



Chelen Soares dos Santos

**Padronização de métodos moleculares
e de cultura celular para detecção
de rotavírus em ostras
experimentalmente inoculadas**

**Florianópolis
2000**

Chelen Soares dos Santos

**Padronização de métodos moleculares e
de cultura celular para a detecção de
rotavírus em ostras
experimentalmente inoculadas**

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

Orientação: Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi

Co-orientação: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

**Florianópolis
2000**

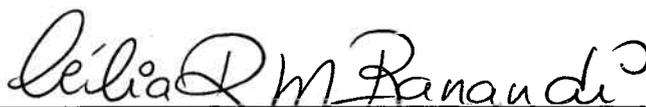
**"PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS MOLECULARES E DE
CULTURA CELULAR PARA DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS
EM OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS"**

POR

CHELEN SOARES DOS SANTOS

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

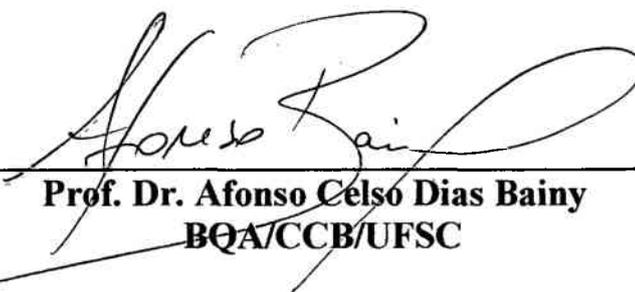
Comissão Examinadora:



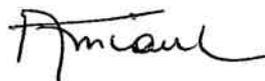
Prof. Dra. Célia Regina Monte Barardi
Orientadora - MIP/CCA/UFSC



Prof. Dra. Dolores Úrsula Menhert
ICB/USP



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



Prof. Dra. Ana Maria Viana - BOT/CCB/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, março de 2000

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

Seu financiamento provém do BMLP (Programa Brasileiro de Apoio a Maricultura) através do programa CIDA (Canadian International Cooperation Agency).

Recebeu também apoio do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia através de concessão de Bolsa de Mestrado (CAPES).

"Muitos homens procuram a felicidade acima do homem, outros mais abaixo. Mas a felicidade é exatamente do tamanho do homem". É certo. Existem, portanto, tantas felicidades quantos tamanhos há de homem. Tal é, meu caro aluno e professor, a minha felicidade de hoje: eu a meço e torno a medir, inquieto, para saber qual é agora o meu tamanho. Porque, você sabe melhor que eu, o tamanho do homem nunca é o mesmo.

Nikos Kazantzakis em Zorba, o grego

AGRADECIMENTOS

À Profa. Célia Regina Monte Barardi, orientadora deste trabalho, pelos ensinamentos, experiências e paciência a mim dispensados. O convívio amigo e fraterno com a mesma, tornou a realização deste trabalho mais alegre, estimulante e humanizado.

À Profa. Cláudia Maria Oliveira Simões, co-orientadora deste trabalho, pela amizade e valiosas sugestões.

À minha família, pai, mãe, Taco e irmãos, que desde o início vem acompanhando meu desenvolvimento profissional, pela formação inicial recebida, tão importante no meu crescimento pessoal e pelo constante apoio às minhas decisões.

Ao Zeca, companheiro inseparável em todas as situações, simplesmente pela sua presença ao meu lado.

A todas as meninas do laboratório, e ao Alexandre, pelo agradável convívio e troca de experiências pessoais. Especialmente à Janine e Ryane, pelas valiosas discussões científicas ou filosóficas e pela amizade sincera e profunda.

À Carol, em especial pela amizade e grande colaboração prática para a realização deste trabalho.

A todos os amigos, de maneira geral, pelas palavras de ânimo e estímulo.

Aos Profs. Mário Steindel e Edmundo Carlos Grisard, exemplos de dedicação à ciência, pela amizade, constante paciência, bom humor e valiosas contribuições científicas para este trabalho.

À Profa. Sonia Gonçalves, pelas contribuições fornecidas a este trabalho.

Aos produtores de ostras de Florianópolis, principalmente ao Fábio e à Flávia, pelas várias ostras doadas para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Maurício Sedrez dos Reis, didata exemplar, pelos ensinamentos estatísticos aplicados neste trabalho.

Ao João Santana, secretário do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, por todo auxílio e disposição na resolução de questões burocráticas referentes ao curso.

A todos que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 SOBRE OS MOLUSCOS BIVALVES.....	2
1.1.1 <i>Taxonomia e introdução da espécie Crassostrea gigas</i>	2
1.1.2 <i>Produção</i>	4
1.1.3 <i>Aspectos nutricionais</i>	9
1.1.4 <i>Indicadores do estresse ambiental</i>	12
1.1.5 <i>Capacidade de bioconcentrar patógenos</i>	13
1.2 SOBRE OS VÍRUS ENTÉRICOS.....	15
1.2.1 <i>Características gerais</i>	15
1.2.2 <i>Vias de transmissão</i>	16
1.2.3 <i>Sobrevivência viral</i>	20
1.3 QUALIDADE SANITÁRIA DOS MOLUSCOS BIVALVES E ÁGUAS DE CULTIVO.....	23
1.4 SOBRE OS ROTAVÍRUS	26
1.4.1 <i>Deteção de rotavírus em moluscos bivalves</i>	32
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 GERAL.....	35
2.2 ESPECÍFICOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 CULTIVO DE CÉLULAS MA104.....	37
3.2 PRODUÇÃO DE FLUIDO INFECCIOSO DO ROTAVÍRUS (ESTOQUE VIRAL).....	39
3.3 PRODUÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL M60.....	42
3.4 TITULAÇÃO DO FLUIDO INFECCIOSO DO ROTAVÍRUS SÍMIO SA11.....	42
3.5 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL A PARTIR DO FLUIDO INFECCIOSO DO ROTAVÍRUS.....	42
3.6 QUANTIFICAÇÃO DO RNA VIRAL.....	44
3.7 ENSAIOS DE RT-PCR E SEMI-NESTED PCR PARA DETECÇÃO DO RNA DE ROTAVÍRUS EXTRAÍDO A PARTIR DO FLUIDO INFECCIOSO.....	46
3.7.1 <i>Definição das concentrações ideais de MgCl₂ e de iniciadores para as reações de PCR</i>	47
3.7.2 <i>Protocolos de amplificação para o rotavírus símio SA11</i>	47
3.7.2.1 Protocolo número 1 (PCR tradicional).....	48
3.7.2.2 Protocolo número 2 (PCR SuperMix).....	50
3.8 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	51
3.9 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS TISSULARES DE OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS COM ROTAVÍRUS.....	52

3.9.1	<i>Inoculação experimental das ostras com rotavírus símio SA11</i>	52
3.9.2	<i>Preparação do extrato tissular de ostras</i>	54
3.10	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL A PARTIR DOS EXTRATOS TISSULARES DE OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS COM ROTAVÍRUS	58
3.11	ENSAIOS DE RT-PCR E <i>SEMI-NESTED PCR</i> PARA DETECÇÃO DO RNA DE ROTAVÍRUS EXTRAÍDO DOS EXTRATOS TISSULARES DE OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS.....	59
3.11.1	<i>Definição da concentração ideal de MgCl₂</i>	59
3.11.2	<i>Protocolos de amplificação</i>	59
3.12	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DO EXTRATO TISSULAR DE OSTRAS SADIAS NÃO INOCULADAS COM O ROTAVÍRUS (EXTRATO NEGATIVO)	60
3.13	ENSAIO DE CITOPATOGENICIDADE DOS EXTRATOS TISSULARES DE OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS COM ROTAVÍRUS SÍMIO SA11	62
3.13.1	<i>Análise estatística para os valores obtidos no ensaio de citopatogenicidade dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus símio SA11</i>	64
3.14	ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO VIRAL A PARTIR DOS EXTRATOS TISSULARES DE OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS COM ROTAVÍRUS SÍMIO SA11, POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	64
4.	RESULTADOS	66
4.1	TÍTULO INFECCIOSO DO ROTAVÍRUS SÍMIO SA11	67
4.2	QUANTIFICAÇÃO DO RNA VIRAL.....	67
4.3	REAÇÕES DE RT-PCR.....	67
4.3.1	<i>Reações de RT-PCR para o RNA viral obtido do fluido infeccioso</i>	67
4.3.1.1	<i>Comparação entre os procedimentos de extração do RNA viral</i>	67
4.3.1.2	<i>Padronização das concentrações ideais de MgCl₂ e de iniciadores</i>	71
4.3.1.3	<i>Limite de detecção do RNA viral</i>	71
4.3.2	<i>Reações de RT-PCR para o RNA viral extraído a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11</i>	76
4.3.2.1	<i>Comparação entre os procedimentos de extração do RNA viral</i>	76
4.3.2.2	<i>Padronização da concentração ideal de MgCl₂</i>	78
4.3.2.3	<i>Limite de detecção do RNA viral</i>	80
4.5	CITOTOXICIDADE DO EXTRATO TISSULAR DE OSTRAS NÃO INOCULADAS COM ROTAVÍRUS....	86
4.6	ENSAIO DE RECUPERAÇÃO VIRAL A PARTIR DOS EXTRATOS TISSULARES DE OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS COM ROTAVÍRUS SÍMIO SA11, ATRAVÉS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	89
4.7	RECUPERAÇÃO VIRAL A PARTIR DO ENSAIO DE CITOPATOGENICIDADE DOS EXTRATOS TISSULARES DE OSTRAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS COM ROTAVÍRUS (A.2 E B.2)	92
5.	DISCUSSÃO.....	96
5.1	ENSAIOS ENVOLVENDO CULTURA DE CÉLULAS MA104	98
5.2	ENSAIOS ENVOLVENDO O RNA VIRAL.....	103
6.	CONCLUSÕES.....	112
6.1	ENSAIOS ENVOLVENDO CULTURA CELULAR.....	113
6.2	ENSAIOS ENVOLVENDO O RNA VIRAL.....	114
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

8. ANEXOS.....133

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem
μg - micrograma
μl - microlitro
μm - micrômetro
μM - micromolar
ANOVA - análise da variância
APS - persulfato de amônio
BMLP - Brazilian Mariculture Linkage Program
CIDA - Canadian International Cooperation Agency]
cm - centímetros
cm² - centímetros quadrados
CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio
CV - controle viral
D.O. - densidade óptica
DABCO - trietilenodiamina
Dnase - deoxiribonuclease
dNTPs - deoxinucleotídeos trifosfatados
 dATP - 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
 dCTP - 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
 dGTP - 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
 dTTP - 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
DTT - ditioneitol
DZ - dúzias
ECP - efeito citopático
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
FAO - Food and Agriculture Organization
FATMA - Fundação de Amparo à Tecnologia e Meio Ambiente
ffu - focus forming unit (unidades formadoras de focos de fluorescência)
fg - fentograma
FITC - isotiocianato de fluoresceína
FREON - triclorotrifluoroetano
g - força da gravidade
g - grama
h - hora
HAV - vírus da hepatite A
IFA - imunofluorescência indireta
Kcal - quilocalorias
Kda - quilodaltons
Kg - quilograma
Km - quilômetros
l - litro
LCMM - Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos
LVA - Laboratório de Virologia Aplicada
Mab - monoclonal antibody

m – metros
M - molar
MEM – Meio Mínimo Essencial
mg – miligrama
min – minuto
ml – mililitro
mM – milimolar
M-MLV – Moloney Murine Leukemia Virus
ng - nanograma
nm - nanômetro
°C – graus celcius
p/v – relação peso/volume
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
pb - pares de bases
PBS – solução salina tamponada com fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
PEG – polietileno glicol
pH – potencial hidrogeniônico
pmoles - picomoles
RNA - ácido ribonucléico
RNase - ribonuclease
RT - transcrição reversa
SC – Santa Catarina
SDS – dodecil sulfato de sódio
seg – segundo
SFB – soro fetal bovino
Taq - *Thermus aquaticus*
TBE - tampão tris-borato/EDTA
Temed - N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamino
TM - toneladas métricas
TPB – tampão base triptose-fosfato
Tris – Tris(hydroximetil)aminometano
Tween - polioxietileno sorbitan monolaurato
U - unidade
V - volts
v/v - relação volume/volume
X – vezes

