse procedimento, amostras de 1g de tecido digestivo de ostra homogeneizado foram inoculadas com  $2 \times 10^8$ ,  $10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$  e  $10^7$  UFC de *S. Typhimurium*. A extração do DNA bacteriano foi realizada conforme descrito anteriormente no item 3.3, com algumas modificações. Resumidamente, a extração do DNA bacteriano foi realizada a partir da adição de proteinase K e SDS nas amostras de tecido digestivo de ostras, seguida de incubação por 1h a 56°C, sem uma centrifugação inicial, para reduzir a densidade do extrato tissular. Após esta digestão proteolítica, foram adicionados 100µL de NaCl 5M (concentração final de 0,6M), e 80 µL de brometo de cetiltrimetilamônio a 10% (CTAB 10%), em 0,7M de solução de NaCl, na concentração final de 1%. Em seguida, os microtubos foram transferidos para um banho-maria à 65°C, por 10min. Anteriormente à extração dos ácidos nucléicos, conforme item 3.3, foi adicionado 1 volume de triclorotrifluoretano (Freon<sup>®</sup>), como agente clarificante, e os tubos centrifugados a 14.000 ×g. O procedimento de precipitação do DNA foi idêntico ao apresentado no item 3.3.

### **3.8.2 Detecção do DNA de *S. Typhimurium* a partir de um enriquecimento em meios de cultura da amostra de tecido digestivo dissecado de ostras**

Foram utilizados o meio de cultura não seletivo Caldo Lactosado (OXOID), e o meio de cultura seletivo Rappaport-Vassiliadis (OXOID). Para o enriquecimento não seletivo, tubos de ensaio contendo 9mL de meios foram semeados com 1g dos extratos de ostras contaminados com  $10^7$  e  $10^8$  UFC de *S. Typhimurium*. A incubação foi feita sempre a 37°C, por 16h. Após a incubação, 1,5mL do enriquecimento foram coletados para extração do DNA, conforme protocolo descrito no item 3.3. A partir do enriquecimento não seletivo, 0,1mL da cultura foram transferidos para um tubo de ensaio contendo o meio de cultura seletivo. A incubação foi por um período de 16h a 42°C, seguida da coleta de 1,5mL do cultivo em meio de enriquecimento para posterior extração do DNA.

### **3.8.3 Distintos períodos de incubação em meio de cultura na detecção do DNA de *S. Typhimurium* em tecido digestivo dissecado de ostras**

Após a análise dos protocolos de recuperação, isolamento e purificação de DNA a partir de tecido digestivo dissecado de ostras foi analisado qual o melhor tempo de crescimento bacteriano para detectar a contaminação, utilizando o protocolo melhor avaliado. Para isso, amostras de 1g de tecido digestivo de ostra contaminado com *S. Typhimurium* foram incubadas a 37°C, durante 0h, 2h, 4h, 6h, 16h e 24h. Em cada período, uma alíquota de 1,5mL do cultivo foi coletado para a extração do DNA e posterior detecção por PCR.

### **3.9 Determinação do limite de sensibilidade da PCR e Hibridização Molecular para detecção da *S. Typhimurium* em tecido digestivo de ostras**

Após a escolha do protocolo melhor avaliado para a detecção de *S. Typhimurium* em tecido digestivo de ostras, foi determinado o nível de sensibilidade desta técnica. Essa determinação foi realizada pela metodologia de inoculação direta de *S. Typhimurium* no tecido dissecado de ostras.

Nesse procedimento, alíquotas de 1g do tecido digestivo dissecado foram inoculadas com diferentes diluições de *S. Typhimurium*, nas concentrações finais de  $10^7$ UFC/g a  $10^2$ UFC/g de tecido digestivo. Essas alíquotas foram adicionadas em 9mL de meio de cultivo Caldo Lactosado e incubadas por 18h em estufa a 37°C. Após a incubação, 1,5mL do meio foi coletado para a extração do DNA bacteriano. Para a contagem do número de células correspondente a cada diluição foram feitas as mesmas diluições e de cada uma, 100µL foram espalhados, com alça de Drigalski, em meio de cultura sólido Ágar XLD (OXOID), incubadas a 37°C, por 24h.

A detecção de *S. Typhimurium* foi realizada por PCR e Hibridização Molecular. A maior diluição, na qual foi possível a detecção bacteriana por PCR e/ou Hibridização Molecular, foi considerada como o limite de sensibilidade da técnica para cada um destes métodos. Uma amostra de tecido digestivo não inoculado foi utilizada como controle negativo.

### **3.10 Ensaios de bioacumulação de *S. Typhimurium* por ostras *C.gigas***

#### **3.10.1 Aquários e Ostras**

Para os ensaios de bioacumulação, previamente aos experimentos de depuração, as ostras foram recolhidas no mesmo dia em que os experimentos foram realizados. As ostras escolhidas apresentavam valvas bem fechadas e sempre foram lavadas com jato de água sob pressão para eliminar resíduos presentes na parte externa das conchas. Imediatamente após a coleta, as ostras foram colocadas em um aquário de dimensões: 55 x 45 x 30cm, contendo 30L de água do mar, com aeração constante.

#### **3.10.2 Bioacumulação de *S. Typhimurium* por ostras *C.gigas***

Os ensaios de bioacumulação foram realizados com uma concentração aproximada de *S. Typhimurium*, de 1.000UFC/mL de água do mar no aquário. O período de contato com água contaminada foi de 2h, o qual só foi cronometrado após o início da abertura das valvas e do processo de filtração. O processo de filtração foi monitorado através da avaliação visual da gradual limpeza da água (Figura 1). A concentração bacteriana na água do mar e o tempo de exposição das ostras foram escolhidos baseados em experimentos anteriores no Laboratório de Virologia Aplicada, os quais demonstraram que neste período de exposição à esta contaminação, as ostras bioacumulam uma concentração bacteriana aproximada à encontrada em ostras naturalmente contaminadas.

Após esse período de bioacumulação das bactérias, as ostras foram colocadas por 10min em uma solução de 0,5% de hipoclorito de sódio para desinfecção das conchas. Para a avaliação da contaminação inicial das ostras pré-depuração, três ostras do lote foram retiradas para análise conforme descrito no item 3.2.2 e o tecido digestivo de três ostras foram reunidos, representando uma amostra. Nos experimentos na depuradora comercial, as demais ostras do lote foram identificadas com tinta vermelha nas valvas (Figura 2A) e colocadas nesta depuradora (Figura 2B).



Figura 1: Processo de Bioacumulação de *S. Typhimurium* por ostras *C.gigas* em aquário de dimensões: 55 x 45 x 30cm, localizado na sede da fazenda de cultivo, contendo 20L de água salina, retirada do próprio local da coleta.

**A**



**B**



Figura 2: Identificação das ostras a serem submetidas ao processo de depuração. A- marcação das valvas das ostras com esmalte vermelho; B- disposição das ostras marcadas em cada uma das caixas a serem amostradas dentro da depuradora.

### **3.11 Ensaios de depuração de *S. Typhimurium* pelas ostras *C. gigas***

#### **3.11.1 Ensaios-piloto de depuração em aquários**

Foram realizadas, em escala laboratorial, duas repetições de um ensaio-piloto de depuração, com a finalidade de iniciar um entendimento sobre a dinâmica de eliminação de patógenos. Para esse experimento, foram utilizados 7 aquários contendo 20L de água do mar filtrada (filtro de 50 $\mu$ m), com aeração, localizados em laboratório climatizado a 25° C. A bioacumulação inicial das ostras foi realizada conforme o procedimento descrito no item 3.10.

Juntamente à água salina foi adicionado 1L de uma suspensão de microalgas (*Tetraselmis tetrahele*) cedidas pelo Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC, na concentração aproximada de 6x10<sup>4</sup> células/mL. O uso destas microalgas induz o processo de filtração das ostras, bem como auxilia no monitoramento deste processo. Após a amostragem de 3 ostras, no tempo de 0h (pré-depuração), as demais iniciaram o processo de depuração. Para isso, as ostras foram colocadas em um dos aquários contendo água salina filtrada não contaminada, e periodicamente foram transferidas para os aquários subsequentes.

As ostras foram transferidas de aquários após períodos de 6h, 21h, 26h, 31h, 42h e 48h. A cada transferência de aquário, uma amostra de 3 ostras foi coletada e processada (item 3.2.2) para as análises microbiológicas (item 3.12) e moleculares (item 3.5).

#### **3.11.2 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 de moluscos Água Marinha, na praia de Cacupé, ao norte da Ilha de Florianópolis.

A depuradora utilizada foi planejada em sistema fechado de circulação de água, composta por 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 aparato de luz Ultra Violeta e um compressor destinado à manutenção da temperatura. Cada uma dessas unidades,

localizadas em um módulo adjacente ao tanque de água (Figura 3), era independente umas das outras, sendo possível a utilização de somente uma ou da associação entre elas.

O tanque da depuradora comporta 20 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. As caixas foram dispostas dentro do tanque de depuração conforme ilustrado na Figura 4.

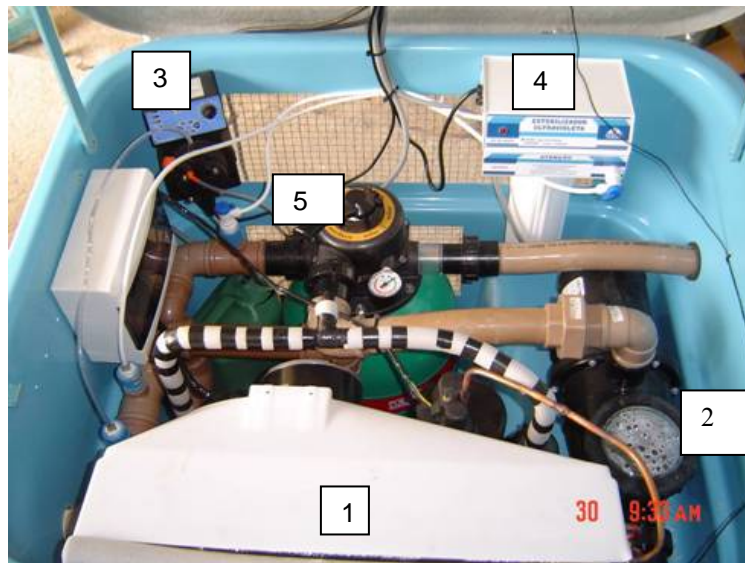


Figura 3: Casa de Máquinas acoplada ao tanque de depuração; 1: compressor; 2:bomba de água; 3: bomba injetora de cloro; 4:luz UV; 5: filtro de areia.





Figura 4: Disposição das caixas com ostras no tanque de depuração; 20 caixas dispostas em 5 colunas com 4 andares.

### 3.11.3 Ensaios de Depuração de *S. Typhimurium* pelas ostras *C. gigas* no tanque de depuração

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que cada repetição consistiu de um ciclo completo de depuração, feito em semanas diferentes. O período escolhido como um ciclo de depuração completo foi de 24h, e a cada 6h retirou-se uma amostragem. Para a distribuição das amostras, foram utilizadas 16 caixas (numeradas de 1 a 16), sendo que a casualidade das coletas das amostras foi aleatória (linha x Coluna).

Cada amostra coletada foi composta de 3 ostras, as quais, após a coleta, foram armazenadas, em ambiente refrigerado, em sacos plásticos identificados. Em cada tempo, quatro amostras foram coletadas, referentes a cada um dos quatro andares das caixas, conforme o sorteio realizado para a localização das amostras nas colunas de caixas. Como controles negativos, a cada repetição, foram coletadas duas amostras não contaminadas por *S. Typhimurium* nos períodos pré e pós depuração, como controles negativos. Após a coleta das amostras, estas foram transportadas ao Laboratório de Virologia Aplicada, UFSC, em caixa térmica, para serem processadas (item 3.2.2) e analisadas (itens 3.12, 3.5 e 3.6).

### **3.11.4 Sistemas de tratamentos da água no tanque de depuração**

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 enchido de água com a ajuda de uma bomba vibratória submersa. A temperatura da água foi mantida durante as 24h do processo de depuração através do ajuste do sistema de refrigeração para a temperatura inicial da água. 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.

#### **3.11.4.1 Esterilização da água através de tratamento com radiação Ultra Violeta.**

O equipamento de radiação UV esteriliza a água com o comprimento de onda de 254nm, o qual pertence à faixa aceitável para a desinfecção da água. Este equipamento necessitou ser limpo periodicamente, pois com o constante contato da água com a lâmpada de UV, forma-se uma película que impede a correta penetração da radiação. A esterilização por Ultra Violeta 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.

#### **3.11.4.2 Esterilização da água através de tratamento com 1ppm de Cloro**

A bomba dosadora de cloro é dotada de botões externos que agem sobre um potenciômetro, permitindo o monitoramento da frequência de injeções. A vazão é controlada regulando-se manualmente o potenciômetro de 0 a 100% da vazão, sendo possível uma regulagem mais precisa em baixa frequência através das teclas de 20% e 100%.

Com base nas informações de vazão máxima do modelo utilizado no sistema de depuração comercial foi possível estimar a vazão necessária de hipoclorito de sódio a 2%, para atingir a leitura de 1ppm de cloro no volume total de água no tanque da depuradora.

#### **3.11.4.3 Esterilização da água através de tratamento simultâneo com radiação Ultra Violeta e 1ppm de Cloro.**

Como terceiro método de esterilização da água no tanque de depuração, foi utilizado o funcionamento simultâneo da bomba injetora de cloro e do aparato de radiação UV.

#### **3.12 Quantificação de *S. Typhimurium* presente na tecido digestivo de ostras**

Para quantificar o número de bactérias presentes na tecido digestivo das ostras após a bioacumulação e depuração, foi realizada a quantificação, através de técnicas microbiológicas clássicas, anteriormente às análises moleculares. Para isso, foi utilizada a técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento em meio de cultura sólido.

Para as amostras provenientes dos ensaios de bioacumulação, após o processamento da amostra, 1g do homogenato da tecido digestivo das ostras foi diluído em 9mL de solução salina 0,85% (diluição 1:10). A partir de 1mL desta primeira diluição foram feitas outras 2 diluições seriadas decimais e, de cada diluição, foram retirados 0,1mL para plaqueamento em meio sólido Ágar XLD (OXOID).

Para um controle das características das colônias a serem contadas como *Salmonella*, foi incluído um controle positivo com cultura pura de *S. Typhimurium* (ATCC 14028). Todas as placas semeadas foram incubadas por 24h/37°C para posterior contagem das colônias crescidas. O resultado foi dado como UFC/g de tecido digestivo das ostras. Para as amostras de ostras depuradas, considerando que a concentração de bactérias na tecido digestivo seria menor, foram utilizadas as diluições seriadas de razão 1:1, 1:2 e 1:4.

Para confirmar a presença de *S Typhimurium*, mesmo em baixas concentrações, após o enriquecimento das amostras para a detecção molecular, uma alíquota de cada amostra foi retirada com alça de platina e isolada no mesmo meio usado para o plaqueamento das

diluições. Nas amostras que apresentaram crescimento após este isolamento, a concentração bacteriana foi considerada  $<100$  UFC/g, o qual é o limite de detecção com as diluições utilizadas.

### **3.13 Análise mensal de Amostras de Campo**

#### **3.13.1 Coleta e processamento**

Durante o período de março a outubro de 2005, foi coletada, uma vez a cada mês, uma dúzia de ostras, diretamente de um ponto de cultivo localizado ao norte da ilha de Florianópolis, para a análise de campo da contaminação por *Salmonella* spp. Simultaneamente, foi coletada no mesmo ponto, em frasco de vidro estéril, uma amostra de 250mL de água do mar para a determinação do número de coliformes totais e *E.coli*.

Assim que as amostras chegavam ao laboratório, as conchas eram lavadas, desinfetadas por 10min em álcool 70% e abertas asépticamente em capela de fluxo laminar. Após a abertura das valvas, as doze ostras inteiras eram homogeneizadas com um homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax (Modelo T25 basic, IKA Labortechnik).

#### **3.13.2 Avaliação da contaminação por *Salmonella* spp. em amostras de campo coletadas entre março e outubro de 2005**

Para esse procedimento, foi utilizado o kit comercial de detecção *Reveal* Salmonella Test System<sup>®</sup> (Neogen Corporation) o qual consistiu no uso de meios de cultivo não seletivo e seletivo. Conforme especificações do fabricante, para a detecção de contaminação, foram pesados 25g de tecido homogeneizado de ostras inteiras, e adicionados a 200mL de água MilliQ estéril, pré-aquecida a 37°C, com meio de cultivo *Revive*<sup>®</sup> (não seletivo). Essa garrafa foi incubada por 2h, a 37°C. Após esse período de incubação, foram adicionados mais 200mL de água MilliQ estéril, e o segundo meio de cultivo, o *Reveal*<sup>®</sup> (meio seletivo Selenito de Cistina). A garrafa foi incubada, por 18h, a 42°C, sob agitação constante.

Depois do término deste segundo período de incubação, a leitura do teste foi feita com o uso de um dispositivo imunocromatográfico disponível no kit, que detecta a presença de *Salmonella* spp.. através de reações imunoenzimáticas (antígeno-anticorpo). Cinco gotas do produto de enriquecimento foram colocadas neste dispositivo com uma pipeta Pasteur e, em aproximadamente 15min, o resultado foi visualizado. A presença de uma banda avermelhada, abaixo da banda controle significou resultado positivo de detecção de contaminação por *Salmonella* spp. nas ostras, conforme Figura 5.

Como teste complementar e confirmatório foi realizada a detecção molecular por PCR. Após a detecção pelo kit comercial, 1,5mL do enriquecimento seletivo de cada amostra mensal foi coletado para a extração do DNA, seguida de PCR, de acordo com os itens 3.3 e 3.5, respectivamente.

Os resultados foram interpretados conforme resolução da ANVISA, RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, para pescados e produtos de pesca (item 7a).

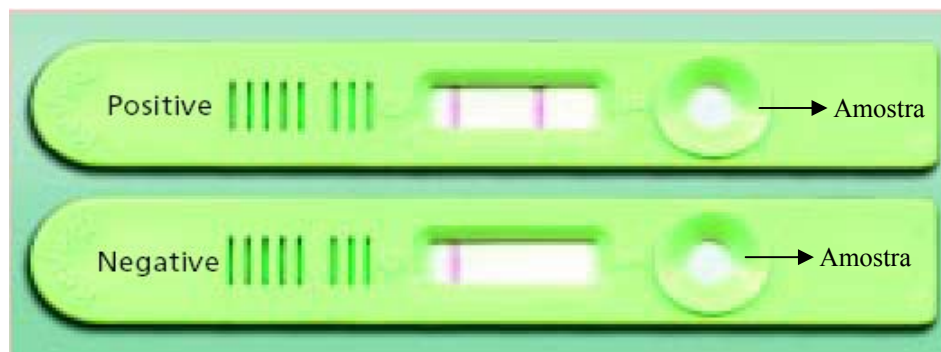


Figura 5: Visualização de resultados de detecção de contaminação por *Salmonella* spp.. através do dispositivo presente no Kit REVEAL Salmonella Test System<sup>®</sup>. Fonte: Neogen Corporation (<http://www.neogen.com>)

### 3.13.3 Determinação dos níveis de coliformes em águas de cultivo de ostras

As placas de Petrifilm<sup>®</sup> (3M) foram inoculadas com 1mL de água do mar coletada no ponto de cultivo e incubadas em estufa à 35°C ± 2°C por 24h para a contagem de coliformes totais (colônias de coloração vermelha associadas com gás). Após esta primeira incubação e quantificação, as placas foram novamente incubadas por mais 24h, para a contagem de *E. coli* (colônias vermelho-azuladas com gás associado) (Figura 6). Cada colônia observada equivaleu a 100 unidades formadoras de colônias (UFC). O resultado observado foi expresso

em UFC, de coliformes totais ou *E. coli*, por 100mL de água. Os resultados encontrados foram interpretados de acordo com a resolução CONAMA, nº 357, de 17 de março de 2005.

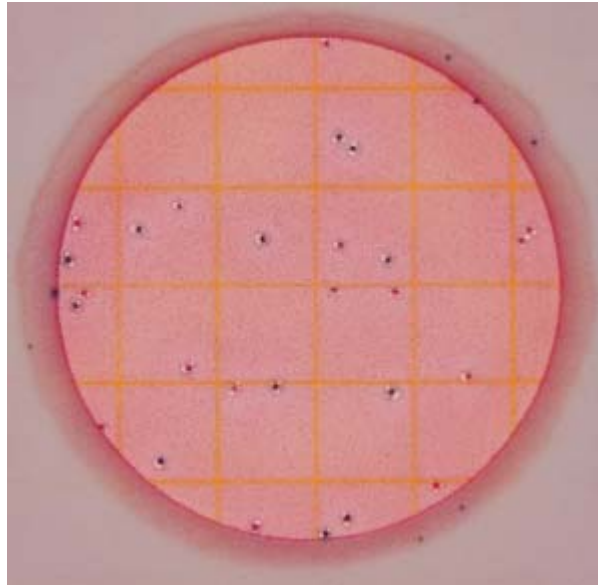


Figura 6: Ilustração de Placa Petrifilm<sup>®</sup> com coliformes totais e *E. coli*. Colônias vermelhas associadas a gás: coliformes totais; Colônias azuis associadas a gás: *E.coli*. Fonte: www.3m.com

### 3.14 Análise Estatística dos ensaios de depuração comercial

Para os dados obtidos na enumeração de *S. Typhimurium* presente no tecido digestivo de ostras foram realizados testes de estatística descritiva (média, variância, desvio padrão) a fim de resumir e apresentar os resultados.

Para análise global dos dados quantitativos foi feita uma Análise de Regressão não Linear, com os resultados relativos aos diferentes andares, para a avaliação da relação da concentração bacteriana com os tempos de depuração. Para a análise comparativa entre os quatro andares dentro de cada tratamento, bem como para a comparação entre cada um dos tratamentos testados, foi realizada uma Análise de Variância. O nível de significância considerado, para as análises acima citadas, foi  $p \leq 0,05$ . Foi avaliado o tempo necessário de depuração para diminuir 90% da população inicial de *S. Typhimurium*, o qual é denominado DT90 (POMMEPUY et al., 2003). Nas análises moleculares, os resultados foram comparados através do teste exato de Fisher, utilizando nível de significância  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### Padronização de métodos de detecção de *S. Typhimurium*

#### 4.1 Quantificação do inóculo bacteriano de *S. Typhimurium*

A partir da média da contagem em placa das três repetições realizadas foi possível inferir que concentração do inóculo em fase estacionária foi de  $3 \times 10^8$  UFC/mL. A Figura 7 mostra o crescimento de células de *S. Typhimurium* em meio sólido XLD, podendo ser diferenciadas de outras enterobactérias devido à produção de  $H_2S$ , evidenciada pela presença de centro negro nas colônias.

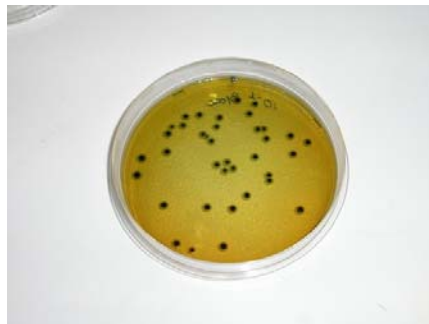


Figura 7: Placa de meio sólido XLD evidenciando a coloração diferencial das colônias de *S. Typhimurium* (colônias negras)

#### 4.2 Reação de PCR para detecção de *S. Typhimurium*

As condições ótimas para a reação de PCR, conforme descritas em métodos (item 3.5), permitiram a amplificação específica do produto de 387pb, usando-se como molde o DNA extraído a partir da cultura pura de *S. Typhimurium*, em fase estacionária de crescimento (Figura 8). A concentração dos iniciadores foi escolhida a partir da curva desenvolvida, a qual demonstrou que a concentração de 20pmoles foi a ideal na reação (Figura 9).

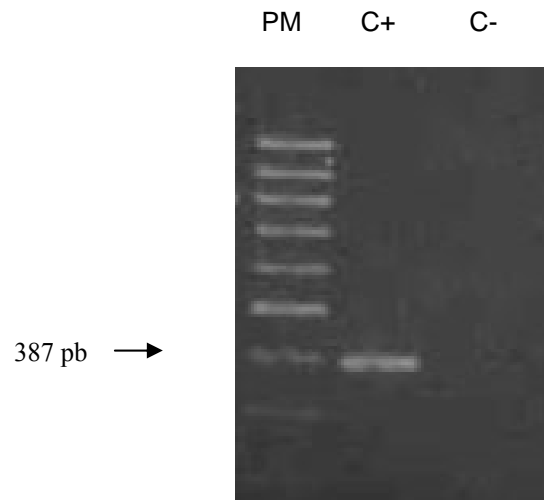


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % de produtos de PCR para detecção de *S. Typhimurium* a partir de DNA purificado de cultura pura. PM: marcador de peso molecular 100pb ladder, C+: obtido a partir de DNA purificado, C-: controle negativo da reação.

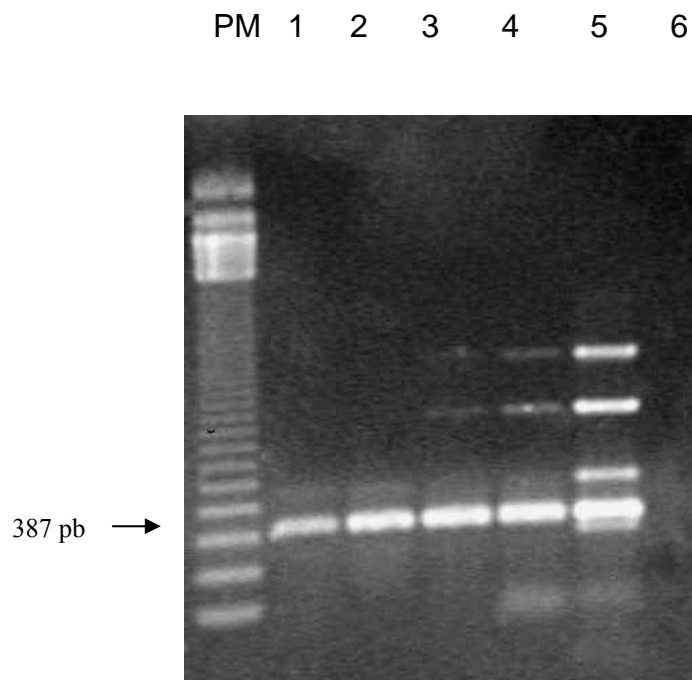


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de produtos de PCR produzidos com diferentes concentrações de iniciadores a partir de DNA purificado de cultura pura *S. Typhimurium*. PM: marcador de peso molecular; 1 a 5: concentrações variando de 10 a 50 pmoles de cada iniciador, respectivamente; 6: controle negativo da reação.



### 4.3 Hibridização Molecular para detecção de *S. Typhimurium*

#### 4.3.1 Produção da sonda de 387pb

A sonda de 387pb foi produzida e marcada efetivamente por PCR. Isto foi verificado pela visualização do produto marcado em gel de agarose 1,5% (Figura 10) e pela detecção imunológica da sonda aplicada diretamente em membrana de nylon, em presença de anticorpo anti-DIG conjugado à enzima fosfatase alcalina (Figura 11).

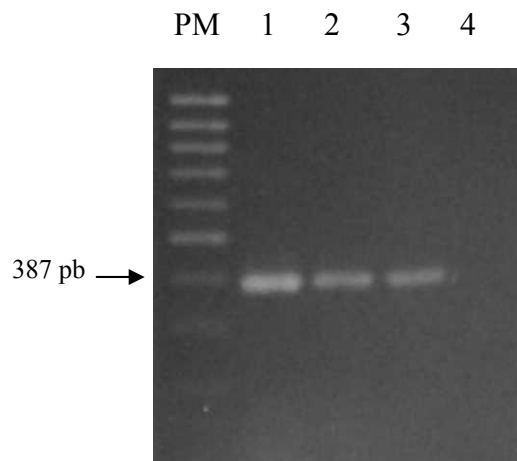


Figura 10: Eletroforese em gel de Agarose a 1,5 % da sonda de 387 pb marcada com dUTP-DIG por PCR na proporção 1:20 de dUP-DIG:dTTP. PM: marcador de peso molecular, 1: controle positivo não marcado, 2 e 3 sonda 1:20 dUTP-DIG:dTTP, 4: controle negativo.



Figura 11: Membrana de nylon mostrando a revelação imunológica da sonda de 387 pb marcada com dUTP-DIG por PCR na proporção 1:20 de dUTP-DIG:dTTP

#### 4.4 Determinação do limite de sensibilidade da detecção de *S. Typhimurium* com uso da reação de PCR

Nas condições experimentais descritas anteriormente no item 3.7, o limite de detecção foi até a diluição  $10^{-8}$ , correspondendo a 3UFC/mL, conforme contagem nas placas de meio de cultura XLD. Como somente 5 $\mu$ l do DNA foi utilizado para a reação de PCR, foi possível a detecção de 0,1 UFC (Figura 13).

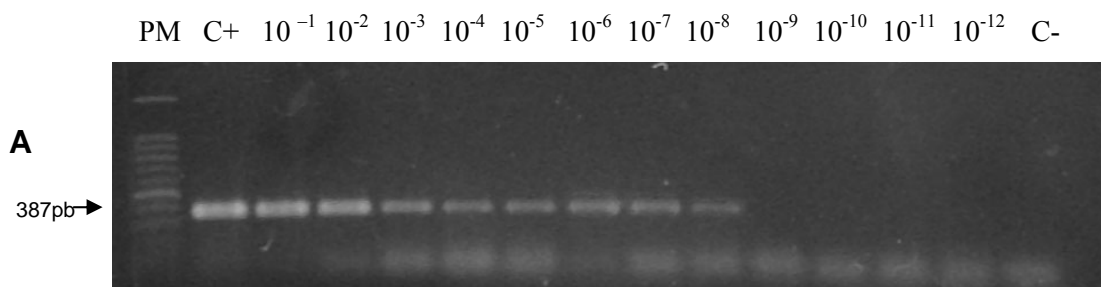


Figura 13: Limite de detecção de *S. Typhimurium* por PCR a partir de cultura pura. (A) PCR (Eletroforese em gel de agarose 1,5%); PM: marcador de peso molecular 100 pb ladder, C+: controle positivo; C- : controle negativo.

#### 4.5 Análise dos diferentes protocolos de extração e purificação de material genético de *S. Typhimurium* a partir do tecido digestivo de ostras

Foram avaliados dois protocolos de recuperação bacteriana e isolamento do DNA total a partir de tecido digestivo dissecado de ostras. O protocolo no qual utilizou-se a detecção direta do DNA bacteriano no tecido digestivo de ostras, sem enriquecimento em meios de cultura, não foi eficiente, resultando em reação de PCR negativa para todas as concentrações de bactérias cujo DNA foi extraído para a reação (Figura 14).

Desta forma, o protocolo escolhido para a continuidade dos experimentos foi o de detecção após enriquecimento da amostra. Este protocolo mostrou-se satisfatório, sendo observado forte sinal de amplificação, similar ao sinal do controle positivo da reação (Figura 15). Não houve diferença na amplificação de amostras provenientes de enriquecimento não seletivo em relação às do enriquecimento seletivo.

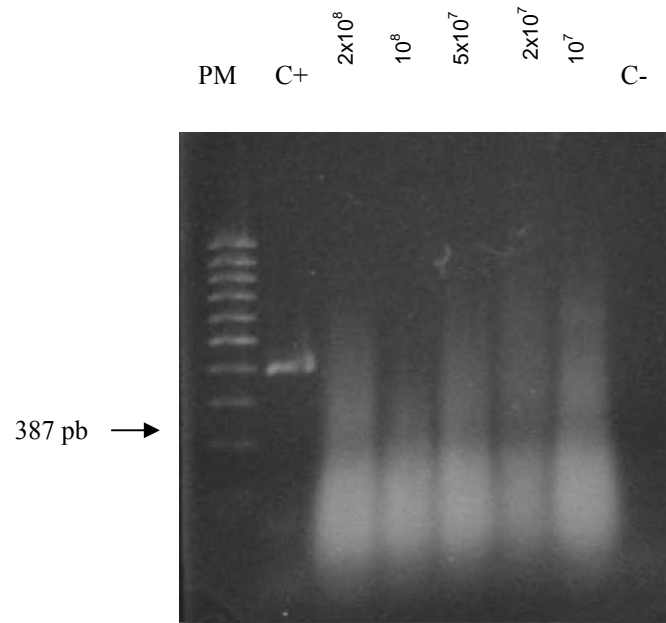


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1,5 % da reação de PCR a partir de DNA total de *S. Typhimurium* isolado com o uso do protocolo de detecção direta. PM: marcador de peso molecular 100 pb ladder, C+: controle positivo; C- : controle negativo.

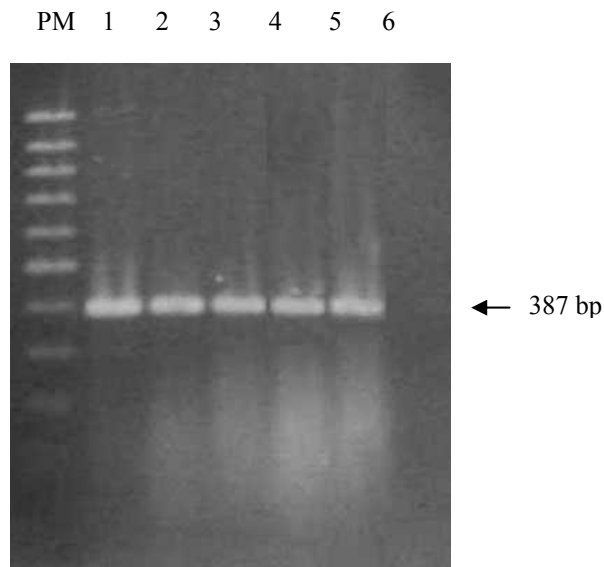


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR de amostras inoculadas com diferentes concentrações de *S. Typhimurium*, a partir do DNA isolado após enriquecimento da amostra. PM: marcador de peso molecular 100pb ladder; 2: Controle Positivo; 2 e 4:  $1 \times 10^7$  UFC em meio não seletivo e seletivo, respectivamente; 3 e 5:  $10^8$  UFC em meio não seletivo e seletivo, respectivamente; 6: Controle negativo.

#### 4.6 Distintos períodos de incubação em meio de cultura na detecção do DNA de *S. Typhimurium* em ostras

O resultado da curva em distintos períodos de incubação da bactéria *S. Typhimurium* está demonstrado na Figura 16. A partir de 2h de incubação já foi possível detectar sinal positivo no PCR, porém, após 6h de incubação o sinal tornou-se mais intenso e similar às horas subsequentes e ao controle positivo.

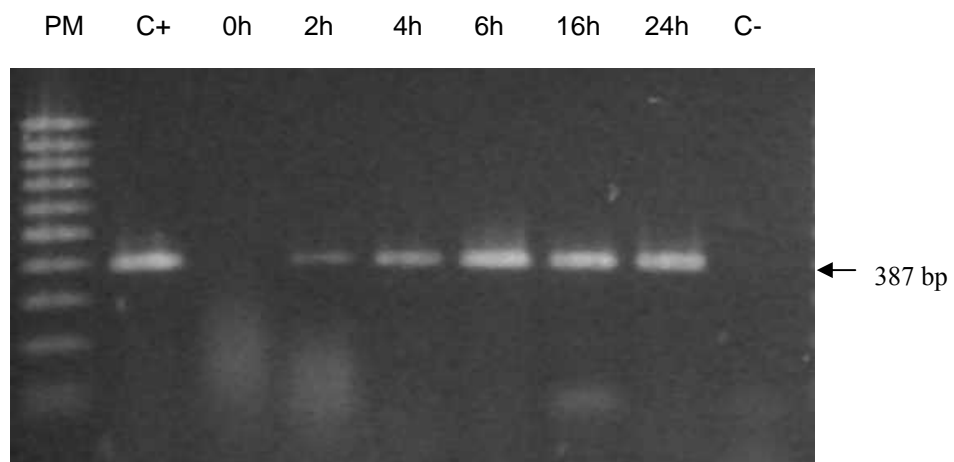


Figura 16 : Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de produtos de PCR de amostras inoculadas com  $10^7$  células de *S. Typhimurium* e incubadas em diferentes períodos previamente à extração do DNA. PM- marcador de peso Molecular 100pb ladder; C+: Controle Positivo; C-: Controle Negativo.

#### 4.7 Determinação do limite de sensibilidade da detecção do DNA de *S. Typhimurium* em ostras com o uso da reação de PCR e da hibridização molecular

Como resultado deste procedimento com a reação de PCR, foi possível detectar 10 UFC de *S. Typhimurium* por grama de carne de ostras (Figura 17A). Após a hibridização molecular com a sonda de 387pb marcada por digoxigenina, o limite de detecção aumentou 2 log, sendo 0,1UFC/g, conforme demonstrado na Figura 17B.