RESUMO

Os métodos atuais que asseguram a qualidade sanitária dos alimentos, em geral, e mais especificamente dos alimentos de origem marinha e da água do mar, são baseados somente no monitoramento dos níveis de coliformes fecais. Esta afirmação também é válida com relação às águas do mar utilizadas para recreação e também para a água doce tratada para consumo da população. Existem obviamente sérias críticas sobre a utilização deste parâmetro único, baseadas no fato de que, amostras de água e de alimentos de origem marinha contendo níveis aceitáveis de coliformes fecais, podem estar contaminadas por vírus e parasitas, já que a remoção de bactérias por depuração nem sempre remove os demais patógenos contaminantes. Os rotavírus são responsáveis por gastroenterites severas em seres humanos e animais. Os casos mais graves são sempre detectados em crianças mas os rotavírus também podem causar gastroenterites em adultos tanto através do contato com crianças infectadas ou através da ingestão de água ou alimentos contaminados. O número de partículas virais encontradas em 1g de fezes infectadas pode ser superior a 1 milhão, sendo que uma grande porcentagem destes vírus está associada com sólidos nos efluentes das redes de esgotos podendo ser transportados para áreas utilizadas para fins recreacionais e para cultivo de alimentos de origem marinha, tais como ostras e mexilhões. A estabilidade dos rotavírus nas águas, associada à sua resistência aos tratamentos físico-químicos facilitam ainda mais sua transmissão e revestem de maior gravidade o problema da contaminação do meio ambiente aquático. No presente trabalho o rotavírus símio SA11 foi utilizado como modelo para a padronização de protocolos de preparação de extratos de ostras com o objetivo de detectar o menor número possível de partículas virais. Foram realizados ensaios de citopatogenicidade e imunofluorescência envolvendo o cultivo dos vírus recuperados dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas em células MA104. Destes, verificamos que um método simplificado de preparação dos extratos de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus foi o mais sensível, detectando até 488ffu em testes citopatogenicidade. Também foram utilizados dois protocolos distintos de purificação do RNA viral a partir destes extratos bem como dois protocolos de RT-PCR. Em síntese o protocolo tradicional que utiliza fenol/clorofórmio e o kit PCR Supermix desenvolvido pela Gibco/BRL foram os mais eficientes com o limite de detecção chegando a 0,03ffu. Os protocolos padronizados nesta dissertação terão aplicabilidade imediata nos estudos de verificação da contaminação viral em amostras de campo.

SUMMARY

The methods to remove pathogens from shellfish by self-cleansing mechanisms have not consistently removed viruses and, depurated shellfish have been source of outbreaks of gastroenteritis and hepatitis. The depuration effectiveness depends upon the number of virus bioaccumulated and whether virus is solid associated. This has led to efforts to develop surrogates for the presence of viral pathogens in shellfish or to develop methods to directly detect these viruses in shellfish. Rotaviruses are considered the major agents of severe infantile diarrhoea and their presence has been described in drinking water, sea water, and shellfish. Shellfish are readily contaminated with viruses present in water containing sewage because of the concentrating effect of filter feeding. The risk of acquiring a shellfish-borne viral disease is substantial since they are often eaten raw. In this work, the SA11 simian strain of rotavirus has been used as a model to standardize protocols for virus isolation and detection from oyster extracts. The main goal was to use cell culture and RT-PCR methods and to improve to maximum the sensitivity of these methods on rotavirus detection. Our results indicate that the better method for preparation of oyster extracts was the simplified one which could detect 488 ffu in cytopathogenicity assays. Concerning the results for RT-PCR, the best protocol, which could detect as little as 0,03 ffu, was the one which uses phenol/chloroform for viral RNA isolation and PCR supermix (Gibco/BRL) for the amplification of the genome.

These protocols, standardized in this work, will be immediately applied on monitoring viral contamination for the shellfish produced in Santa Catarina State.

1. INTRODUÇÃO

1.1 SOBRE OS MOLUSCOS BIVALVES

1.1.1 Taxonomia e introdução da espécie *Crassostrea gigas*

A espécie *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) (Figura 1) conhecida popularmente como ostra do Pacífico ou ostra japonesa pertence ao Filo Mollusca, Classe Bivalvia, Ordem Ostreoida, Família Ostreidae (RUPPERT & BARNES, 1996). Essa é uma espécie nativa do sudeste asiático, incluindo o mar do Japão, China e Coreia (IMAI, 1982; AKABOSHI & SINQUE, 1983), e que tem importância mundial visto ser adaptável ao cultivo planejado (AKABOSHI et al., 1982).

Em 1974, a espécie foi introduzida experimentalmente no Brasil através do Instituto de Pesquisa da Marinha de Cabo Frio - RJ, com sementes importadas da Grã-Bretanha (MUNIZ, SALVADOR, HELM, 1986). A introdução da espécie no Estado de Santa Catarina ocorreu no ano de 1985, quando sementes originárias da região de Cabo Frio foram inseridas no Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), visando motivar o cultivo de ostras pelos pescadores artesanais da região (POLI, 1994).

Atualmente, a espécie *C. gigas* é cultivada no Estado de Santa Catarina, onde tem alcançado um grande desenvolvimento devido às características climáticas, adequadas à espécie e geológicas, pela grande quantidade de baías que favorecem a diminuição nos custos com as estruturas de cultivo e propiciam condições ideais de disponibilidade de nutrientes (NASCIMENTO, 1983).



Figura 1 – Ilustração da ostra *Crassostrea gigas*, cultivada em Florianópolis, SC.

1.1.2 Produção

O crescente aumento da demanda de alimentos evidencia a importância do mar como fonte potencial de alimentos. Dessa maneira, a exploração dos recursos marinhos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, na tentativa de viabilizar a exploração através do cultivo racional de espécies marinhas (FERNANDES, 1993).

O desenvolvimento de sistemas de cultivo de espécies marinhas, tais como os moluscos bivalves, proporciona uma fonte alternativa de alimento para a população e uma forma de subsistência para os pescadores artesanais. A descoberta da necessidade de uma atividade complementar para as comunidades pesqueiras de Florianópolis (Ilha de Santa Catarina) é salientada por FANTIN & SILVA (1990), tendo em vista o declínio substancial da pesca na região (TEIXEIRA & TEIXEIRA, 1986; MEDEIROS, POLETTE, VIZINHO, 1996).

A importância da produção destes moluscos pode ser ainda justificada por proporcionarem uma dieta alimentar bastante nutritiva, rica em proteínas, sais minerais e vitaminas (MAGALHÃES, 1985; DORE, 1991) (Tabela 1).

Tabela 1 – Informações nutricionais de alguns moluscos bivalves não cozidos/100g.

Nutriente	Marisco	Ostra do Leste	Ostra do Pacífico
Energia (Kcal)	74	69	81
Proteínas (g)	12,7	7,0	9,5
Lipídeos totais (g)	0,97	2,47	2,3
Carboidratos totais (g)	2,57	3,91	4,95
Cálcio (mg)	46	45	8
Ferro (mg)	13,98	6,7	5,1
Magnésio (mg)	9	54	22
Fósforo(mg)	169	139	162
Potássio (mg)	314	229	168
Sódio (mg)	56	112	106
Zinco (mg)	1,37	90,95	16,62
Tiamina (mg)	-	-	0,067
Ribofavina (mg)	0,213	0,166	0,233
Niacina (mg)	1,76	1,31	2,01
Ácidos graxos totais:			
Saturados (g)	0,094	0,63	0,51
Monoinsaturados (g)	0,08	0,25	0,36
Polinsaturados(g)	0,28	0,74	0,89
Colesterol (mg)	34	55	-

Adaptada de DORE (1991)

A produção de moluscos bivalves tem crescido no mundo, e segundo a organização *Food and Agriculture Organization* (FAO), no ano de 1997, o maior produtor de ostras foi a China com 2,3 milhões de toneladas métricas (TM) correspondendo a 71% da produção mundial. A República da Coreia e o Japão também contribuem grandemente para a produção mundial de ostras, sendo que cada um produziu o equivalente a 218.000TM no ano de 1997 (correspondendo a 7% da produção mundial) (FAO, 2000). Nesse mesmo ano, a produção mundial de *C. gigas* foi de 2.968.266 toneladas, sendo que a China liderou a lista dos países produtores.

No Brasil, a produção de *C. gigas* entre 1990 e 1997 cresceu de 28 para 134 toneladas (LCMM, 2000). No litoral de Santa Catarina (SC), no período de 1991 e 1998, a produção da espécie aumentou continuamente, atingindo cerca de 250.000 dúzias (DZ) de ostras no ano de 1998 (Figura 2A). Atualmente, existem treze associações de maricultores no litoral de Santa Catarina num total de 700 produtores de moluscos em geral, sendo que 61 destes são produtores de ostras. Os principais municípios produtores de ostras em Santa Catarina são: Florianópolis, Penha, Governador Celso Ramos, Bombinhas, Palhoça e Porto Belo, sendo que a maioria dos produtores localiza-se em Florianópolis (Figura 2B) (LCMM, 2000).

Atualmente, 95% das ostras produzidas em Santa Catarina permanece no estado, sendo a maioria consumida no litoral. O percentual restante da produção é comercializado, principalmente, nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná (LCMM, 2000).

A expansão da maricultura no Brasil foi impulsionada pelo governo canadense através da *Canadian International Cooperation Agency* (CIDA), que criou no Brasil o Programa Brasileiro ligado à Maricultura (Brazilian Mariculture Linkage Program-BMLP). Nele, participam a UFSC e mais quatro universidades brasileiras (Universidades Federais da Bahia, Maranhão, Rio Grande do Norte e Espírito Santo), que pretendem trilhar os mesmos caminhos de Santa Catarina na expansão desta atividade. As universidades canadenses de Victoria, Malaspina e Memorial University, também participam deste programa. De forma geral, o BMLP visa apoiar a maricultura tropical, respeitando o meio ambiente e a saúde pública através da produção de alimentos de boa qualidade e que possam ser absorvidos

tanto pelo mercado local quanto internacional. O programa ainda objetiva a transferência de tecnologias em maricultura e a aplicação das metodologias desenvolvidas nos laboratórios de pesquisa diretamente nas comunidades de maricultores.

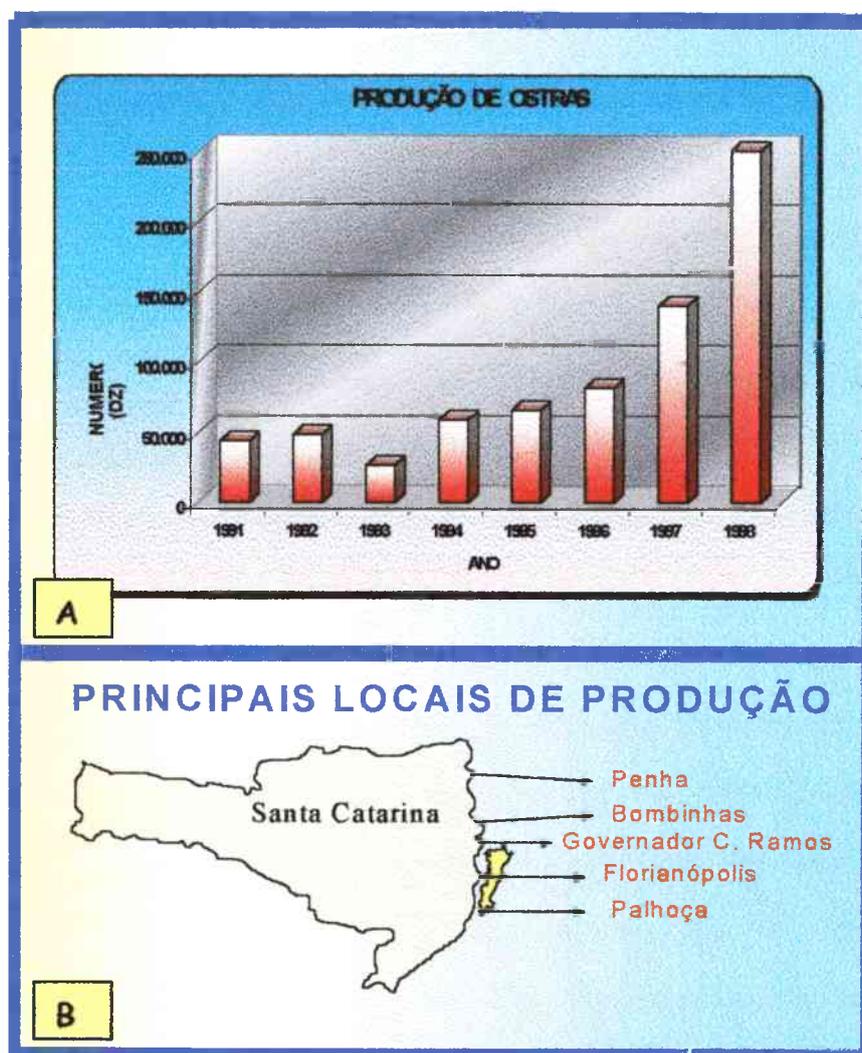


Figura 2 – Evolução da produção de ostras no litoral de Santa Catarina de 1991 a 1998 (A) e os principais locais produtores do Estado de SC (B). Adaptado de LCMM (2000).

1.1.3 Aspectos nutricionais

Do ponto de vista ecológico, a alimentação dos moluscos bivalves refere-se a entrada de energia e matéria nos organismos, sendo que diferentes mecanismos alimentares podem estar envolvidos com os mesmos. A espécie *C. gigas*, como a maioria dos bivalves, alimenta-se através da remoção de matéria particulada microscópica da coluna d'água, bombeando-a através de um filtro estrutural interno capaz de reter as partículas alimentares. Os bivalves filtradores habitam áreas costeiras com abundância de material particulado em suspensão e microrganismos, tais como bactérias, microalgas, zooplâncton. Devido à sua característica sésil, esses animais bombeiam e filtram consideráveis volumes de água do seu habitat, com a finalidade de consumirem quantidade suficiente de fitoplâncton para sua sobrevivência (DAME, 1996).

Algumas fontes de alimentação destes organismos, tais como bactérias, detritos e nanozooplâncton (PRIEUR, 1981; BIRBECK & Mc HENERY, 1982; LANGDON & NEWELL, 1990) estão presentes na água de cultivo, além de compostos dissolvidos na água do mar, tais como aminoácidos livres (WRIGTH, 1982). As bactérias presentes em águas naturais contêm alta taxa carbono/nitrogênio, fornecendo quantidades significantes de nitrogênio para os moluscos que delas se alimentam. O processo de alimentação por filtração é o resultado da ação combinada de três tipos de cílios dos filamentos branquiais. Os cílios laterais são os movimentadores da água, criando uma corrente de água através das brânquias. As partículas alimentares carregadas pela água são interceptadas pelo impacto com a inércia branquial ou pela deposição

gravitacional. Os cirros látero-frontais, formando uma fina malha com capacidade de filtrar as partículas presas às brânquias movem as partículas alimentares sobre os cílios frontais. Os cílios frontais transportam as partículas alimentares presas na superfície branquial, verticalmente aos sulcos alimentares. As partículas alimentares são, então, transportadas aos palpos labiais onde teoricamente ocorre a seleção alimentar. As partículas de tamanho inadequado, materiais não nutritivos ou excesso de alimento são agregados ao muco, sendo eliminados na forma de pseudofeces, as quais deixam a cavidade do manto através da abertura inalante. Dos palpos labiais, as partículas alimentares selecionadas são encaminhadas até a boca que se liga ao estômago através de um curto esôfago (Figura 3) (JØRGENSEN, 1990; MEGLITSCH & SCHRAM, 1991; WARD et al., 1993; LEVINTON, WARD, THOMPSON, 1996; RUPPERT & BARNES, 1996). No entanto, a capacidade dos moluscos bivalves em selecionar partículas alimentares é tema de divergências entre os estudiosos do assunto. Segundo RUPPERT & BARNES (1996) parece não existir tal capacidade em *C. gigas*, visto sua anatomia. Por outro lado, KJØRBOE & MØHLENBERG (1981) demonstraram que a espécie apresenta 5% de eficiência na seleção de partículas durante seu processo alimentar.

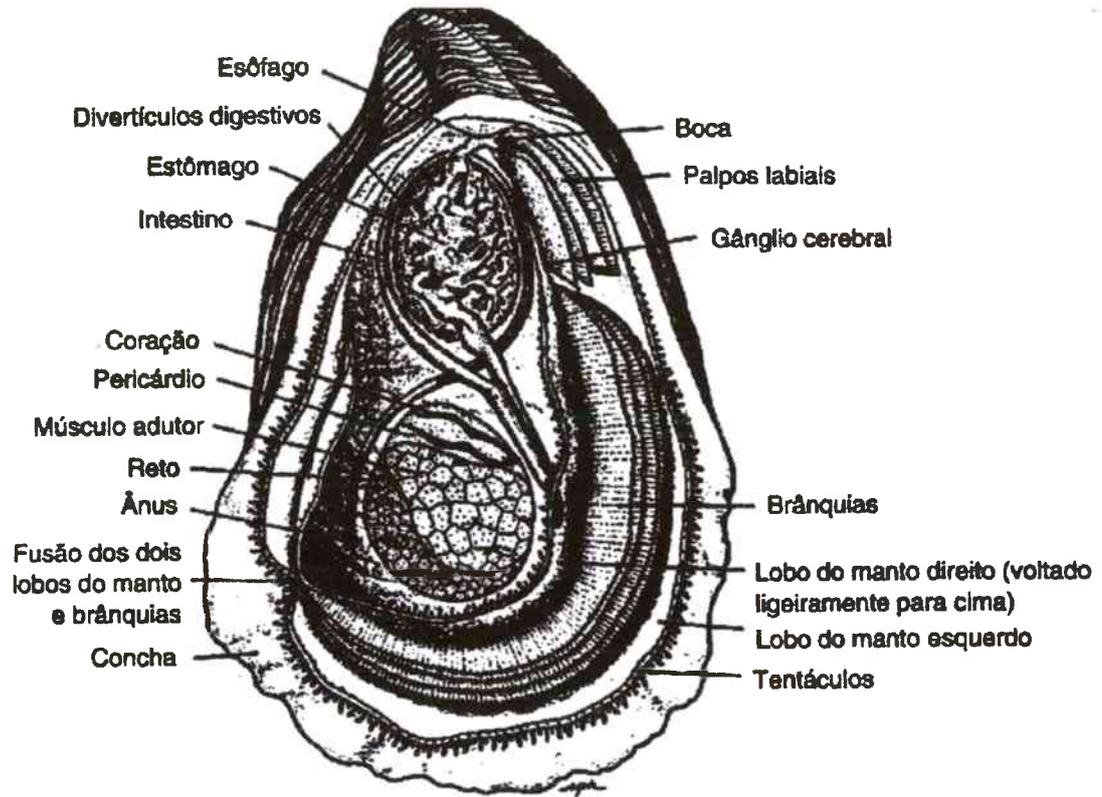


Figura 3 – Anatomia geral de uma ostra, segundo RUPPERT & BARNES (1996) mostrando, entre outras estruturas, as brânquias e as partes envolvidas no processo alimentar.

1.1.4 Indicadores do estresse ambiental

A "saúde" do ecossistema pode ser definida como a capacidade do ambiente estar livre de estresse, ou resiliente ao mesmo, ser estável e sustentável. Como cada ecossistema é único, definir sua "saúde" é um processo dinâmico que requer, além de outros fatores, a seleção de bons indicadores da qualidade ambiental (CONSTANZA, 1992). Com o advento da percepção que poluentes e contaminantes podem afetar a humanidade e o ambiente de maneira geral, esforços têm sido realizados com a finalidade de monitorar a detecção de materiais antropogênicos no ambiente. Aos moluscos bivalves foi atribuída a capacidade de identificar diversos sintomas de um ambiente costeiro ou estuarino em estresse, visto seu hábito alimentar filtrante com conseqüente acumulação de contaminantes em seus tecidos, recebendo desta forma a denominação de "indicadores" ou "monitores" de contaminantes presentes no ambiente (WIDDOWS & DONKIN, 1992; SMAAL & WIDDOWS, 1994). A utilização dos bivalves como indicadores de estresse ambiental tem sido relacionada ao monitoramento de contaminantes químicos em águas naturais, tais como traços de metais (arsênio, zinco, cobre e mercúrio), metais pesados (ferro, chumbo, cobre, cádmio, cromo e manganês), organoclorados, hidrocarbonetos de petróleo e elementos radioativos (GOLDBERG et al., 1983; O'CONNOR, CANTILLO, LAUENSTEIN, 1994; ANDERSEN, MAAGE, JOHANNESSEN, 1996; JULSHAMN & GRAHL-NIELSEN, 1996; KENNISH & RUPPEL, 1996; LEE, KRUSE, WASSERMANN; 1996; BOCQUENÉ, ROIG, FOURNIER, 1997; SZEFER et al., 1997; SHIM et al., 1998; BAUMARD et al., 1999; ST-JEAN et al., 1999).

A presença desses contaminantes em fontes naturais pode indicar a ocorrência de alterações ambientais de origem antropogênica (O'CONNOR et al., 1994).