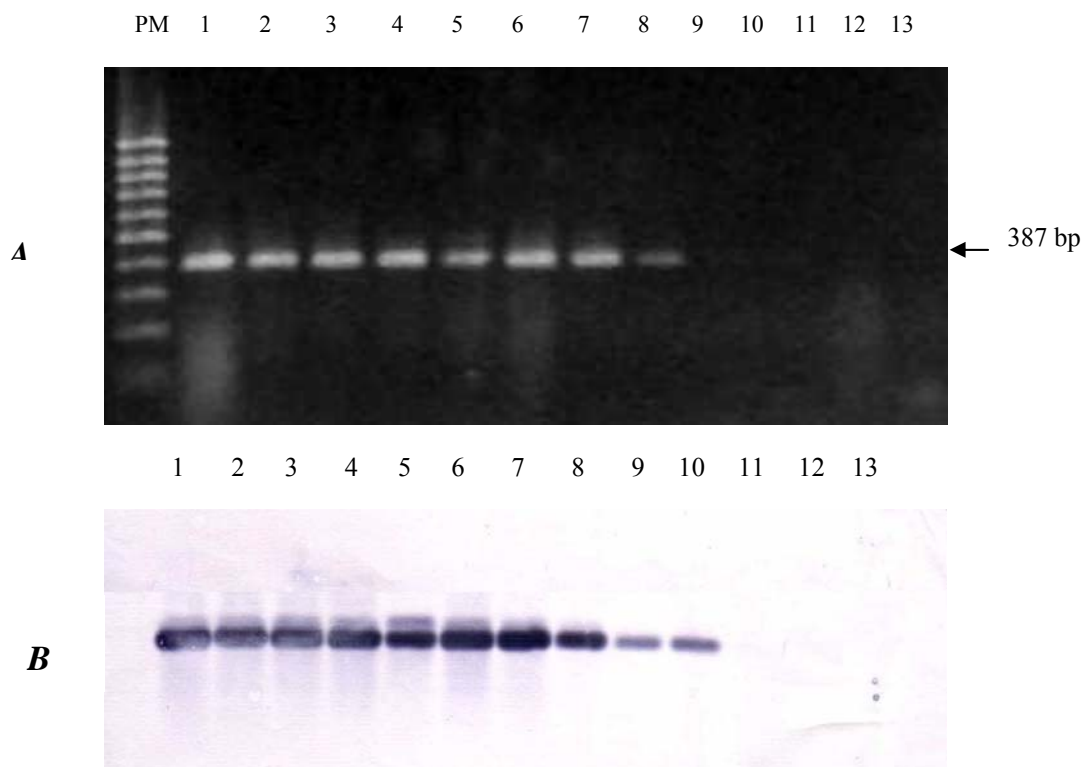


Figura 17: Produtos de PCR de tecido digestivo de ostras artificialmente semeadas com aliquotas de 0,1 mL de uma diluição seriada decimal de *S. Typhimurium*. A: Eletroforese em gel de agarose 1,5%; PM- marcador de peso molecular 100pb ladder; 1- Controle Positivo; 2 a 11- semeadura de  $10^7$ UFC/g a 0,01 UFC/g; 12- Controle negativo; 13- Tecido não inoculado. B: Hibridização Molecular; 1- Controle Positivo; 2 a 11- semeadura de  $10^7$ UFC/g a 0,01 UFC/g; 12- Controle Negativo; 13- Tecido não inoculado.

## **Ensaio de depuração de ostras *C. gigas***

### **4.8 Ensaio de depuração de ostras de cultivo artificialmente contaminadas por *S. Typhimurium***

#### **4.8.1 Ensaio - piloto de depuração em aquários**

Com esse experimento foi possível verificar a eliminação da contaminação por *S. Typhimurium* pelas ostras colocadas num aquário quando se utilizou água do mar limpa e filtrada. A bioacumulação bacteriana previamente ao início da contaminação inicial, demonstrou uma acumulação média de 20.000 UFC/g de ostra. Como resultado da depuração, a partir da contagem em placas, foi observada uma grande eliminação bacteriana, mesmo em períodos curtos de exposição das ostras à água não contaminada. Esta depuração foi seguida de uma recontaminação nos períodos mais longos de exposição (Figura 18).

Apesar de a contagem em placas não apresentar crescimento de bactérias em algumas amostras, o PCR apresentou uma banda específica para *S. Typhimurium* (Figura 19). Este resultado indicou que houve amostras com menos de 100 células bacterianas (abaixo do número detectável por diluição e plaqueamento), já que foi realizado o esgotamento em meio de cultivo sólido do enriquecimento da amostra, comprovando a presença e viabilidade do patógeno. A ausência de banda específica na PCR mesmo com a confirmação da viabilidade da contaminação, indicou a presença de contaminação abaixo do limite de detecção da técnica (10 UFC/g).

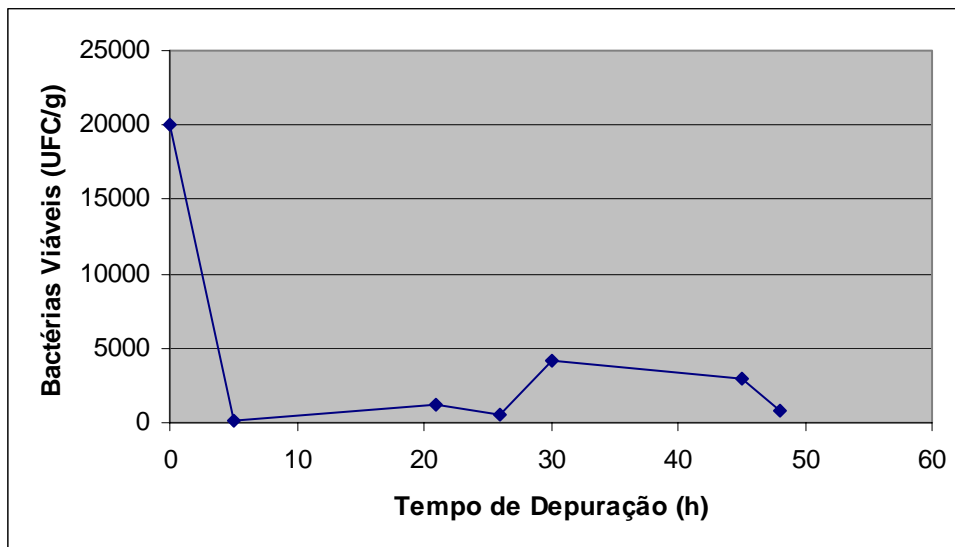


Figura 18: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a processo de depuração com água parada e filtrada.

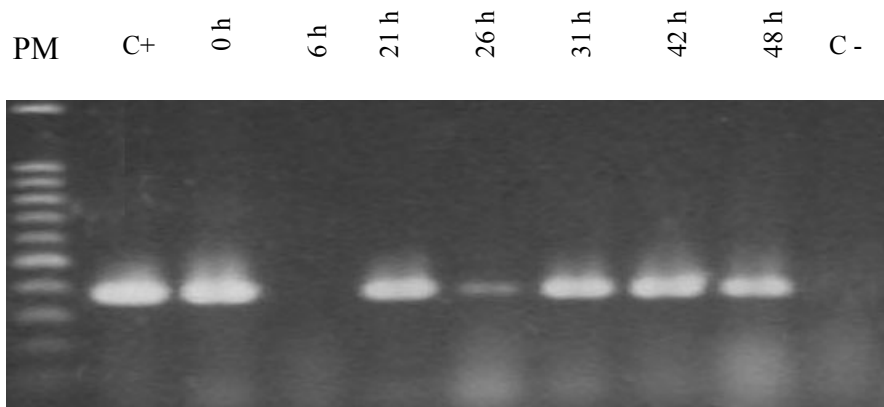


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de produtos de PCR referentes a diferentes períodos de depuração em água filtrada. PM: marcador de peso molecular 100 pb ladder; C+: controle positivo da reação; C-: controle negativo da reação.

## **4.8.2 Ensaio de depuração Comercial**

As ostras submetidas ao processo de depuração apresentaram uma bioacumulação diferencial, variando de 15.000 a 20.000 UFC/g de carne, conforme resultados obtidos nas diluições e plaqueamento. Estes resultados foram expressos como a média de três experimentos independentes.

### **4.8.2.1 Tratamento da água com radiação ultra violeta**

A temperatura inicial da água, nas três repetições foi de 19°C e esta foi mantida durante as 24h de depuração deste experimento. Durante as três repetições dos ensaios de depuração, todas as ostras apresentaram a atividade de filtração esperada, com abertura das valvas logo no início do processo. Ao final de cada ensaio de depuração, as ostras mantiveram-se ativas, não sendo verificado mortalidade entre as amostras coletadas. Como resultado das repetições, foi observado uma limpeza gradual da água, resultando em transparência da água no interior do tanque, ao final das 24h de experimento. Ocorreu uma eliminação bacteriana significativa já nas primeiras 6h para as amostras nos diferentes andares de caixas.

Com o resultado da quantificação de bactérias viáveis, foi possível observar uma eliminação diferencial no primeiro e terceiro andares de caixa da depuradora, em 18h de depuração (Figuras 20 e 22, respectivamente). No entanto, observou-se uma eliminação da contaminação ao final de 24h. No segundo andar, constatou-se uma depuração gradual da contaminação, sendo que a mesma foi eliminada totalmente ao final de 24h (Figura 22). No último andar, apesar de ter sido observado uma dinâmica de depuração gradual em 18h, ao final de 24h observou-se uma recontaminação (Figura 23).

Não foi observada a presença de outras bactérias entéricas no tecido digestivo das ostras, sendo isso evidenciado pela ausência de crescimento nas placas referentes às amostras não contaminadas com *S.Typhimurium* (controles negativos), assim como pela presença exclusiva de colônias características deste patógeno nas amostras artificialmente contaminadas.



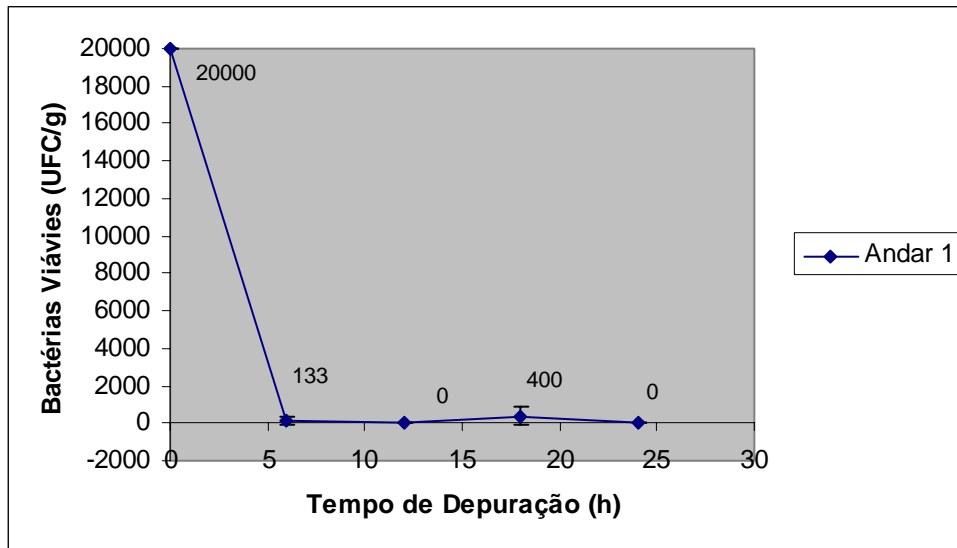


Figura 20: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a processo de depuração com água tratada com radiação Ultra Violeta. Amostras localizadas no primeiro andar das caixas no interior do tanque de depuração.

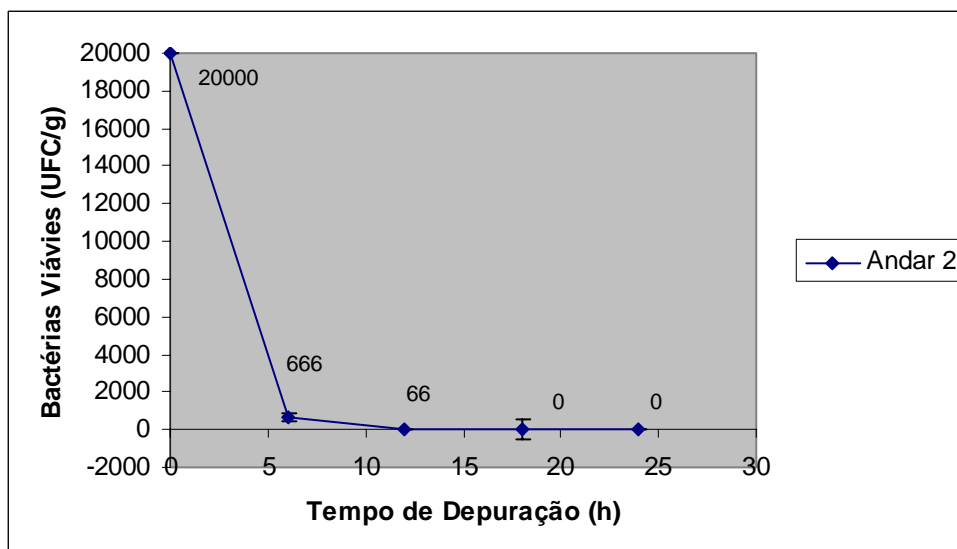


Figura 21: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a processo de depuração com água tratada com radiação Ultra Violeta. Amostras localizadas no segundo andar das caixas no interior do tanque de depuração.

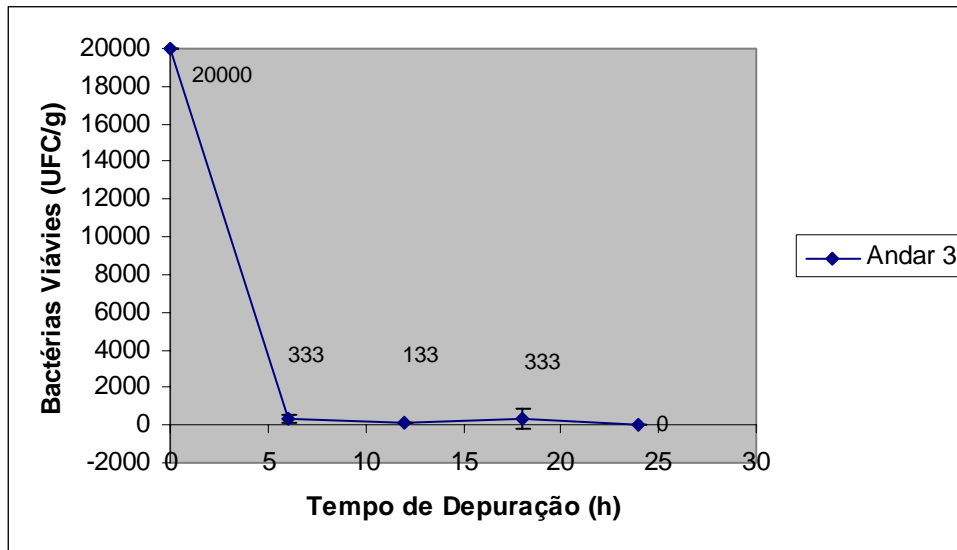


Figura 22: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a processo de depuração com água tratada com radiação Ultra Violeta. Amostras localizadas no terceiro andar de caixas no tanque de depuração.

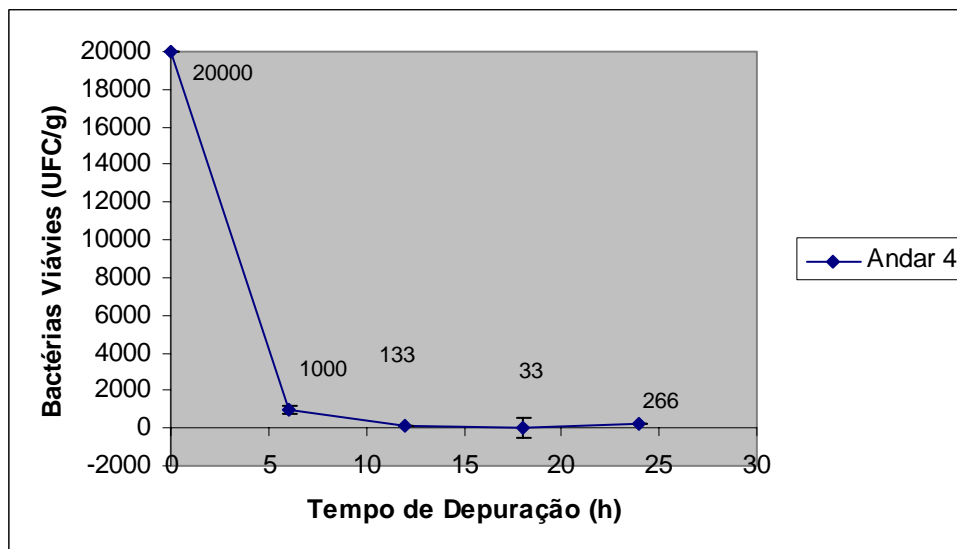


Figura 23: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a processo de depuração com água tratada com radiação Ultra Violeta. Amostras localizadas no quarto andar de caixas no tanque de depuração.

De acordo com a Tabela 1, os resultados da análise por PCR confirmaram a presença de DNA de *S. Typhimurium* nas amostras depuradas, apesar da inexistência de bactérias viáveis no tecido digestivo das ostras. As amostras não contaminadas artificialmente com *S. Typhimurium*, coletadas antes e depois da depuração, foram negativas para a presença desta bactéria, indicando que não ocorreu uma contaminação durante o período de depuração e contato com as amostras contaminadas.

Tabela 1: Detecção por PCR de *S. Typhimurium* em amostras de ostras submetidas a processo de depuração com água tratada com radiação ultravioleta.

<b>Tempo de Depuração</b>	<b>Andar</b>	<b>PCR*</b>
<b>6h</b>	<b>1</b>	1/3
	<b>2</b>	1/3
	<b>3</b>	3/3
	<b>4</b>	2/3
<b>12h</b>	<b>1</b>	1/3
	<b>2</b>	1/3
	<b>3</b>	1/3
	<b>4</b>	3/3
<b>18h</b>	<b>1</b>	3/3
	<b>2</b>	2/3
	<b>3</b>	0/3
	<b>4</b>	2/3
<b>24h</b>	<b>1</b>	1/3
	<b>2</b>	3/3
	<b>3</b>	2/3
	<b>4</b>	3/3
<b>Controle positivo Pré depuração</b>	3/3	
<b>Controle negativo Pós depuração</b>	0/3	

\*Os resultados estão indicados como o número de réplicas com resultados positivos na PCR

#### 4.8.2.2 Tratamento da água com 1ppm de Cloro

Como resultado deste tratamento foi observado uma dinâmica diferente em relação ao tratamento com radiação ultra violeta. A temperatura média inicial da água foi de 23°C. Como a época do ano na qual foram realizados estes experimentos coincidiu com o período de maturação e desova das ostras (setembro/outubro), durante as repetições dos experimentos, ocorreram dois eventos de desova dos moluscos, o que causou turbidez e viscosidade da água no interior da depuradora. Isto foi revertido com a diminuição e manutenção da temperatura da água para 19°C. A temperatura elevada pode, provavelmente ter induzido a desova dos moluscos, e a turbidez da água devido à desova interferiu na eficiência do filtro de areia. Quando a temperatura da água foi otimizada, durante as três repetições dos ensaios de depuração, as ostras apresentaram um comportamento de filtração esperado, com abertura das valvas logo após a imersão no tanque de depuração.