1.1.5 Capacidade de bioconcentrar patógenos

Em algumas situações, os moluscos bivalves podem ser cultivados em áreas contaminadas por microrganismos entéricos, através de fontes pontuais e não-pontuais. Uma fonte pontual de contaminação entérica é aquela na qual o ambiente recebe águas de forma discreta e em grandes extensões. Como exemplo, pode-se citar os resíduos descarregados em águas naturais a partir de plantas de tratamento de efluentes, plantas de processamento de alimentos ou fábricas de polpas. As fontes não-pontuais estão relacionadas à contaminação entérica oriunda de atividades humanas ou processos naturais, caracterizando-se pela dispersão ou difusão no ambiente. Ambas as fontes de contaminação podem lançar no ambiente contaminantes químicos e/ou microbiológicos de interesse para a saúde pública (CANADIAN SHELLFISH SANITATION PROGRAM, 1992; GARREIS, 1994).

O rápido crescimento de centros urbanos transforma a descarga de efluentes domésticos (esgotos sanitários) nas águas costeiras uma prática comum, visto os custos mínimos exigidos para tal atividade (COOPER, 1995). Atualmente, é possível monitorar o impacto da descarga dos efluentes em zonas costeiras ou a extensão e o tipo da contaminação em áreas de cultivo de moluscos com facilidade, através do Sistema de Informação Geográfica (SIG), o

qual gera rapidamente informações, utilizando modelos estatísticos e computacionais (LEE & GLOVER, 1998).

O efluente doméstico é uma combinação de excreções humanas e animais (fezes e urina) e de águas resultantes de lavagens, banheiros e preparo de alimentos. As excreções de indivíduos infectados com agentes entéricos, independente da presença de sintomas clínicos, podem conter diversos microrganismos patogênicos, tais como bactérias, vírus e parasitas (BITTON, 1994), que posteriormente serão liberados nos efluentes domésticos. Especificamente, a presença de diversos vírus entéricos nesses efluentes, tais como vírus da Hepatite A (HAV), rotavírus, poliovírus, vírus Norwalk, adenovírus, enterovírus, vírus *Snow Mountain* e astrovírus tem sido extensamente relatada na literatura (STEINMANN, 1981; SMITH & GERBA, 1982; HEIKAL, SMITH, GERBA, 1984; ANSARI, SPRINGTHORPE, SATTAR, 1991; JAYKUS, HEMARD, SOBSEY, 1993; MEHNERT & STEWIEN, 1993; ROSE & SOBSEY, 1993; GAJARDO et al., 1995; METCALF, MELNICK, ESTES, 1995; PINA et al., 1998). Ao encontrar as águas naturais, o esgoto doméstico pode tornar-se um veículo desses e de outros microrganismos patogênicos, colocando em risco a saúde da população que daquelas se beneficia.

Desta forma, quando cultivados em áreas sujeitas a aportes de efluentes contaminados com microrganismos patogênicos, os moluscos bivalves poderão concentrá-los em seus tecidos (METCALF & STILES, 1965; SATO, 1971; BEDFORD, WILLIAMS, BELLAMY, 1978; GERBA & GOYAL, 1978; OGAWA et al., 1980; LANDRY et al., 1983; FRAISER & KOBURGER, 1984; GERBA, 1988; KELLY & STROH, 1988; RICHARDS & HETRICK, 1988; De LEON & GERBA,

1990; PLUSQUELLEC et al., 1990; 1994; AHMED, 1992; NATIONAL ADVISORY COMMITTEE, 1992; BOSCH et al., 1994; CHAI, HAN, COCKEY, 1994; MATTÉ et al., 1994; BOSCH, PINTÓ, ABAD, 1995; FAYER et al., 1997; 1998; BUSSE, 1998).

ABAD et al. (1997), pesquisando o processo de bioconcentração viral, observaram que a máxima adsorção *in vitro* de rotavírus e adenovírus por mexilhões ocorreu após 6h de contato. Da quantidade total de vírus semeada, 56% de HAV, 35% de rotavírus, 25% de adenovírus e 4% de poliovírus foram adsorvidos pelos mexilhões após esse período. Entretanto, mesmo após 1h de contato os vírus foram detectados por infecção celular, sendo que a maior taxa de adsorção de rotavírus ocorreu nas brânquias e trato digestivo dos mexilhões.

1.2 SOBRE OS VÍRUS ENTÉRICOS

1.2.1 Características gerais

Posteriormente à ingestão pelo homem, os vírus entéricos replicam-se no trato gastrointestinal, sendo excretados em grande número através das fezes e sobrevivendo no ambiente com relativa estabilidade (MELNICK & GERBA, 1980). Estes vírus são capazes de produzir diversas doenças em humanos, tais como diarréias, meningites assépticas, paralisia, conjuntivites, miocardites e hepatites (ROSE & SOBSEY, 1993).

1.2.2 Vias de transmissão

Estudos epidemiológicos iniciais indicavam apenas a transmissão feco-oral para os vírus entéricos. Entretanto, atualmente vem sendo também relacionada a esses patógenos, uma via de transmissão ambiental, diretamente, através das águas (potável, de piscinas, aerossóis) ou indiretamente, através da ingestão de alimentos contaminados (moluscos bivalves, vegetais ou alimentos inadequadamente cozidos) (JAYKUS, HEMARD, SOBSEY, 1994; GERBA et al., 1996).

A via ambiental de transmissão dos vírus entéricos encontra-se ilustrada na Figura 4 (MELNICK, GERBA, WALLIS, 1978), na qual as excreções humanas são primeiramente lançadas no efluente doméstico. O efluente, sendo uma fonte tradicional de nutrientes para solos e plantações, é aplicado na agricultura (HESPANHOL & PROST, 1994). Porém, tanto os efluentes quanto os aerossóis advindos do processo de utilização dos efluentes na agricultura, podem conter microrganismos patogênicos resistentes aos processos convencionais de tratamento. CARDUCCI et al. (1999) observaram a amplitude de alcance dos aerossóis oriundos de uma planta de tratamento de efluentes, apresentando reovírus e enterovírus até a distância de 50m do tanque de aeração. Quando vegetais cultivados nestas áreas forem consumidos crus, poderão tornar-se uma fonte de transmissão de vírus entéricos.

O lodo proveniente do processo de tratamento do esgoto pode conter quantidades tóxicas de nitratos, detergentes e metais, bem como de vírus. A sua

deposição em solos ou águas também poderá resultar em contaminação (COOPER, 1995).

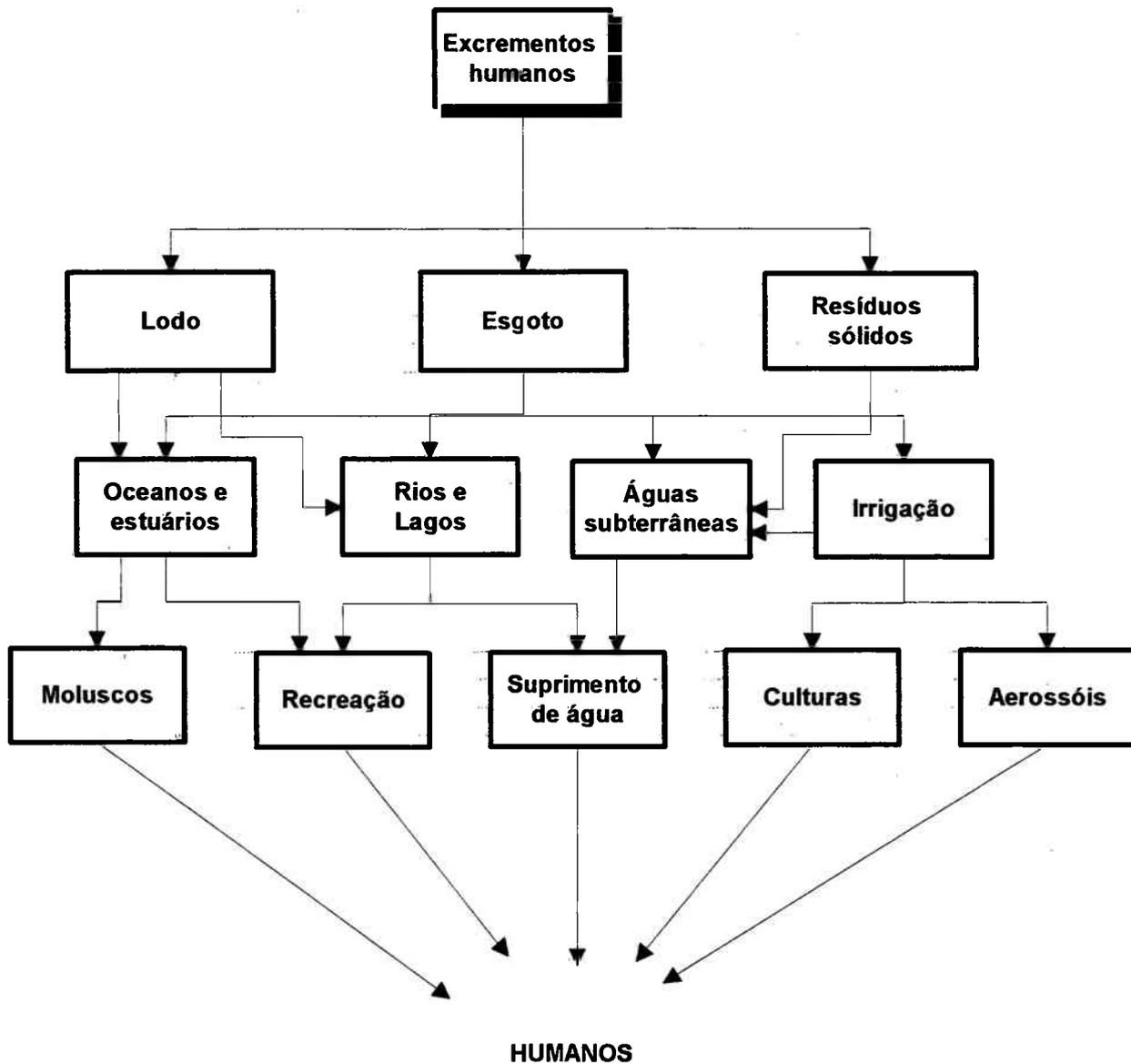


Figura 4 – Vias ambientais de transmissão dos vírus entéricos. Adaptado de MELNICK, GERBA, WALLIS (1978).

No Brasil, os suprimentos de água potável são obtidos a partir de rios ou lagos, mas em alguns países esses podem ser obtidos diretamente a partir de efluentes desinfetado. O cloro que é utilizado tradicionalmente como agente desinfetante, nem sempre é o mais adequado para eliminar vírus entéricos, visto que esses resistem mais intensamente ao cloro do que as bactérias coliformes. Desta forma, suprimentos de água potável podem estar contaminados com vírus entéricos através da infiltração de efluentes domésticos pelas conexões cruzadas em tubulações do sistema de distribuição ou pela ineficiência na desinfecção da água (MURPHY, GROHMAN, SEXTON, 1983; METCALF et al., 1995; KUKKULA et al., 1997). SATTAR, RAPHAEL, SPRINGTHORPE (1984) demonstraram que os rotavírus são resistentes à inativação pela adição de 0,75mg/L de cloro, concentração convencionalmente utilizada no tratamento de águas potáveis. Segundo RAPHAEL, SATTAR, SPRINGTHORPE (1985), a redução máxima do título do rotavírus em águas potáveis, tratadas com cloro na concentração de 0,05mg/L, foi cerca de 2 log₁₀ após 64 dias a 20°C, ou seja, aproximadamente 99% de redução. Os rotavírus exibem maior resistência à inativação por cloraminas e ozônio do que os poliovírus do tipo 1, porém são mais sensíveis à inativação pelo dióxido de cloro (CHEN & VAUGHN, 1990; CLARK, HURST, REGLI, 1993).

A taxa de aplicação do efluente, a declividade e a composição do solo irão direcionar o movimento do mesmo, que poderá alcançar rios ou lagos (TANI et al., 1995; PINA et al., 1998). Nesses ambientes, os vírus poderão associar-se a pequenos sólidos em suspensão, depositando-se junto aos sedimentos de fundo (METCALF et al, 1995). O efeito de marés, tempestades ou dragagens poderão

causar a ressuspensão destes, disponibilizando partículas virais viáveis na coluna d'água. Ao alcançarem áreas costeiras, recreacionais ou de cultivo de moluscos bivalves, as partículas virais representam um risco potencial à saúde humana (CHAPALATI, METCALF, MELNICK, 1986; MELNICK, 1987; COOPER, 1995; PINA et al., 1998; GRIFFIN, et al., 1999).

A contaminação viral de ambientes marinhos poderá influenciar a cadeia alimentar, no momento em que partículas virais presentes em águas naturais poderão ser consumidas por moluscos, crustáceos ou outros detritívoros, conduzindo a contaminação viral aos estágios finais da cadeia alimentar. Segundo SMITH et al. (1978), aves marinhas também podem contaminar-se com vírus entéricos ao alimentarem-se de invertebrados contaminados com os mesmos. Da mesma forma, os autores citam a contaminação de mamíferos marinhos com calicivírus, que alimentaram-se de peixes e nematódeos infectados pelo vírus.

1.2.3. Sobrevivência viral

Vários fatores físicos, químicos e biológicos influenciam a sobrevivência de vírus entéricos em águas naturais (SATTAR, 1981). Variáveis, tais como temperatura da água, matéria particulada em suspensão, microflora e fauna aquáticas, qualidade da água, entre outras, deverão ser consideradas nos estudos sobre inativação ou sobrevivência destes microrganismos (RAPHAEL, SATTAR, SPRINGTHORPE, 1985; NASSER & OMAN, 1999).

Estes patógenos são bastante estáveis no ambiente, sobrevivendo por longos períodos sob certas condições ambientais. HURST & GERBA (1980)

demonstraram a sobrevivência do rotavírus símio SA11 em águas doces e estuarinas por diversos dias a 20°C, especialmente em águas muito contaminadas com esgoto. Segundo PANCORPO et al. (1987) e RAPHAEL et al. (1985), os rotavírus podem persistir em águas de superfície entre 8 e 32 dias, ou por mais de 64 dias em águas potáveis. O rotavírus símio SA11 pode sobreviver por, no mínimo, 9 dias em águas marinhas ou por mais de 19 dias em sedimentos marinhos a 25°C (RAO et al., 1984). Em águas de rios, rotavírus isolados de animais e humanos sobreviveram por 32 dias a 4°C ou por 10 dias a 20°C (RAPHAEL et al., 1985; PANCORPO et al., 1987).

A temperatura da água tem grande influência no processo de inativação viral, sendo que o seu aumento poderá favorecer o crescimento de bactérias e outros tipos de microrganismos no ambiente, que apresentariam ação deletéria sobre os vírus. Esta afirmação foi indiretamente comprovada por RAPHAEL et al. (1985), através da observação do aumento da taxa de sobrevivência viral em amostras de esgoto não tratado, filtradas através de poros de 0,22µm de diâmetro. O processo de filtração eliminou a presença de outros microrganismos na amostra, possibilitando uma maior sobrevivência viral. Mc DANIELS et al. (1983) também comprovaram essa hipótese, demonstrando que os rotavírus podem sobreviver por, no mínimo, 30 dias em amostras de água destilada livre de microrganismos. NASSER & OMAN (1999) demonstraram a inativação viral em temperaturas mais elevadas. As altas temperaturas podem desnaturar as proteínas do capsídeo viral, com conseqüente liberação do genoma viral. Porém, o HAV apresentou maior resistência em altas temperaturas do que os poliovírus,

bacteriófagos e *Escherichia coli*, tanto em efluentes quanto em águas subterrâneas.

A capacidade dos rotavírus em sobreviver nos efluentes tem sido estudada utilizando-se o rotavírus símio SA11 como modelo (RAO et al., 1984). Esse vírus é capaz de sobreviver no efluente mesmo após o tratamento secundário (SOBSEY, 1989; ANSARI et al., 1991; GERBA et al., 1996). SMITH & GERBA (1982) demonstraram que o nível de rotavírus em efluentes tratados foi equivalente ao encontrado no esgoto não tratado. O tratamento do lodo do esgoto por dessecação, pasteurização, digestão anaeróbica e compostagem reduz, mas não elimina os vírus entéricos, que podem sobreviver por até 30 dias a 50°C. SPILLMANN et al. (1987), estudando a inativação de rotavírus humanos, observaram que esses foram mais resistentes à inativação quando o lodo foi anaerobicamente digerido entre 35 e 36°C. Entretanto, a digestão anaeróbica, entre 54 e 56°C ou a fermentação aeróbica entre 60 e 61°C foram capazes de inativar rapidamente o rotavírus. A relativa resistência dos rotavírus pode ser atribuída ao seu genoma de RNA constituído de dupla-fita, normalmente mais resistentes do que os genomas virais de RNA fita simples (TANIGUCHI & URASAWA, 1995).

Os vírus entéricos também poderão permanecer estáveis por longos períodos de tempo quando adsorvidos à matéria particulada ou acumulados aos sedimentos (GERBA & GOYAL, 1978; METCALF et al., 1995).

Os vírus entéricos também podem sobreviver nos alimentos, como relatado por BADAWY, GERBA, KELLEY (1985), que demonstraram a sobrevivência do rotavírus símio SA11 em vegetais crus durante 25 a 30 dias a 4°C ou durante 5 a

25 dias a 20°C. A inativação de poliovírus, rotavírus e HAV a partir de moluscos bivalves foi testada por ABAD et al. (1997) através do cozimento desses animais durante 5min. Após este período, não foram mais detectados poliovírus nos moluscos, porém HAV e rotavírus continuaram presentes, demonstrando uma redução no título original abaixo de 3 log₁₀ (ou 99,9% de redução do título original).

1.3 Qualidade sanitária dos moluscos bivalves e águas de cultivo

Em vista do exposto, diversos autores têm relatado a falta de adequação dos atuais indicadores de contaminação fecal para fontes ambientais. Os métodos atuais, que asseguram a qualidade microbiológica das águas oceânicas utilizadas para recreação ou das águas doces tratadas para consumo da população, são baseados na detecção dos níveis de coliformes fecais (CONAMA, 1986; APHA, 1995; COOPER, 1995). Entretanto, como tais microrganismos são facilmente inativados pelos procedimentos de tratamento de água ou efluentes, a ausência de coliformes fecais não assegura a inexistência de outros patógenos, resistentes à inativação, tais como rotavírus, HAV, entre outros (SATO et al., 1992; ROSE & SOBSEY, 1993; BOSCH et al., 1994; NASSER & OMAN, 1999). Da mesma forma, os poliovírus não se apresentam como um bom modelo de contaminação entérica, visto sua menor resistência à inativação; portanto, sua presença no ambiente não garante a inexistência de outros vírus mais resistentes (ABAD, PINTÓ, BOSCH, 1994).

Para a determinação da qualidade sanitária de alimento de origem marinha os métodos atuais também são baseados no monitoramento dos níveis de

coliformes fecais presentes nas águas de cultivo (REGAN, MARGOLIN, WATKINS, 1993). Entretanto, existem vários relatos que demonstraram a presença de vírus em moluscos bivalves e diversos surtos de doenças originárias da ingestão desses animais, mesmo quando colhidos em águas com qualidade bacteriológica satisfatória (GERBA et al, 1980; WAIT et al., 1983; DUFOUR, 1984; SOBSEY, DAVIS, RULLMAN, 1987; CDC, 1993, 1994; 1996; KAWAMOTO et al., 1993; ROSE & SOBSEY, 1993; BOSCH et al., 1994; JAYKUS et al., 1994; RIPPEY, 1994; Le GUYADER et al., 1998; PINA et al., 1998).

De maneira geral, as bactérias são mais facilmente inativadas do que os vírus nos moluscos bivalves, como demonstrado por DOMBROSKI et al. (1999), quando a bactéria *Vibrio vulnificus*, normalmente isolada de moluscos bivalves e águas de cultivo e associada a surtos de gastroenterites, foi inativada de 95 a 99% através do congelamento convencional (-20°C) de ostras cruas. A inativação bacteriana também pode ser realizada através da depuração, processo de purificação de moluscos bivalves não traumático para o animal. Esse processo consiste em manter os moluscos em águas tratadas, livres de microrganismos patogênicos, nas quais os animais filtram constantemente a água, de forma a eliminar os patógenos que porventura foram acumulados em seus tecidos (RODERICK & SCHNEIDER, 1994). BERNARD (1989) demonstrou que, num período de depuração inferior a 24h, os mexilhões da espécie *Mytilus edulis* contaminados com *Escherichia coli* apresentaram redução do seu nível de contaminação abaixo de valores detectáveis. BOSCH et al. (1995), pesquisando a depuração de vírus entéricos, tais como rotavírus, HAV, adenovírus e poliovírus, observaram uma redução de $2\log_{10}$ (99%) nos títulos infecciosos somente após

96h de depuração para rotavírus e HAV e $2,7\log_{10}$ (aproximadamente 99,9%) para adenovírus. O título infeccioso do poliovírus foi mais rapidamente reduzido, em $3\log_{10}$ (99,9%), após 48h de depuração. ABAD et al. (1997) confirmaram a redução de poliovírus em $3\log_{10}$, após 48h de depuração, e observaram reduções na infectividade viral de 99,82% para adenovírus, 98,71% para HAV e 96,99% para rotavírus após 96h de depuração. Desta forma, fica comprovado que a remoção de bactérias através do processo de depuração não assegura a remoção de vírus entéricos (WITTMAN & FLICK, 1995; REYNOLDS, GERBA, PEPPER, 1997).

A sobrevivência de vírus entéricos nos tecidos dos moluscos bivalves demonstra a necessidade de um monitoramento microbiológico constante dos mesmos (NATIONAL ADVISORY COMMITTEE, 1992; CHALMER & McMILLAN, 1995; COOPER, 1995; WITTMAN & FLICK, 1995; LE GUYADER et al., 1996). A transmissão de doenças relacionadas ao consumo de moluscos contaminados foi reconhecida pela primeira vez em 1956 através de um grande surto de hepatite A associado ao consumo de mariscos (ROOS, 1956). Desde então, as evidências epidemiológicas vinculadas à transmissão de doenças virais pelo consumo de moluscos bivalves contaminados continuam a aumentar (GILL et al., 1983; RIPPEY, 1994; CHAN, 1995; KOHN et al., 1995; METCALF et al., 1995; CHRISTENSEN et al., 1998; MIOSSEC et al., 1998). Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos indicam que o maior risco de doenças agudas está associado ao consumo de bivalves crus. Porém, o risco de consumo de alimentos marinhos contaminados com vários microrganismos não é restrito a este país, tendo abrangência mundial (GROHMAN et al., 1980; CDC, 1989; AHMED, 1992;

MORRIS, 1994). WITTMAN & FLICK (1995) publicaram uma revisão sobre a incidência e os riscos de aquisição de doenças relacionadas ao consumo de moluscos bivalves e citaram que as ostras foram responsáveis por 49% dos casos de doenças e 97% das notificações de mortes, e os mariscos por 38% e 2%, respectivamente. Esta diferença no percentual de doenças e mortes relacionadas ao consumo de moluscos bivalves entre os tipos de moluscos parece estar associada ao fato de que as ostras são consumidas preferencialmente cruas, aumentando o risco de transmissão de patógenos.