Quando realizou-se o ensaio de quantificação de bactérias, observou-se também outros tipos de bactérias, as quais não apresentavam morfologia colonial de *S. Typhimurium* no meio de cultura utilizado, portanto não foram enumeradas como tal. Essas bactérias estiveram presentes em todas as amostras, incluindo as amostras do controle negativo pré depuração. Entretanto, no controle negativo pós-depuração, a presença destas bactérias não foi mais observada, evidenciando o processo de purificação total destes moluscos.

Apesar de a contaminação ter diminuído muito nos três primeiros andares, não foi possível eliminar a presença de *S Typhimurium* dentro de 24h (Figuras 24, 25 e 26), assim como das demais bactérias que naturalmente já estavam presentes na carne. Somente o último andar, já com o suporte no fundo do tanque, apresentou total eliminação da contaminação durante as 24h de depuração (Figura 27).

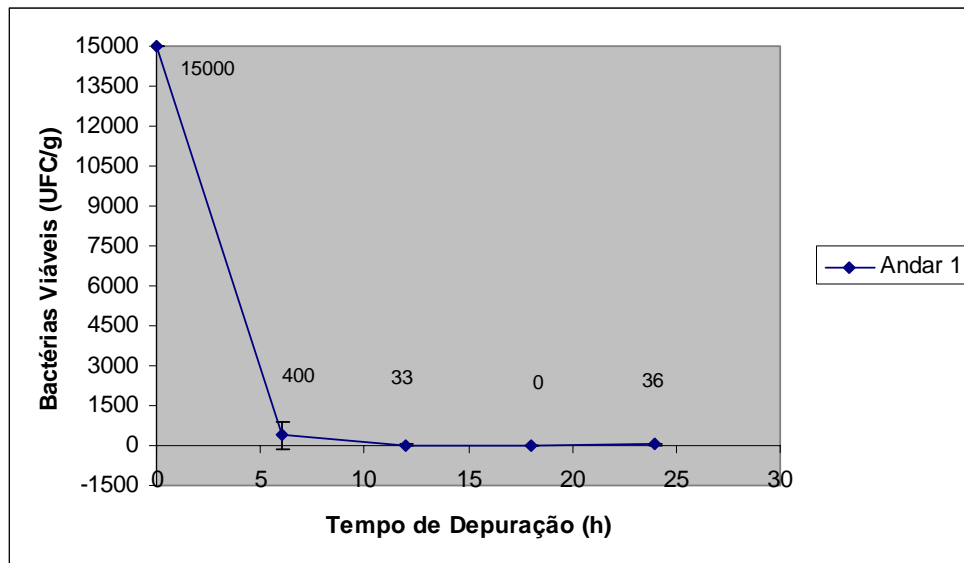


Figura 24: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas ao processo de depuração com água tratada com 1ppm de Cloro. Amostras localizadas no primeiro andar de caixas no tanque de depuração.

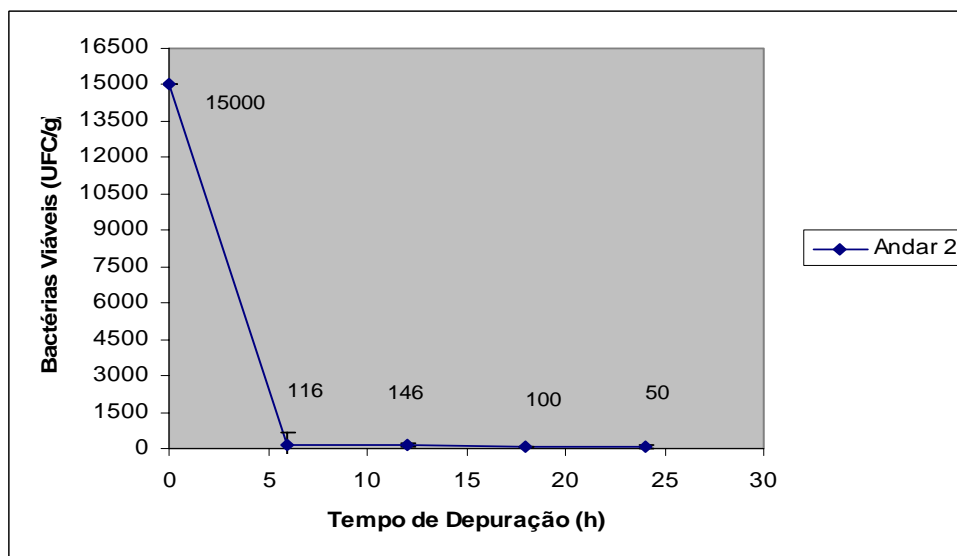


Figura 25: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a processo de depuração com água tratada com 1ppm de Cloro. Amostras localizadas no segundo andar de caixas no tanque de depuração.

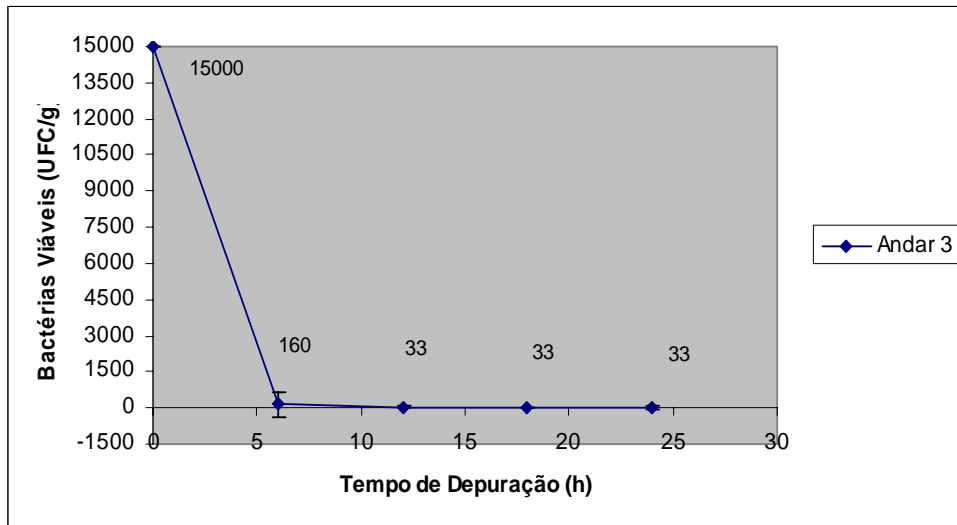


Figura 26: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a processo de depuração com água tratada com 1ppm de Cloro. Amostras localizadas no terceiro andar de caixas no tanque de depuração.

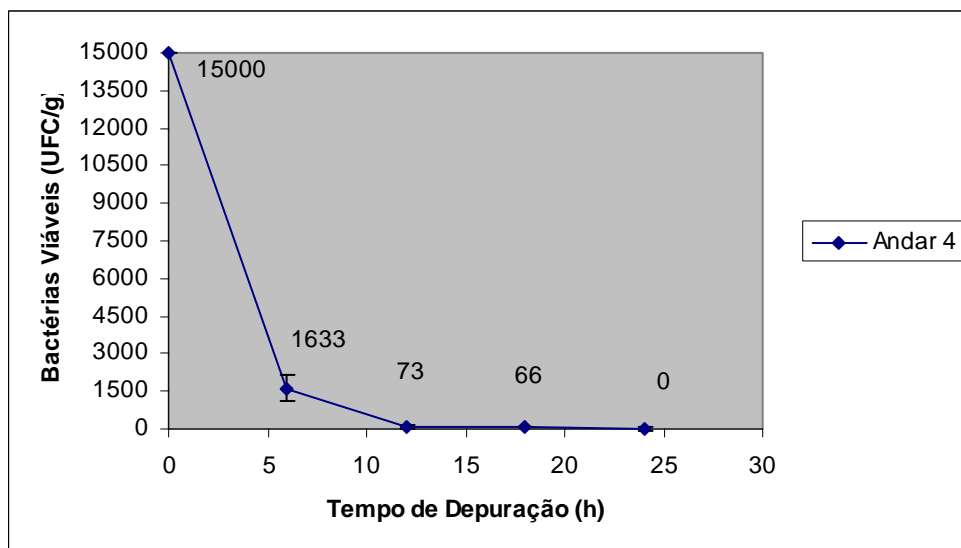


Figura 27: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a processo de depuração com água tratada com 1ppm de Cloro. Amostras localizadas no quarto andar de caixas no tanque de depuração.

De acordo com a Tabela 2, os resultados das análises de amplificação gênica novamente confirmaram a presença de DNA de *S. Typhimurium* nas amostras depuradas. Entretanto, os resultados da quantificação de bactérias viáveis no tecido digestivo das ostras continuaram demonstrando que a viabilidade celular foi afetada, já que o resultado do crescimento bacteriano nas placas foi negativo. As amostras não artificialmente contaminadas com *S. Typhimurium*, coletadas antes da depuração, mostraram-se negativas para a presença desta bactéria, tanto nos ensaios de contagem de bactérias viáveis, quanto no PCR.

Tabela 2: Detecção por PCR de *S. Typhimurium* em amostras de ostras submetidas a processo de depuração com água tratada com 1ppm de Cloro.

<b>Tempo de Depuração</b>	<b>Andar</b>	<b>PCR*</b>
<b>6h</b>	<b>1</b>	2/3
	<b>2</b>	2/3
	<b>3</b>	3/3
	<b>4</b>	2/3
<b>12h</b>	<b>1</b>	3/3
	<b>2</b>	2/3
	<b>3</b>	3/3
	<b>4</b>	2/3
<b>18h</b>	<b>1</b>	2/3
	<b>2</b>	2/3
	<b>3</b>	3/3
	<b>4</b>	3/3
<b>24h</b>	<b>1</b>	3/3
	<b>2</b>	2/3
	<b>3</b>	3/3
	<b>4</b>	2/3
<b>Controle positivo Pré depuração</b>	3/3	
<b>Controle negativo Pós depuração</b>	0/3	

\* Os resultados estão indicados como o número de réplicas com resultados positivos na PCR

#### 4.8.2.3 Tratamento simultâneo da água com 1ppm de Cloro e radiação ultra violeta

A associação dos tratamentos anteriormente testados apresentou um sinergismo positivo para a esterilização da água da depuração. Apesar de a temperatura inicial da água, nas três repetições ter ficado acima dos 25°C, para evitar que os moluscos desovassem, essa foi abaixada e mantida em 19°C, durante as 24h do experimento.

Durante as três repetições dos ensaios de depuração, as ostras apresentaram comportamento de filtração esperado, com abertura das valvas logo após a imersão no tanque de depuração. As ostras mantiveram-se ativas durante as 24h, não sendo verificado mortalidade entre as amostras coletadas.

Durante as repetições, não foram observados eventos de desova, e a água apresentou uma limpeza gradual. Ocorreu uma eliminação significativamente alta nas 12 primeiras horas para todos os quatro andares testados, sendo que a contaminação alcançou níveis indetectáveis ao final das primeiras 12h de depuração (Figuras 28, 29, 30 e 31).

Com o resultado da quantificação de bactérias viáveis, foi possível observar uma eliminação gradual em todos os andares, não sendo evidenciada uma recontaminação como ocorreu nos demais tratamentos. As bactérias, consideradas como não salmonelas, observadas durante as repetições com o tratamento com 1ppm de cloro não estavam presentes nas amostras depuradas. Houve crescimento destas bactérias nas amostras da bioacumulação e controle negativo pré depuração. A amostra controle negativo pós depuração não apresentou presença de *S. Typhimurium* em nenhum dos métodos de análise.

De acordo com a Tabela 3, os resultados das análises por PCR confirmaram a presença do DNA de *S. Typhimurium* nas amostras depuradas. No entanto, como nos demais tratamentos, esta detecção significou somente a presença de fragmentos de DNA, sem viabilidade bacteriana, já que os resultados de quantificação de bactérias nas placas foi sempre negativo.



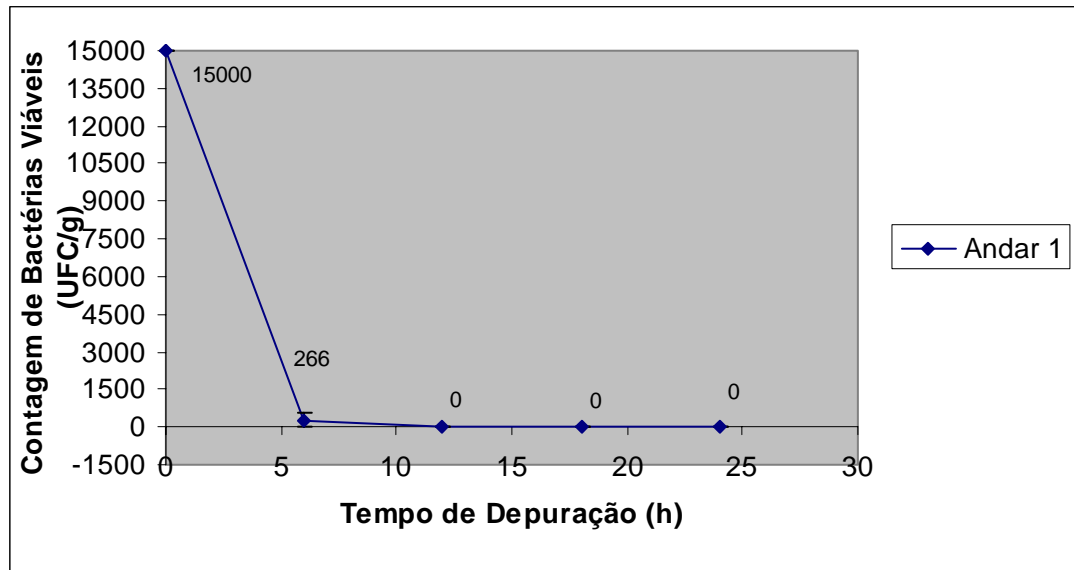


Figura 28: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a um processo de depuração com água simultaneamente tratada com radiação Ultra Violeta e 1ppm de Cloro. Amostras localizadas no primeiro andar de caixas no tanque de depuração.

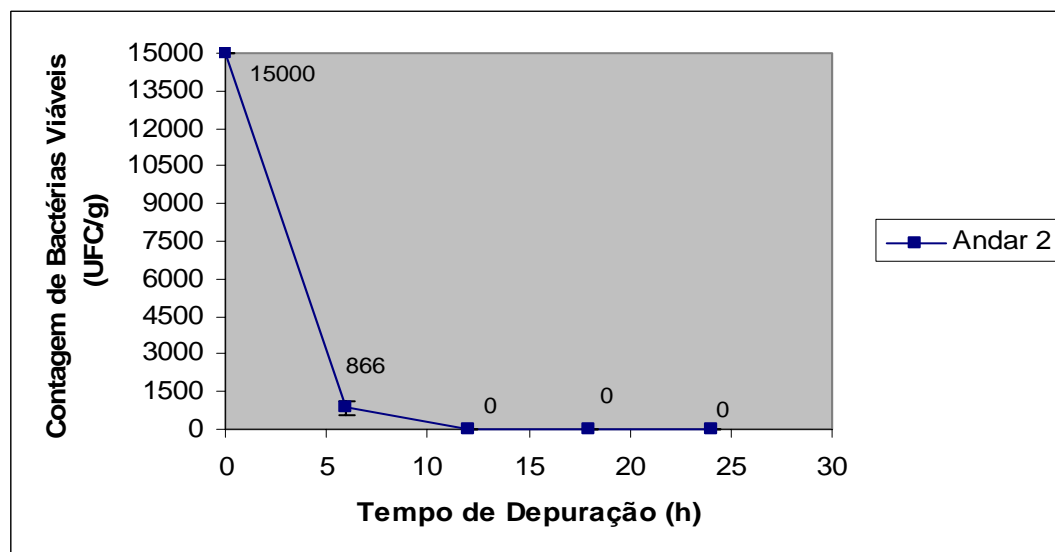


Figura 29: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a um processo de depuração com água simultaneamente tratada com radiação Ultra Violeta e 1ppm de Cloro. Amostras localizadas no segundo andar de caixas no tanque de depuração.

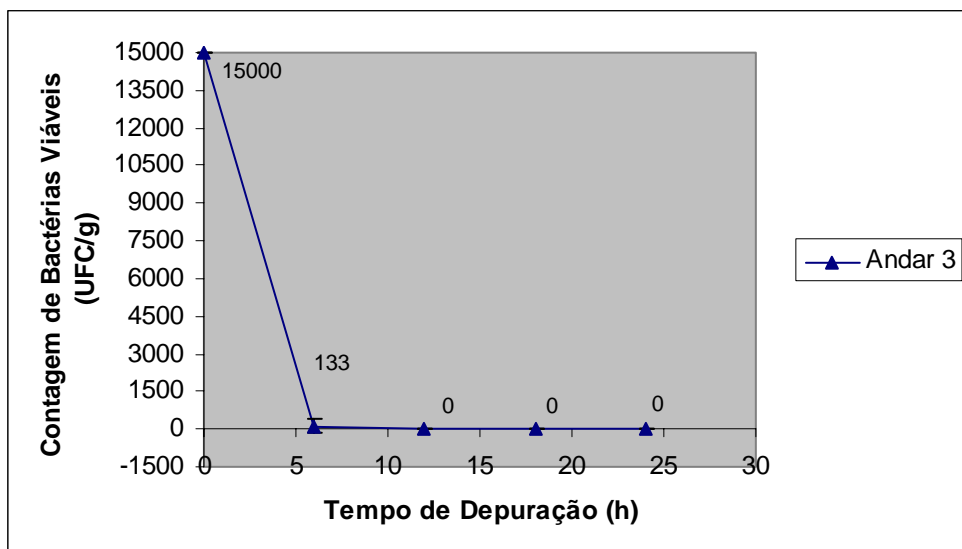


Figura 30: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a um processo de depuração com água simultaneamente tratada com radiação Ultra Violeta e 1ppm de Cloro. Amostras localizadas no terceiro andar de caixas no tanque de depuração.

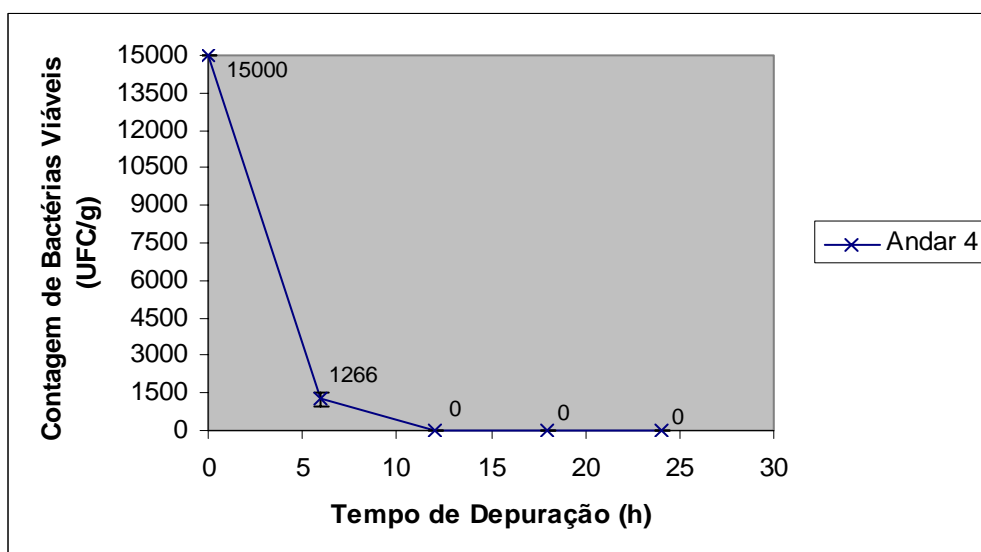


Figura 31: Dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras submetidas a um processo de depuração com água simultaneamente tratada com radiação Ultra Violeta e 1ppm de Cloro. Amostras localizadas no quarto andar de caixas no tanque de depuração.

Tabela 3: Detecção por PCR de *S. Typhimurium* em amostras de ostras submetidas a processo de depuração com água tratada simultaneamente com 1ppm de Cloro e UV.

<b>Tempo de Depuração</b>	<b>Andar</b>	<b>PCR*</b>
<b>6h</b>	<b>1</b>	1/3
	<b>2</b>	2/3
	<b>3</b>	3/3
	<b>4</b>	2/3
<b>12h</b>	<b>1</b>	2/3
	<b>2</b>	1/3
	<b>3</b>	2/3
	<b>4</b>	1/3
<b>18h</b>	<b>1</b>	1/3
	<b>2</b>	1/3
	<b>3</b>	2/3
	<b>4</b>	1/3
<b>24h</b>	<b>1</b>	1/3
	<b>2</b>	1/3
	<b>3</b>	0/3
	<b>4</b>	1/3
<b>Controle positivo Pré depuração</b>	3/3	
<b>Controle negativo Pós depuração</b>	0/3	

\* Os resultados estão indicados como o número de réplicas com resultados positivos na PCR

#### 4.8.2.4 Análise estatística dos resultados da depuração comercial

As análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 4*. Como resultado, cada andar, em cada um dos três diferentes tratamentos, apresentou o índice  $R^2$  aproximadamente igual a 0,9. Este valor demonstra a forte dependência da variável Y (UFC/g) em relação à variável X (Tempo de depuração). Os valores de  $R^2$  referentes a cada tratamento e a cada andar, juntamente com os valores de DT90, estão indicados na Tabela 4.

A análise de variância indicou que não houve diferença significativa entre os quatro andares para cada tratamento individualmente. A análise dos dados qualitativos, da mesma forma, não apresentou diferença significativa entre os andares.

A análise entre os diferentes tratamentos indicou que não houve diferença estatística entre os tratamentos com 1ppm de Cloro e a associação deste com ultravioleta. Esses resultados podem ser justificados pelo pequeno número de repetições e altos desvios encontrados. Devido à ausência do suporte no fundo do tanque de depuração durante os experimentos com UV, este tratamento não foi incluído nas avaliações estatísticas que envolveram comparações com os demais tratamentos.

Tabela 4: Valores de DT90 e R<sup>2</sup> para cada andar de caixas do tanque de depuração, referentes aos diferentes tratamentos da água.

<b>Tratamento da Água</b>	<b>Andar</b>	<b>DT90</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Cloro 1ppm</b>	<b>1</b>	6h	0,8710
	<b>2</b>	6h	0,8562
	<b>3</b>	6h	0,8565
	<b>4</b>	12h	0,8610
<b>Ultra Violeta</b>	<b>1</b>	6h	0,8515
	<b>2</b>	6h	0,8724
	<b>3</b>	6h	0,8562
	<b>4</b>	6h	0,8822
<b>Cloro 1ppm/Ultra Violeta</b>	<b>1</b>	6h	0,8669
	<b>2</b>	6h	0,8829
	<b>3</b>	6h	0,8622
	<b>4</b>	12h	0,8885

#### **4.9 Avaliação da contaminação bacteriológica das águas de cultivo e da carne de ostras cultivadas em um ponto de cultivo da Ilha de Florianópolis**

Conforme descrito no item 3.13, entre os meses de março e outubro de 2005, foram avaliados os níveis de coliformes no ponto de cultivo de ostras no norte da Ilha de Florianópolis, bem como presença/ausência de *Salmonella* spp. no tecido de ostras cultivadas nesse local.

De acordo com a Tabela 5, foi possível verificar que os níveis de coliformes totais e *E. coli* foram mais elevados no mês de março. Nos meses de junho e julho, início de inverno, a contaminação bacteriana diminuiu consideravelmente.

A presença de *Salmonella* spp. foi detectada nos meses de março a outubro. Todas as amostras foram analisadas pelo Kit comercial e confirmadas por PCR. A Tabela 5 ilustra a

comparação dos resultados observados nas duas diferentes metodologias utilizadas para a detecção.

Tabela 5: Determinação de contaminação por *Salmonella* spp. em amostras de ostras coletadas entre Março e Outubro de 2005, e de Coliformes totais e *E. coli* na água, em um ponto de cultivo no norte da ilha de Florianópolis, através do uso de kit comercial e PCR.

<b>Mês da Coleta</b>	<b>CT (UFC/100mL)</b>	<b><i>E. coli</i> (UFC/100mL)</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. KIT</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. PCR</b>
<b>Março</b>	<b>4100</b>	<b>400</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Abril</b>	<b>700</b>	<b>&lt;100</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Mai</b>	<b>700</b>	<b>200</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Junho</b>	<b>300</b>	<b>&lt;100</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>Julho</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;100</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>Agosto</b>	<b>800</b>	<b>&lt;100</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Setembro</b>	<b>700</b>	<b>&lt;100</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Outubro</b>	<b>&lt;100</b>	<b>&lt;100</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>MG</b>	<b>490,95</b>	<b>129,7</b>	<b>5/8</b>	<b>8/8</b>

**MG: média geométrica; CT: Coliformes Totais**

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação dos protocolos para isolamento e purificação de material genético bacteriano a partir de tecido digestivo dissecado de ostras artificialmente contaminadas com *S. Typhimurium*

Existem inúmeros estudos (BEJ et al., 1994; BRASHER et al, 1998; BLACKSTONE et al, 2003; VAZQUEZ-NOVELLE et al, 2005) sobre a padronização de métodos moleculares para a detecção de microrganismos patogênicos em moluscos bivalves, em substituição aos métodos clássicos que são baseados no cultivo em meios de cultura e em testes bioquímicos. Independente do patógeno a ser detectado, a dificuldade a ser transposta é a complexidade da matriz da carne dos moluscos. No entanto, há uma tendência a um refinamento dos protocolos, com a finalidade de aumentar a sensibilidade e especificidade dos métodos, dando ênfase ao passo de concentração e obtenção de ácidos nucleicos com maior grau de pureza (SCHEU; BERGHOF; STAHL, 1998).

A metodologia básica para extração de ácidos nucleicos é baseada na lise tecidual, tratamento com enzimas proteolíticas, extração de ácidos nucleicos com solventes orgânicos e concentração com etanol ou isopropanol, sendo que o uso de kits comerciais de extração de DNA ou RNA está em expansão, os quais apresentam bons resultados, com a vantagem da redução do tempo de detecção (VAZQUEZ-NOVELLE et al, 2005).

Com o objetivo de remover os inibidores enzimáticos para a detecção por amplificação gênica, foi realizada a dissecação prévia das ostras, sendo utilizado somente o tecido digestivo para a extração dos ácidos nucleicos. Esta abordagem é amplamente reportada por outros autores para a detecção de patógenos virais em moluscos bivalves, já que as partículas virais ficam adsorvidas ao muco encontrado no divertículo digestivo, sendo este o local de maior concentração da contaminação (LE GUYADER, HAUGARREAU; MIOSSEC et al., 2000). A análise do tecido digestivo isolado, eliminando os tecidos das brânquias e manto, elimina a maioria das substâncias interferentes (ATMAR, NEILL, ROMALDE, et al. 1995; POMMEPUY et al, 2003; BEURET, BAUMGARTNER, SCHLUEP, 2003). O uso desta estratégia ainda não foi reportada para estudos de detecção de patógenos bacterianos. Apesar disso, a retirada dos tecidos ricos em carboidratos, proteínas e lipídios torna a amostra menos problemática para a detecção molecular.

As metodologias testadas neste trabalho demonstraram que a composição da amostra é altamente limitante no processo de purificação de ácidos nucleicos. O protocolo inicialmente testado teve por objetivo extrair o DNA genômico de *S. Typhimurium* diretamente de tecido digestivo dissecado de ostras artificialmente contaminadas. No entanto, as amostras apresentaram-se muito densas, o que dificultou a ação das enzimas proteolíticas e dos solventes orgânicos utilizados. O resultado obtido foi uma ineficiente purificação, com DNAs de baixa pureza, e ausência de detecção por PCR.

A extração do DNA diretamente das amostras, sem nenhum tratamento prévio, resultou em baixos níveis de sensibilidade das técnicas, devido às impurezas presentes nos ácidos nucleicos, mesmo após os passos de extração. Neste caso, a dissecação das amostras não mostrou-se suficiente para diminuir o teor de proteínas, carboidratos e lipídios das amostras. A possibilidade encontrada para reverter esses resultados foi a adição de um passo de semeadura bacteriana em meio de cultura apropriado, previamente ao processo de extração e purificação dos ácidos nucleicos bacterianos. Esta estratégia apresenta a vantagem de multiplicar o organismo, assegurar a viabilidade deste e diminuir inibidores presentes na amostra (SCHEU; BERGHOF; STAHL, 1998).

Os enriquecimentos não seletivo e seletivo, são amplamente encontrados em trabalhos que avaliam a detecção de bactérias em amostras ambientais. O tipo de meio de cultura varia com o microrganismo a ser detectado, mas os meios não seletivos, também conhecidos como meios de pré-enriquecimento, não são altamente enriquecidos, pois têm por finalidade, somente permitir que somente microrganismos que apresentem alguma injúria, ou que estejam temporariamente inativos por causa das adversidades do ambiente em que se encontram, sejam reativados pelo contato com os nutrientes do meio de cultura e retornem à sua atividade replicativa, facilitando o processo de detecção (JITRAPAKDEE et al., 1995; DOORN et al, 1998; YAM et al, 1999; VANTARAKIS; KOMNINOU, PAPAPETROPOULOS, 2000; LEE; PANICKER; BEJ, 2003; HARWOOD, GANDHI, WRIGHT, 2004).

De acordo com as normas da ANVISA para a detecção de *Salmonella* spp. em amostras ambientais e de alimentos no Brasil, as quais são baseadas na regulamentação norte americana (BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL, FDA, 2005), o meio de cultura utilizado como pré-enriquecimento é o Caldo Lactosado. Outros meios para pré-enriquecimento também podem ser utilizados, como Água peptonada Tamponada. De acordo com VAZQUEZ-NOVELLE et al. (2005), a comparação de 4 protocolos diferentes de extração do



DNA bacteriano de ostras contaminadas (isotiocianato de guanidina, lise com detergentes, Chelex<sup>®</sup> -100 e E.Z.N.A Mollusc Kit) demonstrou que, mesmo o uso de kits comerciais requer um passo anterior de enriquecimento bacteriano para aumentar a quantidade do ácido nucléico extraído. Esse mesmo trabalho, considerou que o uso da resina Chelex<sup>®</sup> -100, combinado a um enriquecimento em água peptonada por no mínimo 3,5 h, apresentou melhor resultado do que a extração do DNA diretamente da carne. A utilização de meios de cultura seletivos após o enriquecimento não seletivo, promove efetivamente o isolamento do patógeno de interesse, no entanto, como apresentado no presente trabalho, a eficiência da remoção de inibidores foi similar a do uso exclusivo de meio não seletivo.

Além da necessidade de um passo de enriquecimento, diferentes períodos de incubação também interferem na qualidade e quantidade dos ácidos nucléicos extraídos. Um tempo mais prolongado de incubação em temperatura adequada aos microrganismos, garante que baixos níveis de contaminação possam ser detectados, além de diluir mais eficientemente os inibidores da amostra.

Os resultados da curva de incubação, observados neste trabalho corroboram com outros publicados na literatura (SOUMET et al.1997, VANTARAKIS et al. 2000, FERRETTI et al. 2001, VAZQUEZ-NOVELLE et al. 2005). Foi observado que a presença de *Salmonella* poderia ser detectada a partir de 2h de incubação, no entanto, a intensidade do sinal da PCR foi mais forte a partir de 6h de incubação. O uso de diferentes períodos de incubação já foi reportado por outros autores, no entanto, alguns deles demonstraram que 4h ou mais de crescimento bacteriano deve ser utilizada para garantir a sua detecção (BEJ et al. 1994, BENNET et al. 1998, RYCHLIK et al. 1999, LEE et al. 2003).

O protocolo de extração do DNA bacteriano a partir do enriquecimento das amostras de ostras artificialmente contaminadas foi idêntico ao utilizado para a extração a partir de cultura pura de *Salmonella* spp., considerando que o passo de pré- enriquecimento, juntamente com o uso de ostras dissecadas, foi eficiente na remoção dos inibidores.

A purificação do material genético com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), facilitou a eliminação de impurezas presentes nas amostras após a desproteíntização enzimática. Este detergente catiônico é amplamente utilizado na purificação seletiva dos ácidos nucléicos e eliminação de polissacarídeos das amostras (ARNAL; FERRE-AUBINEAU; BESSE,1999; LEES, 2000). Em soluções de alta força iônica, o CTAB forma complexos com proteínas e polissacarídeos, mas não precipita ácidos nucléicos

(SAMBROOK, RUSSEL, 2001). Esses complexos são removidos da solução por extração com solventes orgânicos. Considerando que a maioria das salmonelas apresenta uma cápsula polissacarídica, a utilização do CTAB após a desproteinização com proteinase K fez-se necessária para a purificação eficaz do DNA bacteriano.

A avaliação da qualidade do DNA extraído, através de espectrofotometria, demonstrou que este protocolo de extração escolhido foi eficiente, apresentando DNAs de alta pureza e sem contaminação por solventes orgânicos.

## **5.2 Reação de PCR para detecção de *S. Typhimurium***

O uso do PCR para detectar a presença de *Salmonella* é uma metodologia mais sensível e rápida para a detecção deste microrganismo. Apesar de a detecção direta por PCR ser bastante utilizada, a inclusão de um passo de enriquecimento (seletivo ou não seletivo) para amostras ambientais, previamente à amplificação gênica, apresenta inúmeras vantagens, como a diluição de substâncias inibidoras de reações enzimáticas, um aumento da intensidade da banda e o aumento da concentração do patógeno. Além disso, evita resultados falso-negativos, aumenta a sensibilidade da técnica, permitindo a detecção de microrganismos viáveis.

Alguns trabalhos publicados (ABDULMAWJOOD et al. 2002, KLERKS et al. 2004, JOFRÉ et al. 2005) incluem o uso de iniciadores internos para genes expressos constitutivamente, como controles internos para a reação de PCR. Esta abordagem é especialmente recomendada quando os inibidores são constantes na amostra. A reação de PCR descrita neste trabalho foi eficiente na amplificação do produto de 387pb, tanto para DNA bacteriano isolado de cultura pura, como para DNA isolado de tecido digestivo de ostras, dispensando, portanto, o uso de controles positivos internos nas reações.

A especificidade da reação de PCR é determinada pela sequência dos iniciadores escolhidos e pelas condições da reação que devem ser otimizadas para minimizar amplificações não específicas. A sensibilidade do sistema depende não somente das condições de reação, mas, fundamentalmente, da matriz da amostra e do método de extração do DNA. Para a PCR, a matriz da amostra é decisiva para o sucesso da técnica (WAY et al., 1993).

Os iniciadores utilizados flanqueiam uma região conservada do gene *invA*, presente no gênero *Salmonella*. Iniciadores que flanqueiam regiões desse gene são amplamente utilizados na literatura (CHIU; OU et al, 1996; COCOLIN et al., 1998; FERRETTI et al., 2001; MALKAWI; GHARAIBEH, 2003; MALKAWI, 2003; MALORNY et al., 2004; BANAVANDI et al., 2005). A concentração de íons magnésio e o pH influenciam diversas etapas da amplificação, como a atividade das enzimas, a ligação dos iniciadores e a dissociação das fitas (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Diferentes concentrações de  $MgCl_2$  podem ser requeridas de acordo com o tipo de amostra (SCHEU; BERGHOF; STAHL, 1998). A utilização de 2mM de  $MgCl_2$  como padrão para as reações de PCR, tanto para DNA extraído de cultura pura, como para DNA de amostras contaminadas, mostrou-se ideal, visto que o perfil eletroforético das bandas amplificadas foi sempre claro, sem a presença de rastros ou bandas inespecíficas.

A curva de iniciadores da reação foi fundamental para a qualidade dos produtos amplificados. Observou-se que, com um aumento progressivo da concentração de ambos iniciadores, ocorreu o aparecimento de bandas não específicas, de maior peso molecular que a banda esperada. A utilização de 20pmol de cada iniciador, por tubo de reação, permitiu a amplificação somente da banda específica.

Uma preocupação constante nas metodologias de amplificação gênica são os falsos resultados. Para diminuir a possibilidade de ocorrência de resultados errôneos na detecção de *Salmonella* spp. em ostras, todas as etapas relacionadas à reação de PCR foram controladas. Os procedimentos de montagem da reação, a adição do DNA molde, a colocação no termociclador e visualização por eletroforese em gel de agarose foram realizadas em dependências diferentes do laboratório e, em todos os ensaios, foram incluídos controles positivos e negativos para o monitoramento da qualidade dos reagentes.

### **5.3 Hibridização molecular como avaliação confirmatória da reação de PCR para a detecção de *S. Typhymurim***

As condições de hibridização molecular utilizadas neste trabalho foram previamente padronizadas, no Laboratório de Virologia Aplicada, por Sincero (2006) para detecção de vírus da Hepatite A a partir de fluido viral e tecido dissecado de ostras.

A hibridização molecular é uma técnica que vem sendo utilizada há vários anos, mesmo antes da PCR (MEINKOTH, WAHL, 1984; CANNON, HEINSHORT, WEISSBACH, 1985). Com o surgimento da técnica de amplificação gênica (MULLIS et al., 1986), a hibridização passou também a ser utilizada como um método confirmatório para a PCR. Portanto, a utilização combinada das duas técnicas contorna problemas enfrentados quando da utilização individual de cada uma delas, como a susceptibilidade a inibidores da PCR e a menor sensibilidade da hibridização molecular isolada. A amplificação inicial da seqüência alvo por PCR torna a hibridização mais eficaz, e por não envolver reações enzimáticas, é menos susceptível à ação de inibidores presentes nas amostras (SINCERO, 2005).