Portanto, torna-se necessária a utilização de um indicador eficiente de contaminação entérica para o monitoramento das águas de cultivo e alimentos de origem marinha. A utilização de rotavírus como indicador de contaminação ambiental traz algumas vantagens já que eles são eliminados de fontes humanas e de animais, indicando uma origem antropogênica de contaminação, além de apresentarem alta taxa de sobrevivência no ambiente (PATTI, AULICINO, SANTI, 1997).

1.4 SOBRE OS ROTAVÍRUS

Os rotavírus foram identificados pela primeira vez em humanos em 1973, por BISHOP et al., quando partículas foram observadas no citoplasma de células do epitélio duodenal obtidas a partir de crianças admitidas no hospital para tratamento de diarreia aguda. Desde então, numerosos estudos epidemiológicos têm confirmado que os rotavírus são os maiores responsáveis por diarreia severa em crianças no mundo todo (Mc NULTY, 1978; GUERRANT et al., 1990; KAPIKIAN & CHANOCK, 1996; GLASS et al., 1996). Além disso, são notificadas

também várias complicações associadas às diarréias, tais como desidratação, desequilíbrios eletrolíticos, acidose, sintomas neurológicos e infecção persistente com grande envolvimento de todo o organismo em pacientes imunocomprometidos, como os indivíduos infectados pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) (GILGER et al., 1992). Alguns autores relatam ainda a presença de rotavírus no fluido cerebrospinal de crianças, indicando a possibilidade de comprometimento do sistema neurológico em infecções pelo vírus (KEIDAN et al., 1992; NISHIMURA et al., 1993; USHIJIMA et al., 1994; MAKINO et al., 1996; TAKAHASHI et al., 1999).

Em adultos, os casos de gastroenterites provocados pelo rotavírus são menos freqüentes e estão predominantemente associados à contaminação pelos rotavírus do grupo B, ocorrendo através do contato com crianças infectadas (VON BONDSORFF et al., 1978; NAKATA et al., 1987) ou através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados (HUNG et al., 1984; DUBOIS et al., 1997). WARD, BERSTEIN, YOUNG (1986) demonstraram que 56% dos pacientes adultos que receberam água contaminada por rotavírus desenvolveram gastroenterite.

Estima-se que, em todo o mundo, os rotavírus sejam responsáveis por 140 milhões de casos de diarréias por ano, sendo que mais de 1 milhão desses casos resultam em morte (BERN et al., 1992).

Os rotavírus são classificados como um gênero da família Reoviridae, compreendendo partículas com simetria icosaédrica de aproximadamente 65 a 75nm de diâmetro, não envelopados, o que os torna mais resistentes aos solventes lipídicos. O nome rotavírus (do latim, *rota* significa roda) foi sugerido baseado na sua morfologia circular (FLEWET et al., 1974).

Morfologicamente, os rotavírus possuem duas proteínas de capsídeo, uma externa e outra interna. Essas circulam um nucleocapsídeo, no qual encontra-se o genoma composto por 11 segmentos de RNA dupla-fita (RODGER, SCHNAGL, HOLMES, 1975; NEWMAN et al, 1975).

Os segmentos gênicos do rotavírus podem ser facilmente extraídos e separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Os segmentos de RNA são numerados de acordo com sua ordem de migração no gel, indiretamente proporcional ao seu peso molecular (HERRING et al., 1982; WHITTON et al., 1983). Cada segmento representa um gene que codifica uma proteína, seja ela estrutural ou não estrutural (ESTES, 1996). A partícula infecciosa completa é composta por seis proteínas estruturais agregadas formando uma estrutura tripla, que compreende um núcleo interno composto por VP1, VP2 e VP3 (codificadas pelos genes 1, 2 e 3, respectivamente), um capsídeo interno de VP6 (codificada pelo gene 6) e um capsídeo externo de uma glicoproteína VP7 (codificada pelos genes 7, 8 ou 9, dependendo da cepa) que é penetrado por mais de 60 espículas da proteína VP4 (codificada pelo gene 4). A Figura 5 apresenta, de forma esquemática, a morfologia e as proteínas componentes da estrutura do rotavírus (CONNER, MATSON, ESTES, 1994). A nomenclatura para denominação destas proteínas (como originalmente proposto para o rotavírus símio SA11) designa as proteínas estruturais como VP, seguido por um número referente ao gene que a codifica, sendo as não estruturais designadas como NS, seguido pelo número indicativo do peso molecular da proteína (ARIAS, LÓPEZ, ESPEJO, 1982; MASON, GRAHAM, ESTES, 1983; LIU, OFFIT, ESTES, 1988).

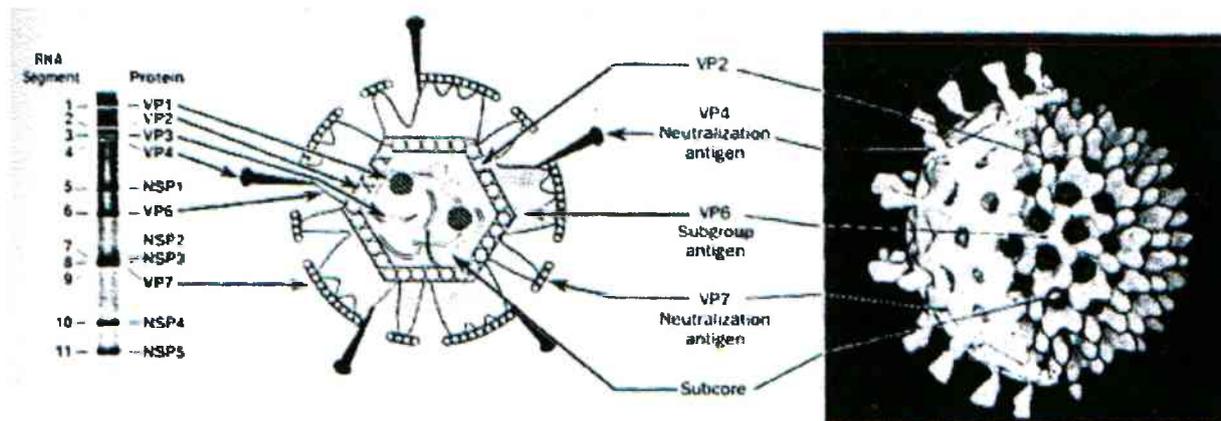


Figura 5 – Esquema da morfologia do rotavírus, proteínas e genes constituintes da sua estrutura. Fonte: CONNER et al. (1994).

Os rotavírus são divididos em grupos e sorotipos. Atualmente, são reconhecidos os grupos A, B, C, D, E e F (BRIDGER, 1994; SAIF & JIANG, 1994), que foram definidos de acordo com as distintas antigenicidades da proteína de capsídeo interno VP6. Os rotavírus dos grupos A, B e C são comumente encontrados em humanos e animais, sendo que os rotavírus dos grupos D, E e F são encontrados somente em animais (MURRAY et al., 1992; WHITE & FENNER, 1994; BISHOP, 1996). Os rotavírus do grupo A podem ser subdivididos de acordo com as antigenicidades das proteínas VP6 (subgrupos I, II), VP7 (sorotipos G) e VP4 (genotipos P) (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996).

VP4 e VP7 são as proteínas de superfície dos rotavírus, sendo reconhecidas por anticorpos neutralizantes. VP4 é sensível à clivagem por enzimas proteolíticas (daí a denominação P na divisão dos genotipos), sendo que a clivagem de VP4 através da tripsina nos resíduos de arginina 241 e 247 resulta em dois fragmentos: VP5 e VP8. A VP4 é o imunógeno primário que estimula anticorpos de neutralização durante a infecção natural pelo rotavírus (WARD et al., 1988), sendo que epitopos heterotípicos de neutralização estão localizados na VP5, que é a porção carboxi-terminal da VP4 obtida após sua clivagem proteolítica. O cultivo *in vitro* do rotavírus é dependente do tratamento com tripsina, visto que o produto da clivagem resulta no aumento da infectividade viral (ESPEJO, LÓPEZ, ARIAS, 1981; ESTES et al., 1981; ARIAS et al., 1996).

A glicoproteína de capsídeo externo VP7 é a maior proteína de superfície viral, compreendendo 30% do vírion. Apresenta uma massa molecular de 37kDa, sendo o maior antígeno de neutralização dos rotavírus. Análises da seqüência de nucleotídeos identificaram regiões de VP7 altamente conservadas entre os

diferentes sorotipos; entretanto, cita-se a existência de seis regiões hipervariáveis de VP7, associadas às especificidades dos sorotipos G (assim denominadas por serem glicoproteínas) (GLASS et al, 1985; GREEN et al., 1987, TANIGUCHI & URASAWA, 1995).

Os rotavírus do grupo A foram classificados em diferentes sorotipos, utilizando-se testes de neutralização contra as proteínas de capsídeo externo VP4 e VP7, as quais expressam os epitopos sorotipo-específicos (HOSHINO et al., 1985). Com relação a VP7, foram identificados 14 sorotipos diferentes para o rotavírus do grupo A (ESTES, 1996), sendo que o sorotipo G1 é o prevalente no mundo, seguido pelos sorotipos 3 e 2 (WOODS et al., 1992; USHIJIMA et al., 1994). A epidemiologia das infecções pelo rotavírus no mundo é influenciada pela extensa variabilidade genômica das cepas virais; desta forma, o conhecimento dos diferentes sorotipos que circulam em determinadas regiões e que contaminam o meio ambiente são importantes para o desenvolvimento de vacinas efetivas e estudos de vigilância epidemiológica (JACOBSON, 1999).

No Brasil, diversos estudos epidemiológicos têm sido realizados associando surtos de diarreia à presença de rotavírus, bem como a identificação de genotipos circulantes no país (LINHARES et al., 1988; TIMENETSKY et al., 1993; 1996; 1997; CASTRO et al., 1994; GOUVEA et al., 1994b; GUSMÃO, et al., 1995; SANTOS et al., 1998; TIMENETSKY & CARMONA, 1999, MASCARENHAS et al., 1998; 1999), entretanto não existem estudos sobre a veiculação deste patógeno através de alimentos, por exemplo pelo consumo de ostras, como já relatado para outros países.

1.4.1 Detecção de rotavírus em moluscos bivalves

Em 1997, o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (LVA) integrou-se ao BMLP financiado pelo governo canadense (CIDA). Isto ocorreu devido a conscientização de pesquisadores catarinenses que entendem que a contaminação das águas oceânicas por vírus entéricos deve ser seriamente considerada quando da liberação dos alimentos de origem marinha ali cultivados para consumo pela população. Ainda existe na população e nos governantes a concepção errônea de que o nível aceitável de coliformes fecais (bactérias) encontrados nas águas e frutos do mar seja um parâmetro suficiente para liberá-las para consumo e recreação.