As sondas utilizadas com maior frequência são oligonucleotídeos, complementares a uma seqüência interna ao produto amplificado, ou a utilização da mesma seqüência do produto de PCR. Estas sondas devem ser marcadas radioativa ou quimicamente, para a posterior detecção dos híbridos. A marcação química, com biotina ou digoxigenina por exemplo facilita a manipulação, eliminando os riscos de contato com elementos radioativos (SCHEU; BERGHOF; STAHL, 1998).

Em amostras ambientais, a hibridização molecular foi, na última década, aplicada para a detecção de diversos patógenos bacterianos, como *Salmonella* spp. (JONES et al., 1993; BEJ et al, 1994; TSEN et al, 1994), *E. coli* (MEYER et al, 1991; ANDERSEN, OMIECINSKI, 1992), *Shigella* spp. (BEJ et al, 1991), *Vibrio* spp. (HILL et al, 1991; KOCH et al, 1991; LEE et al. 1995). As técnicas aplicadas apresentaram sensibilidades variáveis e atualmente, a hibridização vem sendo mais utilizada, assim como a técnica de PCR em tempo real, com a finalidade de refinar os protocolos de detecção e quantificação de patógenos presentes em amostras ambientais.

Quando altos níveis de contaminação estão presentes nas amostras, a amplificação gênica seguida por eletroforese, pode ser suficiente para a detecção, mas quando baixos níveis de contaminação estão presentes, a hibridização apresenta-se necessária para prover suficiente sensibilidade na detecção. Neste estudo, o uso da hibridização molecular como teste confirmatório da PCR, proveu maior sensibilidade na detecção de *Salmonella* spp. e maior confiança nos resultados obtidos. Foram utilizadas dois tipos diferentes de sondas: uma do próprio produto amplificado por PCR e outra constituída por um oligonucleotídeo complementar a uma seqüência interna a esse produto.

A utilização do produto de PCR marcado com digoxigenina após a transferência por *Southern blot* confirmou apropriadamente o peso molecular da banda e contribuiu para aumentar a sensibilidade da detecção. O uso do produto de PCR marcado como sonda, proveu um suficiente nível de especificidade, já que hibridização não específica não foi observada no controle de tecido de ostra não inoculado. Esse tipo de sonda, apesar de apresentar baixo custo e alta sensibilidade, não é apropriada para a hibridização com produtos de PCR aplicados na membrana por *dot blot*, já que a sonda pode hibridizar com iniciadores não incorporados ao produto, resultando em um resultado falso-positivo. Para esses caso, recomenda-se a purificação dos produtos de PCR por cromatografia de gel filtração previamente à aplicação na membrana ou o uso de oligonucleotídeos internos como sonda.

#### **5.4 Comparação dos limites de sensibilidade de *S. Typhimurium* obtidos com o tecido digestivo de ostras, por PCR e Hibridização Molecular**

Em amostras ambientais, os patógenos estão altamente dispersos e, por esse motivo, os métodos de detecção necessitam ser altamente sensíveis. Neste trabalho, foi avaliado o limite de detecção de duas técnicas: PCR e PCR seguido de hibridização molecular, a partir de DNA bacteriano isolado de tecido digestivo de ostras. Com essa comparação foi possível verificar se o protocolo para concentração das bactérias nos tecidos dos moluscos, e extração e purificação do DNA foi eficiente na remoção dos inibidores presentes no tecido digestivo dos moluscos.

O nível de detecção bacteriana a partir do tecido digestivo de ostras foi de 10UFC/g e 0,1UFC/g, antes e após a hibridização molecular, respectivamente. Estes resultados estão em concordância com os resultados previamente reportados e na literatura. Vantarakis et al. (2000) detectaram a presença de 10-100 células destes microrganismos por grama do homogenato do tecido, com o uso um pré enriquecimento para a detecção *Salmonella* e *Shigella* em mexilhões por multiplex PCR. Da mesma forma, Vazquez-Novelle et al. (2003), obtiveram um limite de detecção de *Salmonella* spp. de 10UFC/g de tecido de ostras. Esses resultados foram observados como base na amplificação por PCR sem qualquer outra metodologia confirmatória.

Trabalhos realizados na década de 90 apresentaram limites de detecção de patógenos em moluscos bivalves, relativamente baixos com o uso da hibridização molecular. Tsen et al,

em 1994, detectaram 10 células de *Salmonella* spp. por grama de tecido, com o uso de PCR seguida de hibridização com sonda radioativa; Jones et al. (1993) apresentaram um limite de detecção para *Salmonella* spp. de 40 células/g. Atualmente, as metodologias de detecção estão se tornando mais sensíveis e esses níveis estão sendo refinados. O uso de Nested-PCR e hibridização molecular pode aumentar os limites de detecção para níveis bastante altos (por exemplo, 1 célula por grama de amostra), sendo essas técnicas importantes para garantir um resultado confiável (VAZQUEZ-NOVELLE et al, 2005).

### **5.5 Sistemas de depuração e dinâmica de acumulação e de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras de cultivo**

Este estudo foi desenvolvido para investigar a dinâmica de depuração de ostras artificialmente contaminadas por *S. Typhimurium*. Os experimentos foram realizados em escala laboratorial, com o uso de água do mar filtrada, e em um sistema comercial de depuração, com três diferentes tratamentos de água.

Os ensaios sob condições laboratoriais resultaram em uma significativa redução dos níveis de *S. Typhimurium* nas ostras contaminadas. Foi observada uma alta eliminação em períodos curtos de exposição à água do mar filtrada (3-4h), no entanto, ocorreu uma recontaminação nos períodos mais prolongados (12-16h). Esses resultados devem-se ao fato de que a falta de movimentação da água e de algum tratamento para desinfecção da mesma, permite que as ostras entrem em contato direto com seu material fecal, facilitando a reingestão dos patógenos já eliminados. A ausência de tratamento e movimentação da água para a depuração é denominado *batch process* e já é reconhecido como ineficiente na eliminação de patógenos, permitindo um contato prolongado dos moluscos com a fezes e pseudofezes (RICHARDS, 2003). No entanto, estes ensaios realizados em escala laboratorial auxiliaram no entendimento preliminar do comportamento dos moluscos frente ao processo de depuração, facilitando o delineamento experimental para os ensaios diretamente no sistema comercial de depuração.

O turbilhonamento da água durante o processo facilita na aeração do sistema e não permite que as excretas fiquem depositadas por muito tempo no fundo do tanque de depuração, facilitando a retirada destas pelo sistema de captação da água. Dessa forma, o sistema de fluxo contínuo apresenta vantagens sobre o sistema de *batch process*. Há poucos

trabalhos que reportam o uso de fluxo contínuo, principalmente pelo fato da necessidade do grande volume de água utilizado no processo. Marino et al (2003) relatou o uso de um tanque com taxa de renovação da água de 180L/h, para avaliar a eliminação de *Vibrio cholerae*; *Salmonella typhi*, *E.coli* e *V. harveyi* por mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*). Nesse sistema, para alcançar níveis indetectáveis de *S. typhi* e *E. coli*, foram necessárias 96 h de depuração, partindo-se de uma contaminação inicial de  $10^7$  UFC/g para ambos microrganismos. Para a eliminação de *V. cholerae* e *V. harveyi*, com contaminação inicial de  $10^6$  UFC/g foram necessários sete dias de depuração para que não fosse possível detectá-los nos moluscos. Em um estudo mais recente desse mesmo grupo de pesquisadores (MARINO et al, 2005), foi demonstrado que, para a eliminação de *Enterococcus durans* em mexilhões (*M. galloprovincialis*), no mesmo sistema de depuração, foram necessárias 168h. Esses resultados, demonstram que sistema de fluxo contínuo apresenta eficiência na eliminação da contaminação, no entanto, para essa ser alcançada, é necessário um tempo mais prolongado de depuração, o que dificultaria a utilização desta metodologia como prática de rotina em locais de produção de moluscos.

O sistema de recirculação de água traz a vantagem da economia no volume de água utilizado. Para que esse tipo de sistema seja efetivo é obrigatória a desinfecção da água durante o processo de depuração. A depuradora avaliada no presente estudo apresenta um sistema de recirculação de água, no qual é 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).

Os resultados alcançados no presente estudo demonstraram a eficiência do sistema avaliado. A dinâmica de eliminação pelo tratamento com UV apresentou a eliminação da contaminação em 24h nos três primeiros andares; o tratamento com cloro apresentou uma eliminação crescente em relação ao tempo, mas com a eliminação total da contaminação somente do último andar. A associação dos tratamentos apresentou um sinergismo positivo entre os dois tratamentos, o que antecipou para 12h a eliminação completa de bactérias viáveis.

A eliminação diferencial entre as amostras das diversas repetições, observada em alguns períodos durante os tratamentos com Ultravioleta e Cloro também foi encontrada em outros trabalhos anteriormente publicados sobre depuração de ostras e mexilhões (ROWSE; FLEET, 1984; MURPRHEE; TAMPLIN, 1991; DORÉ; LEES, 1995; CROCI et al., 2002), no

entanto, assim como os resultados encontrados neste trabalho, a eliminação diferencial não apresentou efeito significativo e ficou entre as variações esperadas e aceitáveis para este tipo de experimento. Esta diferença pode ser justificada pela variação biológica da atividade filtradora entre as diferentes amostras, a qual sofre variações durante o período de depuração, resultando em uma eliminação diferencial dos patógenos em suas fezes.

O último andar, localizado no fundo do tanque de depuração, em geral, apresentou uma taxa de eliminação mais lenta que os demais, o que foi evidenciado pelos valores encontrados para a concentração de bactérias viáveis no tecido digestivo das ostras. Esses valores foram constantemente mais altos quando comparados aos encontrados nos demais andares. Da mesma forma, o DT90, foi mais alto para o último andar, apresentando o valor de 12h. O volume de moluscos em cada caixa e a quantidade de caixas empilhadas no tanque de depuração pode causar a eliminação diferencial entre as amostras. De acordo com dados encontrados no Guia para inspeção de sistemas de purificação de moluscos, da União Européia (*Center for Environmental, Fisheries and Aquaculture Science - CEFAS, 1998*), conforme a quantidade de andares no interior do tanque, há a necessidade de um maior fluxo de água recirculando a cada hora, para que, dessa forma, ocorra uma movimentação homogênea da água por todos os andares. Este guia indica que, para sistemas com 3 andares, o ideal é a recirculação por 2 vezes a cada hora do volume total de água no tanque; já um sistema com 6 andares necessita uma recirculação de 5 vezes por hora. A vazão da bomba de recirculação usada neste trabalho é de 2.200L/h, portanto, apresenta-se suficiente para a recirculação do volume total do tanque a cada hora.

Apesar de serem observadas diferenças no padrão de eliminação bacteriana entre os tratamentos, a análise estatística desta eliminação demonstrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos de UV/Cloro e Cloro isoladamente. Os andares, também foram apresentados estatisticamente como sendo todos eficientes da mesma maneira para o processo de eliminação. Esse resultado provavelmente deve-se aos grandes desvios encontrados nos resultados. Esses desvios já eram esperados, considerando-se o processo de filtração como um processo biológico, suscetível a variações fisiológicas em cada uma das amostras analisadas. Entretanto, optou-se pela escolha da associação dos tratamentos UV/Cloro por ter sido capaz de eliminar completamente as bactérias em um menor período de tempo (12h).



### **5.5.1 Avaliação da eficiência dos diferentes tratamentos da água utilizada no sistema comercial de depuração.**

Os tratamentos escolhidos para esse sistema, ultravioleta e cloro, são os mais utilizados em sistemas de depuração, sendo que os raios Ultravioleta são conhecidamente mais efetivos que a cloração. A seleção do tratamento da água deve levar em consideração a eficiência do método na eliminação de microrganismos e, principalmente, se este apresenta toxicidade aos moluscos. A manutenção da viabilidade dos moluscos, da capacidade filtradora e das características da textura e do sabor devem primariamente ser consideradas para a escolha do tratamento de água. No presente trabalho, foi avaliada a eficiência da aplicação individual de cada método de esterilização. Durante as repetições de cada um dos tratamentos foi possível observar diferenças macroscópicas entre as amostras submetidas à depuração com água tratada com Hipoclorito de Sódio e as submetidas a tratamento com UV. Algumas das amostras do tratamento com cloro apresentaram alteração de odor e leve ressecamento, enquanto as amostras tratadas com UV estavam sem quaisquer alteração física. Além dessas observações, foi possível verificar também a presença de outras bactérias, não *S. Typhimurium*, no tecido digestivo dos moluscos depurados com cloro, o que não foi observado nas amostras depuradas com UV. Essas observações indicaram a possibilidade de efeito tóxico do cloro sobre os moluscos (limitação da filtração) e conseqüente baixa eficiência de desinfecção. No entanto, o evento de desova das ostras ocorrido durante duas repetições com o tratamento com cloro, pode ter limitado a ação do filtro de areia, o que tornou a água turva e viscosa, prejudicando a atividade normal de filtração dos moluscos.

O tratamento com cloro é o método mais tradicional e comum para a desinfecção de águas contaminadas. É um método bastante eficiente contra bactérias entéricas, mas apresenta baixa eficiência contra vírus, esporos bacterianos e protozoários (OPPENHEIMER et al., 1997; MONARCA et al., 2000). O uso deste tratamento químico têm sido diminuído, principalmente devido ao efeito tóxico, mutagênicos e/ou carcinogênicos dos produtos produzidos na desinfecção (*Disinfection by-products-DBP*), além do cloro residual (KOIVUNEM; HEINONEM-TANSKI, 2005). De acordo com Richards (2003), a efetividade do cloro no processo de depuração, apesar de ser alta, vai de encontro a sua extrema toxicidade aos moluscos, já que altas concentrações de cloro pode ocasionar inibição da filtração, bem como a desova e morte dos moluscos.

A escolha da concentração de 1ppm de cloro foi baseada no fato que essa concentração é aceitável para a eliminação de patógenos em águas que não sejam destinadas ao consumo. Desta forma, estudos mais detalhados com concentrações decrescentes de cloro, combinados à análise de toxicidade aos moluscos, podem ser realizados para avaliar qual a mínima concentração de cloro aceitável para o tratamento de água para depuração.

A aplicação da radiação ultravioleta em sistemas de depuração é amplamente difundida e 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 (DBP) ou outros resíduos químicos. A desvantagem do UV é a possibilidade de fotoreativação ou reparo dos microrganismos inativados, possibilitando um retorno do crescimento da população microbiana sob certas condições. Os efeitos fotoquímicos do UV em alguns seres vivos, incluindo os microrganismos, pode ser revertido por iluminação, com longos comprimentos de onda, especialmente luz visível (320-400nm) (UPADHYAYA et al., 2004). Em sistemas de depuração, para a utilização de lâmpadas de UV obrigatoriamente a água deve ser filtrada em um filtro de areia para a eliminação do material em suspensão, porque a turbidez da água impede a penetração dos raios, limitando a ação sobre os microrganismos.

Recentemente, uma nova abordagem em desinfecção de águas é a utilização de processos de oxidação avançada. Esses processos são baseados na utilização de oxidantes secundários, tais como radicais hidroxila, os quais são tipicamente gerados pela interação de raios ultravioleta com algum desinfetante químico (CARETTI; LUBELLO, 2003). Radicais hidroxila são considerados como os mais reativos agentes oxidantes em tratamentos para desinfecção de águas. Portanto, a associação de dois métodos torna a desinfecção mais eficiente por causa da soma de efeitos contra os microrganismos alvo.

Neste trabalho foram realizados ensaios de depuração utilizando a associação do cloro com a radiação ultravioleta. Desta forma, foi possível observar que há um aumento na eficiência da desinfecção da água, acompanhada da diminuição do tempo de depuração. Essa associação ainda não foi relatada na literatura sobre depuração de moluscos, principalmente devido a possibilidade de efeitos tóxicos e presença de resíduos de cloro no molusco.

Os resultados encontrados com a associação de tratamentos podem ser explicados pelo mecanismo de múltiplos danos, relatado por Koivunem e Heinonem-Tanski (2005), no qual dois diferentes métodos de desinfecção podem causar diferentes tipos de danos aos

microrganismos. O principal alvo da radiação UV é o material genético; enquanto os desinfetantes químicos têm como alvo primário a parede celular, membranas e sistemas enzimáticos e de transporte. Como resultado, os mecanismos de reparo podem ficar sobrecarregados, levando à incapacidade de reparar os danos e conseqüente morte do microrganismo. No caso de uso de um único tratamento, os danos podem ser menores e suscetíveis ao reparo, o que não pode ser possível no caso do uso de dois métodos de desinfecção, causando uma ampla variedade de injúrias (LUBELLO; CARETTI; GORI, 2002).

Inicialmente, o sistema de depuração utilizado neste trabalho teria um sistema de produção de ozônio, como outra alternativa de tratamento da água, além da lâmpada de UV e a bomba dosadora de cloro. Devido ao alto custo de montagem e manutenção deste sistema de esterilização, o que tornaria o sistema de depuração altamente oneroso para a comunidade de maricultores artesanais, este equipamento foi suprimido no projeto.

O gás ozônio é uma substância com forte ação antimicrobiana devido a seu potencial oxidativo, que destrói progressivamente componentes celulares vitais, como a parede bacteriana e membrana celular, podendo também atacar os ácidos nucléicos. (VICTORIN, 1999; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004). Apesar destas vantagens que indicam o ozônio como um potente agente desinfetante para a água utilizada nos sistemas de depuração, este método apresenta limitações referentes a sua toxicidade aos moluscos. De acordo com Richards (1991), após o tratamento da água com ozônio, este deve ser removido antes da água entrar no tanque em contato direto com os moluscos. Esta remoção pode ser realizada com uma vigorosa aeração da água.

A regulamentação internacional, citada anteriormente, permite o uso de cloro e ozônio para tratar a água para depuração, mas a radiação ultravioleta é o sistema de escolha na América do Norte e na Europa. O uso de iodóforos é pouco reportado na literatura, mas é praticado comercialmente na Itália, e nenhum efeito adverso na fisiologia ou textura dos moluscos foi avaliado (RICHARDS, 1991). A Tabela 6 mostra uma comparação dos diferentes métodos para desinfecção da água nos sistemas de depuração.

Tabela 6: Aspectos comparativos de 4 métodos para desinfecção de água marinha utilizados em sistemas de depuração.