O modelo de vírus entérico escolhido para a realização deste trabalho foi o rotavírus, que pode ser detectado tanto através de métodos de cultura celular, visto serem adaptáveis ao cultivo *in vitro*, quanto através de técnicas moleculares. A detecção de rotavírus foi realizada por ambos os métodos, sendo que a amplificação gênica via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi a técnica molecular escolhida. GOUVEA et al. (1990) e WU et al. (1994) descreveram, respectivamente, sequências de oligonucleotídeos referentes a diferenças gênicas nos genes que codificam as proteínas VP7 e VP4 dos rotavírus. Através da utilização de iniciadores externos que flanqueiam o início e o final do gene 7,8 ou 9 dos rotavírus do grupo A (dependendo da cepa viral), seguidos pela utilização de iniciadores internos sorotipo-específicos, estes autores descreveram a possibilidade de sorotipagem dos rotavírus através da amplificação gênica precedida de transcrição reversa (RT-PCR). A utilização dos iniciadores internos

numa segunda reação de PCR, denominada *semi-nested* PCR, permite assim a sorotipagem já que o peso molecular dos produtos gênicos gerados com cada iniciador sorotipo-específico é diferente.

Em vista do exposto, esta dissertação apresenta o processo de padronização de uma metodologia para a detecção do rotavírus símio SA11 (G3) a partir de ostras *C. gigas*, inoculadas experimentalmente, que poderá ser futuramente aplicada no monitoramento das ostras cultivadas e consumidas no litoral de Santa Catarina.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Padronizar métodos de detecção do rotavírus símio SA11 em ostras *Crassostrea gigas* experimentalmente inoculadas, através de reações de RT-PCR, da infecção de células *in vitro* e da imunofluorescência indireta.

2.2 Específicos

Avaliar a sensibilidade da reação de RT-PCR seguida de *semi-nested* PCR para detecção do rotavírus símio SA11 em ostras *C. gigas*, experimentalmente inoculadas.

Testar a eficiência do método de preparação dos extratos tissulares de ostras *C. gigas*, experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11, através da reação de RT-PCR, da imunofluorescência indireta e da infecção de células *in vitro*.

Avaliar a recuperação viral a partir dos extratos de ostras *C. gigas*, experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11, através da reação de RT-PCR, da infecção de células *in vitro* e da imunofluorescência indireta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de células MA104

Foram utilizadas células MA104, culturas contínuas de fibroblastos obtidos a partir de rins embrionários do macaco *Rhesus* sp e permissivas à infecção *in vitro* pelos rotavírus.

As células foram cultivadas em garrafas descartáveis de 25cm² ou 75cm² contendo Meio Mínimo Essencial com sais de Earle's (MEM, Sigma) suplementado com soro fetal bovino (SFB, GibcoBRL), antibióticos e antifúngico (GibcoBRL) (Tabela 2), sendo mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Subculturas (passagens sucessivas das células com a finalidade de manutenção da viabilidade celular) foram produzidas retirando-se o meio de cultivo das garrafas que apresentavam uma monocamada celular. As células foram lavadas 2X com tampão salina fosfato (PBS) esterilizado (NaCl 150mM; KH₂PO₄ 1,5mM; Na₂HPO₄ 20mM e KCl 27mM pH 7,2), recebendo, em seguida, um tratamento enzimático através da introdução de 0,5ml ou 1ml de tripsina (1:250, Sigma), utilizada na forma de solução a 0,05% (NaCl 0,8%; KCl 0,04%; dextrose 0,1%; NaHCO₃ 0,058%, EDTA 0,02% e vermelho de fenol 0,045%) dependendo do tamanho do frasco de cultura e foram incubadas a 37°C durante 5min. Após a desagregação da monocamada, as células dissociadas receberam rapidamente meio MEM suplementado com SFB, com a finalidade de bloquear a ação da tripsina e evitar a citólise. As subculturas foram incubadas nas condições de

temperatura e atmosferas de CO₂ descritas acima com a finalidade de formação de nova monocamada.

Tabela 2 – Composição do meio de crescimento e concentração final de cada componente para cultivo de células MA104.

Componente	Concentração final
Meio Mínimo Essencial com sais de Earle's (MEM, Sigma)	9,57g/l
NaHCO ₃ (Sigma)	2,2g/l
Aminoácidos não-essenciais 100X (GibcoBRL)	1X
Hepes pH 7,2 (Sigma)	15mM
L-glutamina (Sigma)	2mM
SFB (Sigma)	10% (v/v)
Anfotericina B (GibcoBRL)	0,25µg/ml
Penicilina (GibcoBRL)	100µg/ml
Estreptomicina (GibcoBRL)	100µg/ml

Extraído do catálogo GIBCO BRL *products & reference guide* 2000/2001

3.2 Produção de fluido infeccioso do rotavírus (estoque viral)

Foram produzidos sobrenadantes infecciosos do rotavírus símio SA11 (sorotipo G3). Células MA104 foram previamente cultivadas como descrito no item 3.1 e ao atingirem uma monocamada, foram lavadas 2X com PBS esterilizado, pH 7,2. As células receberam 2ml de um inóculo viral já existente (não quantificado) que foi previamente incubado durante 30min a 37°C na presença de 10µg/ml de tripsina. As células que receberam esse inóculo viral foram então incubadas durante uma 1h a 37°C, em atmosfera de CO₂, a fim de propiciar a adsorção das partículas virais à monocamada. A seguir, o excesso do inóculo foi removido e as células suplementadas de meio para infecção (meio MEM sem SFB e acrescido de 5µg/ml de tripsina), sendo incubadas sob as mesmas condições de temperatura e pressão de CO₂ acima mencionadas (BIRCH et al., 1983).

Neste trabalho, a evidência da replicação viral foi monitorada a cada 24h, através da observação do efeito citopático (ECP) nas células infectadas, ao microscópio invertido (Coleman XDP-1) (Figura 6). Quando o percentual de destruição da monocamada atingiu 100%, as células foram congeladas a -80°C e descongeladas a 37°C, por 3X, com a finalidade de romper as membranas celulares.

A suspensão foi transferida para tubo e centrifugada a 350Xg, durante 20min, a 4°C. O procedimento de preparação dos fluidos infecciosos foi realizado rotineiramente a fim de obter um estoque viral com alto título infeccioso. No momento em que foi observada a total destruição da camada celular num período de 24h, os fluidos foram considerados prontos para estocagem. Desta

forma, o sobrenadante final foi transferido para outro tubo, aliquotado em volumes de 2ml em tubos de criopreservação e estocado a -80°C.

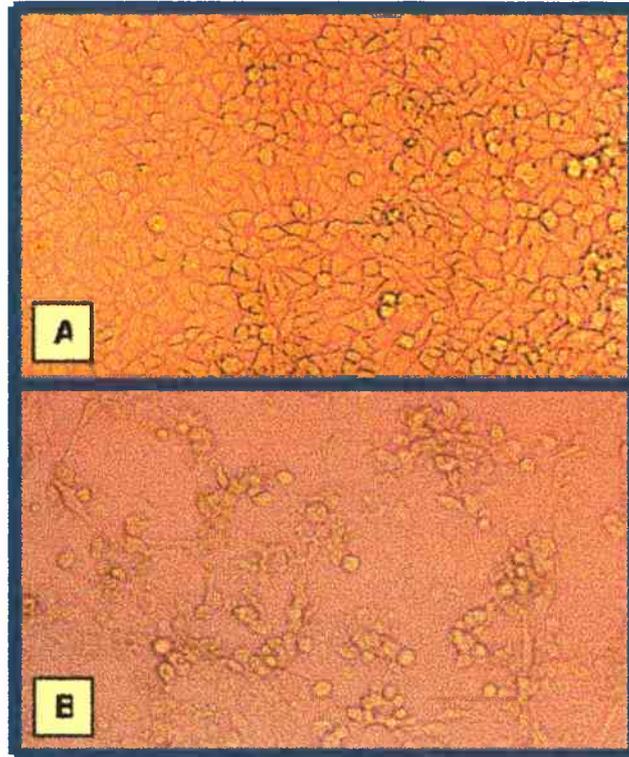


Figura 6 – Células MA104. (A) monocamada de células MA104, não infectadas (B) efeito citopático provocado pelo rotavírus nas células MA104. Aumento de 250X, microscópio invertido.

3.3 Produção do anticorpo monoclonal M60

Os hibridomas produtores do anticorpo monoclonal M60 foram gentilmente cedidos pelo Dr. H. Greenberg, da Universidade de Stanford. O anticorpo monoclonal M60 reconhece cepas de rotavírus do grupo A sorotipos 1 a 4 (SHAW et al., 1986) e apresenta alta afinidade para a glicoproteína VP7 desses vírus.

Os hibridomas foram cultivados segundo HARLOW & LANE (1988), em garrafas de 75cm² contendo meio RPMI (Sigma) suplementado com Hepes 15mM pH 7,2; NaHCO₃ 0,2%; SFB 10%; piruvato de sódio (Sigma) 1mM; L-glutamina 2mM; anfotericina B 0,25µg/ml, penicilina e estreptomicina a 100µg/ml cada, sendo mantidos a 37°C em incubadora sob atmosfera de 5% de CO₂.

Para a manutenção das células em cultura, a suspensão celular foi diluída na proporção 1:10 em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado e incubada sob as mesmas condições de temperatura e atmosferas de CO₂ citadas acima. Ao atingir a concentração de 10⁶células/ml, a suspensão celular foi centrifugada a 4°C, durante 20min a 350Xg, o sobrenadante contendo o anticorpo secretado pelas células foi transferido para um novo tubo, acrescido de solução de azida de sódio 0,02% (p/v) e estocado a -20°C.

3.4 Titulação do fluido infeccioso do rotavírus símio SA11

O título infeccioso de cada estoque viral produzido conforme o item 3.2 foi determinado através do ensaio de imunofluorescência indireta (IFA), segundo BARARDI et al. (1998).

Células MA104 foram cultivadas em meio de crescimento durante 48h, em câmaras de 8 poços (Lab Tek, NUNC). O fluido infeccioso do rotavírus foi diluído seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} em meio para infecção. Foi realizado também o controle negativo, contendo somente meio para infecção e a monocamada de células. As células contidas em cada poço da câmara foram lavadas 2X com 300 μ l de PBS estéril, pH 7,2 e inoculadas com 50 μ l de cada diluição do fluido infeccioso. As câmaras foram incubadas durante 60min a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ a fim de proporcionar a adsorção viral às células. Posteriormente, o inóculo excedente de cada poço foi removido e 300 μ l de meio para infecção foi adicionado. As células foram então incubadas durante 24h, sob as mesmas condições de temperatura e atmosferas de CO₂ mencionadas acima.

Após a incubação, o meio foi removido das câmaras e as células lavadas 2X com PBS. Em seguida, as células foram fixadas à câmara pela adição de 300 μ l de metanol a -20°C e mantidas por 5min à temperatura ambiente. Esta etapa foi novamente realizada e, então, as câmaras foram secas ao ar. As células de cada poço foram reidratadas pela adição de 300 μ l de PBS e incubadas durante 15min com 300 μ l de solução bloqueadora (PBS, soroalbumina bovina a 1%, GibcoBRL e Tween-20 a 0,05%, BIO-RAD) A cada poço foram adicionados 100 μ l do sobrenadante de hibridoma contendo o anticorpo monoclonal M60 diluído a 1:1 em solução bloqueadora, sendo as células incubadas por 12h a 4°C. Após, as células foram lavadas 3X com solução bloqueadora e finalmente incubadas a 37°C durante 15min com um anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado a fluoresceína (FITC, Silenus). As câmaras receberam meio de montagem contendo

PBS a 40%, glicerol 50% (Merck), formalina a 5%, NaCl a 5% e DABCO a 2,5% pH 8,6 (Sigma) e foram recobertas por lamínula para a análise em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40).