<b>Operação e Condições</b>	<b>Radiação UV</b>	<b>Cloro</b>	<b>Ozônio</b>	<b>Iodóforos</b>
<b>Custos de montagem</b>	Baixo	Médio	Alto	Médio
<b>Custos de Operação</b>	Baixo	Baixo	Alto	Baixo
<b>Instalação</b>	Simples	Complexo	Complexo	Complexo
<b>Manutenção</b>	Fácil e de baixo custo	Moderada e de baixo custo	Difícil e de alto custo	Baixo Custo
<b>Subprodutos</b>	Nenhum	THM <sup>1</sup>	Produtos Tóxicos	THM <sup>1</sup>
<b>Tempo de Contato</b>	1- 5 min	30- 60min	10-20 min	30-60min
<b>Toxicidade ao Molusco</b>	Nenhuma	Sim	Sim	Sim

THM<sup>1</sup>: Trihalometanos (Fonte: RODRICK; SCHNEIDER, 2003)

### 5.5.2 Avaliação das técnicas utilizadas para o monitoramento do processo de depuração

A contaminação microbiológica em alimentos, como os moluscos, apresenta risco para a saúde dos consumidores, conforme sua viabilidade. Microrganismos que tenham sido mortos pela ação de algum tratamento químico ou físico deixam de ser infecciosos, não apresentando risco (KEER; BIRCH, 2003).

No caso dos moluscos bivalves, que são ingeridos crus ou pouco cozidos, a avaliação da viabilidade da contaminação é extremamente importante. As metodologias utilizadas neste estudo combinaram técnicas de microbiologia clássica, como enriquecimento e plaqueamento em meios seletivos, combinadas a análises moleculares, baseadas na detecção de um determinado segmento de DNA.

Conforme citado anteriormente, apesar de metodologias moleculares para detecção de microrganismos apresentarem maior especificidade e sensibilidade, no caso do monitoramento de um sistema de depuração esses métodos não são os mais adequados como único parâmetro. Dentre todos os trabalhos estudados sobre o monitoramento de depuração de patógenos bacterianos por moluscos, somente um apresentou a utilização da amplificação gênica. Croci et al. (2002) avaliou a depuração de mexilhões artificialmente contaminados com *E. coli*, *V. cholerae* O1 e *V. parahaemolyticus*. Neste trabalho, o monitoramento desta dinâmica foi realizado primeiramente com a técnica de NMP e a PCR foi utilizada somente como teste confirmatório para as amostras positivas para *Vibrios*.

Com os tratamentos para a desinfecção da água, as bactérias podem sofrer diversos danos, mas nem sempre ocorre a total degradação do genoma. Com isso, o uso isolado de análises moleculares, como PCR e hibridização molecular, apresentam a possibilidade de resultados falsos positivos. A presença de DNA de *S. Typhimurium* foi detectada por PCR mesmo nas amostras que não apresentaram viabilidade celular. Isto é devido ao fato que tratamentos químicos e radiação UV claramente inativam as bactérias que são liberadas pelos moluscos. Com a reingestão de água, que contenha quaisquer níveis de bactérias inativadas, os moluscos podem acumular em seus tecidos esses microrganismos inativados, apresentando resultados positivos em análises moleculares. Portanto, a quantificação de bactérias, utilizando metodologias clássicas de microbiologia, foi mais apropriada para comprovar a viabilidade da contaminação no tecido digestivo das ostras.

### 5.5.3 Otimização do sistema de depuração

Os resultados obtidos no presente estudo são as primeiras informações, no Brasil, sobre a dinâmica de eliminação de *S. Typhimurium* por ostras de cultivo utilizando um sistema fechado de depuração com água do mar filtrada e tratada. Os grandes mercados produtores de moluscos bivalves apresentam sólidas regulamentações referentes à validação e monitoramento periódicos dos sistemas de depuração. Essas regulamentações exigem um controle de qualidade sobre o sistema de depuração utilizado, os procedimentos desde a coleta dos moluscos até a comercialização após depuração, a qualidade da água e monitoramento da temperatura e salinidade durante o ciclo de depuração. Além disso, o tempo mínimo exigido para a depuração é de 48h (CEFAS.1998; NSSP-FDA, 2003). A legislação brasileira não apresenta regulamentações referentes a sistemas de depuração e portanto, o desenho experimental deste trabalho foi baseado no objetivo de avaliar a possibilidade de uma depuração em menor tempo possível, associada a um tratamento de água com baixo custo para os produtores.

Uma dificuldade encontrada foi a deposição das excretas dos moluscos no fundo do tanque de depuração. Este acúmulo de fezes pode ter permitido a recontaminação dos moluscos, e para evitar repetidas contaminações, foi providenciado um suporte com o qual as caixas com ostras foram afastadas do contato com o material fecal. Com esta modificação, a possível recontaminação não foi reincidente, e foi possível a eliminação total da contaminação em todos os andares.

Dentre os tratamentos avaliados, o tratamento com cloro necessitaria um monitoramento da perda de cloro durante as 24h, o que traria uma segurança sobre a concentração real de cloro na água. Os efeitos da desinfecção química da água sobre os moluscos, de acordo com Richards (2003) podem ser minimizados com a adição de um passo de neutralização do cloro com tiosulfato de sódio, previamente à entrada da água clorada no tanque juntamente com os moluscos. Esta estratégia foi utilizada por Suplicy (1998) em estudos sobre a dinâmica de depuração de mexilhões *P. perna*, apresentando uma redução de *E.coli* a níveis aceitáveis pela legislação ao final de 48h. Para a garantia da concentração exata de cloro presente na água a cada recirculação, evitando um acúmulo e toxicidade aos moluscos, podem ser realizadas análises periódicas da concentração deste desinfetante a cada hora do ciclo de depuração. Com isso, é possível determinar a quantidade mínima de cloro

que deve ser adicionada a cada recirculação para a manutenção da concentração final escolhida.

Um maior aprimoramento deste sistema ocorrerá pela eliminação de excretas que se depositam no fundo do tanque. Apesar de não ter afetado os demais experimentos, a retirada deste material fecal será uma garantia de minimizar possíveis recontaminações.

A limpeza do sistema de depuração é um fator muito controlado nas regulamentações internacionais. Para isso, moluscos mortos ou conchas vazias devem ser retirados antes e depois da depuração. Esta remoção reduz os odores, os quais podem atrair insetos, roedores e outros animais, e reduz a probabilidade da recontaminação dos moluscos. Desinfetantes comerciais devem ser usados para a limpeza da superfície interna do tanque de depuração, e também da tubulação, mas deve ser realizado um enxágüe bastante rigoroso para eliminar qualquer resíduo destes desinfetantes que possam ser tóxicos aos moluscos. Por essa razão, o tanque, as bombas e a tubulação devem ser completamente livres de qualquer resíduo de desinfetantes químicos (CEFAS, 1998).

No presente trabalho, previamente aos ensaios, era realizada a limpeza do tanque com água potável, seguida da retrolavagem do filtro para a eliminação do material retido nos experimentos anteriores. Estes procedimentos devem ainda ser aprimorados para garantir uma desinfecção segura no tanque, nas caixas e na tubulação do sistema de depuração utilizado.

## **5.6 Determinação da contaminação microbiológica das amostras de campo, coletadas entre março e outubro de 2005**

### **5.6.1 Determinação dos níveis de coliformes nas amostras de água**

A bactéria *E. coli* é um indicador de contaminação fecal de origem humana, de outros mamíferos e de aves, enquanto os coliformes totais podem ser provenientes, também, de outros animais bem como do solo e da própria decomposição vegetal (NEILL, 2004). A presença de *E.coli* ou de coliformes fecais, somente indica que há possibilidade da presença de outros patógenos de origem fecal; portanto, a ausência ou baixos níveis destes indicadores não garantem a ausência de outros microrganismos patogênicos.

A placa Petrifilm<sup>®</sup> para a contagem de *E.coli* e coliformes é um sistema comercial de meio de cultura que contém os nutrientes do Ágar vermelho-violeta-bile (VRBA), um agente gelificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glicuronidásica (5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -glicuronídeo) e um indicador de tetrazólio para facilitar a enumeração das colônias (3M, 2001). Contudo, esta técnica, talvez por desconhecimento ou desatualização, ainda não é aceita pela legislação brasileira, a qual exige a adoção da clássica, mas arcaica, metodologia dos tubos múltiplos, que se baseia na capacidade dos coliformes fecais se replicarem a 45°C, enquanto que os coliformes totais não se multiplicam nesta temperatura (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER,1992).

Seguindo a legislação brasileira atual, o número de amostras analisadas seriam insuficientes para inferir sobre a qualidade da água destinada à produção de moluscos bivalves. O número mínimo de coletas deveria ser de 15 e a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes não deveria exceder 43 por 100mL, sendo que o percentil de 90% não deveria ultrapassar 88 coliformes termolerantes por 100 mililitros. Mesmo em número insuficiente, o resultado das coletas, para coliformes termotolerantes já indicou que estas águas analisadas apresentaram padrões de contaminação acima do exigido pela legislação.

Os níveis de *E.coli* permanecem os mesmos estabelecidos pela resolução no. 20, de 18 de março de 1986. De acordo com essa resolução, os níveis aceitáveis para *E.coli* não devem exceder 14 número mais provável (NMP)/100mL, com não mais que 10% da amostras acima



de 43 NMP/100mL. Da mesma forma, a área analisada permaneceria fora dos padrões requeridos para a criação de moluscos.

### **5.6.2 Determinação da presença de *Salmonella* spp. no tecido digestivo dos moluscos**

Os métodos para amostragem e análises bacteriológicas de carne de moluscos, conforme a resolução nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001), estão de acordo com as metodologias reconhecidas internacionalmente, como as dispostas em *Standart Methods for the Examination of Dairy Products* e *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, da *American Public Health Association* (APHA). Para o uso de quaisquer outras metodologias, as mesmas devem ser validadas por estudos comparativos intra e inter laboratoriais, para a certificação dos resultados obtidos.

Os métodos preconizados pela legislação nacional e internacional, para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, são baseados em enriquecimentos não-seletivos e seletivos, no plaqueamento em meios sólidos seletivos e diferenciais, além de diversos testes bioquímicos. Esses testes demoram muitos dias para serem concluídos e são bastante dispendiosos. Por esse motivo, com o intuito de facilitar e diminuir o tempo das análises, neste trabalho foi utilizado o kit microbiológico *Reveal Salmonella Test System*<sup>®</sup> da NEOGEN, o qual é aprovado internacionalmente pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). Todos os resultados foram também confirmados por PCR e por plaqueamento em meio seletivo e diferencial XLD (OXOID).

O kit *Reveal* tem por princípio a detecção imunoenzimática do antígeno bacteriano (ensaio imunocromático de corrida lateral). Este dispositivo contém anticorpos adsorvidos em sua matriz, com alta especificidade para antígenos de *Salmonella* spp. Esses anticorpos estão ligados a ouro coloidal e, separadamente, a um suporte sólido. Qualquer antígeno de *Salmonella* presente na amostra se ligará ao anticorpo conjugado presente no colóide, formando um complexo antígeno-anticorpo colorido. Esse complexo migra através da membrana e é subsequentemente reconhecido por um anticorpo imobilizado na membrana. Isto leva o complexo antígeno-anticorpo-ouro a precipitar formando uma linha rosa visível que indica o resultado positivo, conforme exemplificado.

Foi observada uma alta incidência de *Salmonella* spp. no ponto de cultivo analisado, nem sempre associada a altos níveis de coliformes nas águas de cultivo. Essa contaminação

detectada pelo kit REVEAL, foi confirmada pelo uso da PCR. Segundo a legislação brasileira vigente (ANVISA, 2001), que determina a ausência de *Salmonella* spp. em produtos de pescas, nenhuma das amostras estavam aptas para o consumo.

Os resultados falso-negativos encontrados podem ser explicados pelo fato de que, o complexo de interação antígeno-anticorpo utilizado neste kit microbiológico pode sofrer interações inespecíficas, que resultam em resultados falsos positivos ou negativos (PEPLOW et al., 1998; ALCO CER, OLIVEIRA, 2003), como os observados nas amostras de ostras, nos quais a PCR indicou resultado positivo, contrastando com os resultados obtidos pela utilização do kit. Uma possível explicação para este tipo de evento pode ser a presença, nas amostras de ostras, de interferentes do próprio molusco, como os lipídios, que podem inibir a interação antígeno-anticorpo (SEO et al., 2002). Desta forma, a análise molecular evidenciou uma possível inibição desta ligação. É possível inferir também, sobre a questão da viabilidade celular. De acordo com Peplow et al. (1998), antígenos de bactérias danificadas que estejam presentes na amostra podem interagir com o anticorpo presente no kit reveal, podendo indicar um resultado falso-positivo. Desta forma, o PCR representaria resultados falso-positivos também, já que esta técnica detecta ácidos nucléicos e não indica viabilidade celular. No entanto, todas as amostras, como citado anteriormente, foram isoladas em meio agar XLD, e a reação de PCR foi realizada a partir do crescimento em caldo BHI das colônias isoladas no meio sólido, demonstrando a presença de bactérias viáveis nas amostras.

## 6. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento deste trabalho, foi possível concluir que:

- A Reação em Cadeia da Polimerase foi eficiente na detecção de *Salmonella* spp. nos controles positivos, bem como no tecido digestivo de ostras;
- Foi possível a padronização de um protocolo ideal de processamento das amostras de ostras e de isolamento e purificação do material genético bacteriano, o que resultou em uma sensibilidade de detecção por PCR de 10 UFC/g de ostra;
- O fragmento de 387 pb marcado com digoxigenina por PCR mostrou-se sensível para a detecção de *Salmonella* spp. através da técnica de Hibridização Molecular;
- A Hibridização Molecular mostrou-se eficiente como teste confirmatório do PCR para detecção de *Salmonella* spp. em tecido digestivo de ostras, aumentando o limite de detecção bacteriana para 0,1 UFC/g de ostra;
- A presença de *Salmonella* spp. nos moluscos e a análise para coliformes da água de um ponto de cultivo de Florianópolis evidencia a necessidade de um monitoramento microbiológico da qualidade das áreas de cultivo de moluscos em Santa Catarina.
- O sistema de depuração projetado pela BWA foi eficiente para a purificação de ostras artificialmente contaminadas por *S. Typhimurium*. Em todos os ensaios de depuração, as primeiras 12h apresentaram uma alta taxa de eliminação de bactérias; ocorrendo uma eliminação diferencial de acordo com o andar;
- Os ensaios de depuração com água tratada por UV e Cloro, separadamente, mostraram uma crescente eliminação de bactérias viáveis durante os períodos de depuração, com 90% da contaminação eliminada em 24h.
- A associação destes tratamentos mostrou a total eliminação das bactérias em 12h, possibilitando uma depuração efetiva e será a alternativa proposta para utilização pelos maricultores;
- A quantificação de bactérias em ostras submetidas à depuração mostrou-se imprescindível para avaliar a viabilidade da contaminação.
- A técnica de PCR apresentou uma variável detecção do genoma bacteriano em todos os métodos para esterilização da água, demonstrando que a detecção molecular, nesse caso, não é uma boa metodologia, não sendo indicadora de viabilidade bacteriana.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Considerando o crescente aumento da poluição das águas costeiras, o cultivo e comércio de moluscos necessitam ser monitorados. Com os resultados encontrados no monitoramento mensal de um ponto de cultivo na cidade de Florianópolis, fica evidenciada a necessidade urgente de um controle sanitário mais rigoroso sobre os moluscos produzidos no Estado.

A malacocultura catarinense está crescendo aceleradamente e, portanto, 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. Em breve a produção do Estado de Santa Catarina necessitará ultrapassar as fronteiras nacionais, devido ao grande aumento nos últimos anos.

Para que a exportação de moluscos bivalves possa competir por um espaço no mercado internacional, é necessário que esta esteja de acordo com a legislação dos países concorrentes. Os principais mercados de moluscos bivalves são a União Européia e os Estados Unidos, e nestes mercados, a aplicação da depuração de moluscos garante um produto final com alto valor comercial e com garantia de boas condições sanitárias.

Estudos brasileiros sobre depuração de moluscos são raros, mas tornam-se necessários, considerando a necessidade de maior conhecimento nesta área com a finalidade de produzir conhecimento nacional para essa prática e evitar a importação de tecnologias estrangeiras. Nesta perspectiva, novos ensaios nesta depuradora serão ainda realizados para complementar os resultados obtidos, com o intuito do reconhecimento do sistema para comercialização.

Desta forma, a dinâmica de depuração de ostras de cultivo precisa ainda ser explorada, não só em relação a patógenos bacterianos, mas também para patógenos virais, para a implementação de depuradoras no Brasil. A validação do sistema projetado pela *Blue Water Aquaculture*, utilizado neste trabalho, junto ao Ministério da Agricultura, poderá ser o primeiro passo para o desenvolvimento de regulamentações que controlem mais apuradamente a qualidade dos moluscos produzidos no país.

## REFERÊNCIAS

- ABDULMAWJOOD, A.; ROTH, S.; BÜLTE, M. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *E. coli* O157 by polymerase chain reaction. **Mol. Cell. Probes**, v. 6, p. 335–339, 2002.
- ALCOCER, I.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Detecção rápida de *Salmonella* Enteritidis em alimentos por ensaio imunoenzimático ELISA. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 23, n. 3, p. 401-408, 2003.
- ANDERSEN, M. R.; OMIECINSKI C, J. Direct extraction of bacterial plasmids from food for polymerase chain reactions amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 4080-4082, 1992.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>, Brasília, DF.
- APHA, AWWA, WPCF – Standard methods for the examination of water and wastewater American public health association. Washington, D.C., USA, 1995, 19th Dec.
- ARNAL, C.; FERRE-AUBINEAU, V.; BESSE, B. et al. Persistence of infectious hepatitis A virus and its genome in artificial seawater. **Zentralbl Hyg Umweltmed**, v. 201, n.3, p. 279-84, Sep, 1998.
- BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL, U.S. Food & Drug Administration. Disponível on line em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Acesso em 15 de Setembro de 2005.
- BANAVANDI, J., SHAHHOSSEINY, M. H.; SHAHBAZZADEH, D. et al. Selective Amplification of prt, tyv and invA Genes by Multiplex PCR for Rapid Detection of *Salmonella typhi*. **Iranian Biomedical Journal**, v. 9, n. 3, p.135-138, July, 2005.
- BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, C. S. Ostras de Qualidade em Santa Catarina. **Ciência Hoje**, n. 29, p. 70-73, 2001.
- BEAN et al, Surveillance of foodborne disease outbreaks- United States, 1988-1992. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 1265-1286, 1997.
- BEJ, A. K.; MAHBUBANI, M. H, Atlas, R. M. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes. **Applied and environmental Microbiology**, v. 57, p.1013-1017, 1991.
- BEJ, A. K. Molecular based methods for the detection of microbial pathogens in the environment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, p. 139-140, 2003.

BENNET, A. R., GREENWOOD, D., TENNANT, C. et al. Rapid and Definitive detection of *Salmonella* in Foods by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 437-441, 1998

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. John G. Holt (org), 9th edition, 787 p., 1994.

BEURET, C., BAUMGARTNER, A.; SCHLUEP, J. Virus contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2292-2297, april, 2003.

BLACKSTONE et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, p. 149-155, 2003.

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 4<sup>th</sup> 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 Commision of UNESCO, 2003.

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

BRASHER, C. W., DE PAOLA, A., JONES, D. D. et al. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. **Current Microbiology**, v. 37, p. 101-107, 1998.

BRASIL, Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde Aprova Regulamento Técnico "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximo e Mínimos de Contaminantes Químicos em Alimentos". Portaria n. 685, de 27 de agosto de 1998.

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.

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

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. **Capítulo 10, Policy and Procedures for Controlled Relaying and Depuration, 2003**. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/english/anima/fispoi/manman/csspp.ccsn/toctdme.shtml>>. Acesso em 09 de novembro de 2005.

CANNON, G.; HEINHORST S; WEISSBACH, A. Quantitative molecular hybridization on nylon membranes. **Anal. Biochem**, v.149, p. 229-237, 1985.

CARETTI, C., LUBELLO, C. Wastewater disinfection with PAA and UV combined treatment: a pilot plant study. **Water Research**, 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.

CHEN, W.; MARTINEZ, G.; MULCHANDANI, A. – Molecular Beacons: A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detecting *Salmonella*. **Analytical Biochemistry** v. 280, p. 166-172, 2000.

CHIU-OU, C; OU, J.T. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2619– 2622, 1996.

COCOLIN, L.; MANZANO M.; CANTONI, C. et al. Use of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis to directly detect and identify *Salmonella typhimurium* in food. **J. Appl. Microbiol**, v. 85, p. 673–677; 1998.

COELHO, C.; HEINERT, A. P.; SIMÕES, C. M.O.; BARARDI, C. R. M. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.66, n. 3, p. 507-511, 2003.

CROCI, L., SUFFREDINI, E., COZZI, L. et al. Effects of Depuration of Molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 460-465, 2002.

DALSGAARD, A. The occurrence of human pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in aquaculture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 127-138, 1998.

DAL CERRO, A. et al. PCR-based procedures in detection and DNA-fingerprint of *Salmonella* from samples of animal origin. **Food Microbiology**, v. 19, p. 567-575, 2002.

DOGSON, R. W., Report on mussel purification. Ministry of Agriculture and Fisheries. Investigations, series II, v. 10, London, 1928. apud RODRICK, G.E., SCHNEIDER, K. R., Molluscan Shellfish Depuration. In: VILLABOA, A., REGUERA, B., ROMALDE, J., REIS, R. (ed). Proceedings of the 4<sup>th</sup> 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.

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, November, 2001.

DORÉ, W.J., LEES, D. N., Behavior of *Escherichia coli* and Male-Specific Bacteriophage in Environmental Contaminated Bivalve Molluscs before and after Depuration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 2830-2834, 1995.

EPAGRI/CEDAP. Situação da Maricultura Catarinense. Comunicação pessoal por e-mail. Florianópolis, 2004.

EUROPEAN COMMUNITIES. Council Directive of 15<sup>th</sup> of July 1991 laying down the health conditions for the production and placing on the market of live bivalve mollusks (91/492/EEC). **Off. J. Eur. Communities**, v. L268, p. 1-14, 1991.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Fisheries Global Information System, Species Fact Sheet. Disponível em: <<http://www.fao.org/figis/servlet/species?fid=3514>>, acesso em 25 de fevereiro de 2006..

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne disease. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

FERRETTI, R.; MANNAZZU, I.; COCOLIN, L. et al. Twelve-Hour Based Method for Detection of *Salmonella* spp. **Food Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 977-978, 2001.

FLUIT, A. C. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, p. 1-11, 2005.

GABUTTI, G.; DE DONNO, A.; BAGORDO, F. et al. Comparative Survival of Faecal and Human Contaminants and Use of *Staphylococcus aureus* as an Effective Indicator of Human Pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 697-700, 2000.

GALAN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.4338-4349, 1992.

GUIMARÃES, A.G. ; LEITE, C.C. ; TEIXEIRA, L. D. S. et al. Detecção de *Salmonella* spp. em alimentos e manipuladores envolvidos em um surto de Infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, p. 1-4, 2001

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A.K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm. Wiss. Technol**, v. 37, p. 453-460, 2004.

HAESEBRUCK, Recent changes in *Salmonella* nomenclature: The need for clarification. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 275-277, 2005.

HARRISON, S. Export of pasteurized mussels to the U.S. Business Chile, 10 de Junho de 2005. Disponível em <http://www.businesschile.cl/portada.php?w=old&id=152&lan=en>.



HARWOOD, V. J.; GANDHI, J. P; WRIGHT, A.C.; Methods for isolation and conformation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, p. 301-316, 2004.

HERRINGTON, T. L., Use of Ultraviolet light in Depuration. In OTWELL, W. S., RODRICK, G.E. & MARTIN, R.E. (ed.). **Molluscan Shellfish Depuration**. Florida, USA: CRC Press Inc. p. 129-136. 1991.

HILL, W. E.; KEASLER, S.P.; TRUCKNESS, M.W. et al. Polymerase Chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificialy contaminated oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 707-711, 1991.

IIDA, K. et al. Rapid and sensitive method for detection of *Salmonella* strains using a combination of polymerase chain reaction and reverse dot-blot hybridization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 114, p. 167-172, 1993.

JITRAPACKDEE, S.; TASSANAKAJON, A.; BOONSAENG, V. et al. A simple, rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food by polymerase chain reaction. **Molecular and celular Probes**, v. 9, p. 375-382, 1995.

JONES D.D; BEJ, A K, Detection of *Salmonella* spp. in oysters using Polymerase chain reaction (PCR) and gene probes. **Journal of food sciences**, v. 58, p. 1191-1197, 1993.

JOFRÉ, A., MARTIN, B., GARRIGA, M. et al. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. **Food Microbiology**, v. 22,p. 109 -115, 2005.

KEER, J.T; BIRCH, L. Molecular Methods for the assessment of bacterial viability. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, p. 175-183, 2003.

KINGSLEY, D. H.; MEADE, G. H.; RICHARDS, G.P. Detection of both hepatitis Avirus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food borne illness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8; p. 3914-3918, sept, 2002

KLERKS, M.M., ZIJSTRA, C.; VAN BRUGGEN, A. H. C. Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, and introduction of a general internal amplification control. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, p. 337-349,2004.

KOCH, W.H.; PAYNE, W.L.; WENTZ, B. A. et al. Rapid Polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 556-560, 1991.

KUMAR et al. Detection of *Salmonella* spp.. in Tropical seafood by polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 91-95,2003.

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

LCMM – Projeto BMLP-LCMM. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. Disponível em: <<http://www.lcmm.ufsc.br>> Acesso em 12 de julho de 2004.

LEE, J.R.; YOUNGER, A.D.,. Determination of the relationship between faecal indicator concentration and the presence of human pathogenic micro-organisms in shellfish. In. *Molluscan Shellfish Safety*(Villalba, A. Reguera, B., Lopez-Romalde, J. L.; Beiras, R. eds) pp. 247-252. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, 2003.

LEES, D. Viruses and Bivalve Shellfish. **Int. J.Food Microbiology**, v. 59, n.1-2, p. 81-116, 2000.

LEE C, Y; PAN, S. F; CHEN, C.H; Sequenced Cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1311-1317,1995.

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. **Journal of Microbiological Methods**. v.53, p.199-209, 2003.

LEE, J.R.; YOUNGER, A.D. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 50, p.177-183, 2002.

LI, X., BOUDJELLAB, N., ZHAO, X. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 167-177, 2000.

LIANG et al. Evaluation of mollusk as biomonitors to investigate heavy metal contamination along the Chinese Bohai Sea. **Science of Total Environment**, v. 324, p. 105-113, 2004.

LIEBANA, E. Molecular tools for epidemiological investigation of *S. enterica* subspecies *enterica* infections. **Research in Veterinary Science**, v. 72, p. 169-172, 2002.

LOPEZ-CABALLERO , M. E.; PEREZ-MATEOS, A.; BORDERIAS, A.J.; Oysters Preservation by high pressure treatment. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 196-201, 2000.

LUBELLO, C.; CARETTI, C.; GORI, R. Comparison between PAA/UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV disinfection for wastewater reuse. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 2, n. 1, p. 205–212, 2002.

MARINO, A., LOMBARDO, L., FIORENTINO, C. et al. Uptake of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* non-O1 and *Enterococcus durans* by, and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 281-286, 2005.

MANUAIS DE MARICULTURA BMLP. Cultivo de Ostras, Série Maricultura, 2003

MALKAVI, H.; GHARAIBEH, R. Multiplex PCR for the direct detection of *Salmonella enterica* from chicken, lamb and beef food products. **Basic Microbiol**, v. 43, n. 4, p. 328-336, 2003.

MALORNY, B., HOORFAR, J., HUGAS, M. et al. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. **Int. J. Food Microbiol**, v. 89, n.2-3, p. 241-249, 2004.

MEINKOTH J; WAHL, G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. **Anal. Biochem**, v.138, p.267-284, 1984.

MEYER, R.; LUTHY, J.; CANDRIAN, U. Direct detection by PCR of *Escherichia coli* in water and soft cheese and identification of enterotoxigenic strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.13, p.268-271, 1991.

MONARCA, 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 Research**, v. 34, n. 17, p. 4261-4269, 2000.

MORINIGO, M. A. et al. Relationships between *Salmonella* spp. and indicators microorganisms in polluted natural waters. **Water Research**, v. 24, n. 1, p. 117-120, 1990.

MULLIS, K. B; FALOONA, F. A; SCHARF, S. J. et al. Specific enzymatic chain reaction. Cold Spring Harbor Sym. **Quant. Biol.**, v. 51, p. 1564-1568, 1986.

MUNIAIN-MUJICA, I. et al. Depuration dynamics of viruses in shellfish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 125-133, 2002.

MURCHIE, L. W., CRUZ-ROMERO, M., KERRY, P. J. et al. High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 257-270, 2005.

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

NEILL, M. Microbiological indices for total coliform and *E. coli* bacteria in estuarine waters. **Mar. Poll. Bull.**, v. 49, p.752-760, 2004.

NEOGEN. Disponível em:

<[http://www.neogem.com/pdf/FS\\_CatalogPages/REvealSalmonella.pdf](http://www.neogem.com/pdf/FS_CatalogPages/REvealSalmonella.pdf)>. Acesso em 16/02/2004

NORDSTROM, J. L., DE PAOLA, A. Improved recovery of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from oyster using colony hybridization following enrichment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 273-277, 2003.

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.

OLIVEIRA NETO, F.M. **Diagnóstico do cultivo de moluscos em Santa Catarina**, 1. ed. Florianópolis: Epagri, 2005. 67p.

OPPENHEIMER, J.A.; JACANGELO, J.G.; LAYNE, J.-M.; HOAGLAND, J.E. Testing the equivalency of ultraviolet light and chlorine for disinfection of wastewater to reclamation standards. **Water Environment Research**, v. 69, n. 1, p.14–24, 1997.

PEPLOW, M.O., CORREA-PRISSANT, M., STEBBINS, M.E. et al. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values of Three *Salmonella* Rapid Detection Kits Using Fresh and Frozen Poultry Environmental Samples Versus Those of Standard Plating. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 1055-1060, 1999.

PATEL, J. C.; ROSSANESE, O.W.; GALAN, J. E. The functional interface between *Salmonella* and its host cell: opportunities for therapeutic intervention. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v.26, n. 1, nov., 2005.

POMMEPUY, M., CAPRAIS, M., LE SAUX, J. et al. Evaluation of Viral Shellfish Depuration in a semi-professional size tank. In: VILLABOA, A., REGUERA, B., ROMALDE, J., REIS, R. (ed). Proceedings of the 4<sup>th</sup> 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.

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

POWER, U.F., COLLINS, J.K., Tissue Distribution of a Coliphage and *Escherichia coli*, in Mussel after Contamination and Depuration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 803-807, 1990.

RABSCH, W., TSCHAPE, H., BAUMLER, A. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problem. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 237-247, 2001.

REYNOLDS, K.S., GERBA, C.P. PEPPER, I.L. Rapid PCR-based monitoring of infectious enteroviruses in drinking water. **Wat. Sci. Tech**, v. 35, p. 423-427, 1997.

RICHARDS, G. P.; The Evolution of molluscan shellfish safety. 2003 In. Molluscan Shellfish Safety(Villalba, A. Reguera, B., Lopez-Romalde, J. L.; Beiras, R. eds) pp. 221--322. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commision of UNESCO, Santiago de Compostela, 2003.

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

RICHARDS, G. P. Shellfish Depuration. In: **Microbiology of Marine Food Products**. New York, 1991. p. 395-428.

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

RIGOTTO, C. **Proposta da Utilização de Adenovírus como Indicadores de Contaminação Viral Humana em Ostras de Cultivo**. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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 Research**, v.39, n. 2-3, p. 297-304, 2005.

RODRICK, G.E., SCHNEIDER, K. R., Molluscan Shellfish Depuration. In: VILLABOA, A., REGUERA, B., ROMALDE, J., REIS, R. (ed). Proceedings of the 4<sup>th</sup> 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 Commision of UNESCO, 2003.

ROSSEN, L. et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, p. 37-45, 1992.

ROWSE, A. J.; FLEET, G. H., Effects of Water Temperature and Salinity on elimination of *Salmonella charity* and *Escherichia coli* from Sidney Rock Oysters (*Crassostrea commercialis*). **Applied Environmental Microbiology**. v. 48, p. 1061-1063, 1984.

RYCHLIK, I., VAN KESTEREN, L., CARDOVÁ, L. et al. Rapid Detection of *Salmonella* in field samples by nested polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p. 259-272, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SEO, K.H.; HOLT, P.S.; STONE, H.D. et al. Simple and rapid methods for detecting *Salmonella enteritidis* in raw eggs. **Inter. J. of Food Microbiol**, v. 87, p.139-144, 2002.

SHEU, P.M., BERGHOF, K., STAHL, U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organism in food with the polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v. 15, p. 13-31, 1998.

SINCERO, T.C.M. **Aplicação de técnicas moleculares no monitoramento do vírus da Hepatite A em tecido digestivo dissecado de ostras de cultivo**. 2005.104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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 Research**, v.40,n.5, p.895-902,2006.

SNEDECOR, G. W., COCHRAN, W.C., Statistical Methods. Ames, University Press, Eight Edition, 504p.,1989.

SOMET, C., EMEL, G., SALVAT, G. et al. Detection of *Salmonella* spp. in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 113-116,1997.

SOUZA, J. F. Custo de Produção da Ostra Cultivada. Cadernos de Indicadores Agrícolas Florianópolis, Instituto Cepa/SC, 2003. 23 p.

STEINERT, S.A.; STREIB-MONTEE, R.; LEATHER, J.M. et al. DNA damage in mussel at sites in San Diego Bay. **Mutation Research**, v. 399, p. 65-85, 1998.

SUPLICY, F. M. **Ensaio sobre a depuração do mexilhão *Perna perna* (L.,1758)**. 1998. 81 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TIZARD, I. Salmonellosis in Wild Birds, Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, v. 13, n. 2, p. 50-66, April, 2004.

3M Placa para Contagem de *Escherichia coli* e Coliformes. Manual de Instruções. St.Paul: Microbiology Products.2001.

TSEN, H. Y.; LIOU, J. W.; LIN, C. K. Possible use of a polymerase chain reaction method for specific detection of *Salmonella* in beef. **J. Ferment.Bioeng.**, v.77, p.137-143, 1994.

TORTORA, G.J.; FUNK, B.R.; CASE, C.L. et al. Bactérias In: Microbiologia, Porto Alegre: artes Médicas Sul, p. 295-319, 2000.

TOSO, J. **Avaliação da contaminação por *salmonella* spp. em ostras (*crassostrea gigas*) e em fezes de gaiivotas (*larus dominicanus*) por técnicas microbiológicas e moleculares.** Florianópolis: UFSC, 2004. 33p.

UPADHYAYA, G. S; CURRY, R. D.; NICHOLS, L. et al. The Design and Comparison of Continuous and Pulsed Ultraviolet Reactors for Microbial Inactivation in Water. **Transactions on Plasma Science**, v. 32, n. 5, October, 2004.

VANTARAKIS, A., KOMNINO, G., VANIERI, D. et al. Development of a multiplex PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in mussels. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 105-109, 2000.

VAZQUEZ-NOVELLE, M. D; CARPINTEIRO, P.; GARCIA-LAVANDEIRA, M. et al. A Polymerase Chain Reaction procedure for the rapid detection of *Salmonella* spp.. in raw molluscs. In. Molluscan Shellfish Safety(Villalba, A. Reguera, B., Lopez-Romalde, J. L.; Beiras, R. eds) pp. 313-322. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, 2003

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F.. Compendium of methods for the microbiological examination of food. Washington D.C. American Public Health Association (APHA),1992.

VAN DOORN, L. J; VERSCHUUREN-VAN HAPEREN, A.; VAN BELKUN, A. et al. Rapid Identification of diverse *Campylobacter lari* starins isolated from mussels and oysters using a reverse hybridization line probe assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 545-550, 1998.

VAZQUEZ-NOVELLE, M. D., PAZOS, A.J., ABAD, M. et al. Eight-hour PCR-based procedure for the detection of *Salmonella* in raw oysters. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 279-283, 2005.

VESCHETTI, E.; CUTILLI, D.; BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; MARTINI, C.; CECCHINI, G.; ANASTASI, P.; OTTAVIANI, M. Pilot-plant comparative study of peracetic acid and sodium hypochlorite wastewater disinfection. **Water Research**, v. 37, p.78-94, 2003.

VICTORIN, K. Review of the genotoxicity of ozone. **Mutation Research**, v.277, p. 221-238, 1999.

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.

WAY J. S; JOSEPHSON, K. L; PILLAI, S. D. et al.; Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p.1473-1479, 1993.

YAM, W. C, CHAN, C. Y; HO BELLA, S. W.; TAM, T.Y; KUEH, C.; LEE, T. Abundance of Clinical Enteric Bacterial Pathogen in Coastal Waters and Shellfish. **Water Research**, v. 34, p. 51-56, 1999.

YEN, I. C. et al. Paralytic shellfish poisoning toxin profiles in green mussels from Trinidad and Venezuela. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 1, p. 88-94, 2005.

YOUNGER, A. D., LEE, R.J.; LEES, D.N. Microbiological Monitoring of bivalve shellfish harvesting areas in England and Wales – rationale and approach. In: Villalba, A. Reguera, B., Lopez-Romalde, J. L.; Beiras, R. (eds) *Molluscan Shellfish Safety*. Santiago de Compostela: Conselleria de Pesca da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 2003.