As células infectadas pelo rotavírus apresentam fluorescência citoplasmática e núcleo não fluorescente. O título viral foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos/ml (ffu/ml).

3.5 Extração do RNA viral a partir do fluido infeccioso do rotavírus

A extração do RNA do fluido infeccioso do rotavírus, previamente titulado (item 3.4) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS (1989).

Cada amostra foi processada em duplicata, onde 500 μ l do fluido infeccioso foram colocados em tubos tipo Eppendorf e adicionou-se o mesmo volume de FREON 113 (Triclorotrifluoroetano, Aldrich). As amostras foram agitadas vigorosamente durante 30seg e centrifugadas a 30.000Xg por 5min, à temperatura ambiente. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo novo, acrescida de dodecil sulfato de sódio 1% (SDS, GibcoBRL) e incubada a 37°C, durante 30min. Após a incubação, foram acrescentados às amostras 500 μ l da mistura dos solventes fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 25:24:1. Essas foram agitadas vigorosamente por 30seg e centrifugadas como descrito acima. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo novo e acrescida de 500 μ l de clorofórmio, agitada vigorosamente por 30seg e

centrifugada a 30.000Xg por 5min, à temperatura ambiente. Para precipitação dos ácidos nucléicos, foram adicionados à fase aquosa acetato de sódio 3M pH 5,3 na concentração final de 10% desse valor e 3 volumes de etanol absoluto (Merck) mantido a -20°C . As amostras foram incubadas a -20°C durante 2h ou alternativamente, a -80°C durante 30min. Após precipitação, as amostras de RNA foram centrifugadas a 30.000Xg durante 20min, a 4°C . A fase aquosa foi descartada, cada amostra foi acrescida de 3 volumes de etanol 70%, mantido a -20°C , homogeneizada levemente e centrifugada a 30.000Xg, durante 20min, a 4°C . A fase aquosa foi novamente descartada, o tubo vertido sob papel absorvente e o RNA precipitado foi seco ao ar. Foram adicionados ao precipitado 50 μl de água livre de ribonucleases (RNase) e o tubo foi estocado a -20°C , até utilização.

Alternativamente, também foi realizado o procedimento de extração de ácidos nucléicos com o reagente TRIZOL[®] (GibcoBRL), mistura comercial contendo fenol e isotiocianato de guanidina a partir do fluido infeccioso do rotavírus, seguindo as especificações do fabricante (Anexo 1).

3.6 Quantificação do RNA viral

A fim de quantificar o RNA viral obtido após o processo de extração, a amostra foi analisada por espectrofotometria.

A concentração do RNA viral foi medida em espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech) através da leitura da densidade ótica (D.O.) nos comprimentos de onda 260 e 280nm, simultaneamente. Também foi medida a

razão entre as absorvâncias 260/280nm com a finalidade de avaliar o grau de pureza da mesma (SAMBROOK et al., 1989).

3.7 Ensaios de RT-PCR e *semi-nested* PCR para detecção do RNA de rotavírus extraído a partir do fluido infeccioso

Todos os reagentes destinados às reações de RT e PCR foram mantidos a -20°C. Para preparação das reações, os reagentes foram manipulados e pipetados anteriormente à adição do RNA (que ocorreu em outro ambiente físico). Esta preocupação em separar os ambientes e os materiais utilizados anteriormente à adição do RNA visou evitar qualquer contaminação dos reagentes ou locais de preparação da mistura de reação com o RNA viral. A análise dos produtos das reações de PCR foi processada num terceiro ambiente físico distinto dos demais.

As seqüências dos iniciadores utilizados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Sequências dos iniciadores utilizados para a amplificação gênica do rotavírus símio SA11 através da reação de RT-PCR.

Iniciador	Sequência (5'-3')
BEG9	GGC TTT AAA AGA GAG AAT TTC CGT CTG G
END9	GGT CAC ATC ATA CAA TTC TAA TCT AAG
ET3	CGT TTG AAG AAG TTG CAA CAG

Adaptado de Gouvea et al. (1990)

3.7.1 Definição das concentrações ideais de $MgCl_2$ e de iniciadores para as reações de PCR

Neste ensaio foi utilizado o RNA viral extraído com fenol/clorofórmio (item 3.5) e diluído a 1:5 (160ng).

As amostras do RNA viral foram testadas com cinco diferentes concentrações de $MgCl_2$: 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM e 3,0 mM, através do protocolo de amplificação número 1, descrito a seguir (item 3.7.2.1). Também foram testadas pelo mesmo protocolo, as concentrações dos iniciadores de 400 e 200pmoles para a primeira reação de PCR, e 100 e 200pmoles para a segunda reação de PCR.

3.7.2 Protocolos de amplificação para o rotavírus símio SA11

As amostras de RNA viral obtidas a partir de fluido infeccioso (item 3.5), foram diluídas seriadamente desde 1:5 até 1:160.000, correspondendo respectivamente a 160ng (5×10^5 ffu) e 5fg (15,2ffu) de RNA. Essas foram testadas conforme com os protocolos de RT-PCR números 1 e 2, descritos logo abaixo. Para ambos os protocolos, foram utilizados 2 μ l (equivalendo a 800ng de RNA) da amostra do controle positivo (RNA purificado não diluído) e 5 μ l das diluições do RNA purificado, cujas concentrações equivalentes são apresentadas no Anexo 2. Também foram realizados controles negativos, nos quais foi introduzida água no lugar do RNA viral.

3.7.2.1 Protocolo número 1 (PCR tradicional)

Segundo BARARDI et al. (1999), 5µl de cada diluição do RNA viral, cujas concentrações equivalentes encontram-se no Anexo 2, e 2µl do controle positivo (800ng de RNA) foram adicionados a tubos previamente preparados contendo o par de iniciadores BEG9 e END9, ambos na concentração de 200pmoles. As amostras de RNA dupla fita foram desnaturadas a 99°C durante 5min no termociclador (MiniCycler™, PTC-150-16&-25, MJ RESEARCH) e transferidas rapidamente para o gelo. A cada tubo, foi adicionado o tampão de reação (Cenbiot) na concentração final 1X, contendo Tris-HCl 10mM pH 8,0 e KCl 50mM. À esta mistura foram adicionados MgCl₂ (Sigma) 1,5mM; DTT (Ditiotreitol, Sigma) 10mM, deoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Gibco) 400µM e 40U de M-MLV transcriptase reversa (Gibco). A reação de RT foi realizada a 37°C, durante 90min, na qual o segmento de RNA foi transcrito à sequência de DNA complementar. Posteriormente, foram adicionadas 5U de *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot) diretamente a cada tubo, sendo as amostras homogeneizadas e cobertas com 20µl de óleo mineral (Sigma). A primeira reação de amplificação foi realizada utilizando-se o seguinte programa de temperaturas e ciclos: 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 55°C por 2min e extensão a 72°C por 3min. Foi realizado ainda um passo final de extensão a 72°C por 10min (Figura 7).

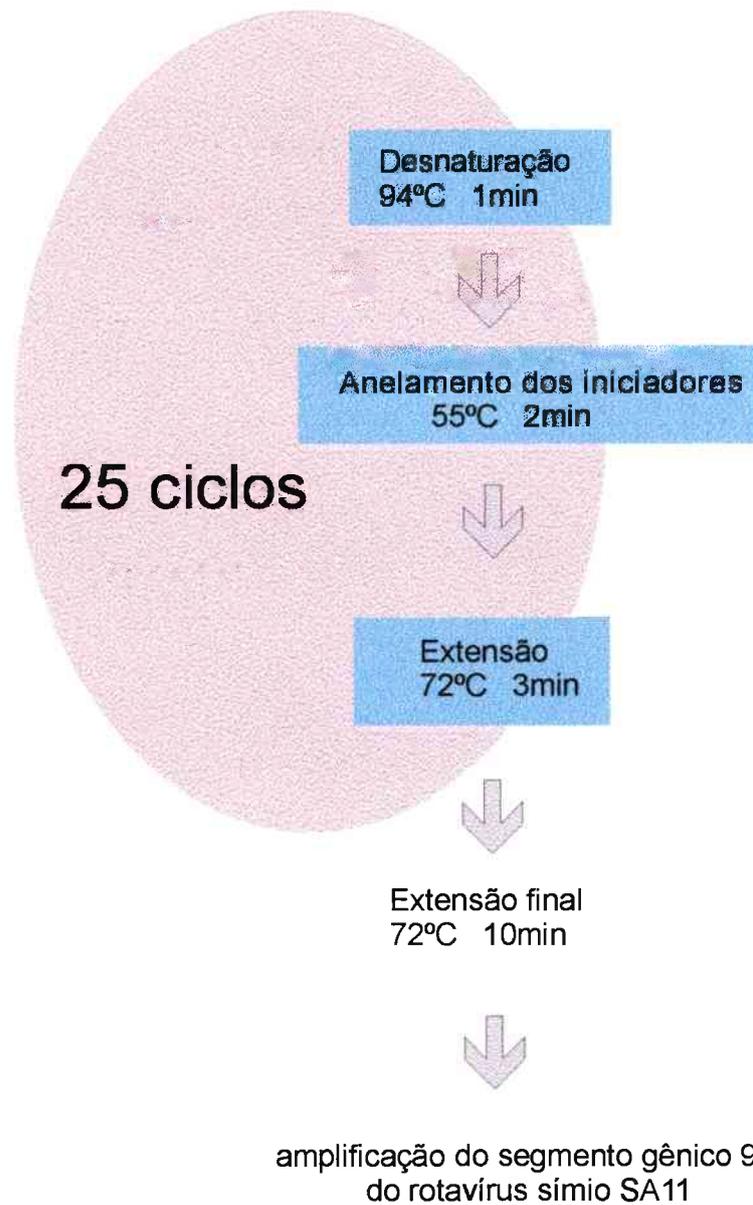


Figura 7 – Programa de ciclos e temperaturas utilizado para as reações de PCR para o rotavírus símio SA11, segundo BARARDI et al. (1999).

Para a reação *semi-nested* PCR, 2 μ l do produto da primeira reação de amplificação foram adicionados à mistura de reação contendo o mesmo tampão utilizado na primeira reação; MgCl₂ 1,5mM; deoxinucleotídeos trifosfatados 400 μ M; os iniciadores ET3 e END9 na concentração 100pmoles cada e *Taq* DNA Polimerase 5U, sendo as amostras homogeneizadas e cobertas com 20 μ l de óleo mineral. A reação foi realizada utilizando-se o mesmo programa de temperaturas e ciclos descrito para a primeira reação e apresentado na Figura 7.

3.7.2.2 Protocolo número 2 (PCR SuperMix)

Neste ensaio, foi testada a mistura comercial de reação "PCR SuperMix" (GibcoBRL), seguindo-se as especificações do fabricante, com exceção da concentração de MgCl₂ definida conforme o descrito no item 3.7.1.

Cinco microlitros de cada diluição do RNA viral, cujas concentrações encontram-se especificadas no Anexo 2, e 2 μ l do controle positivo (equivalendo a 800ng de RNA) foram desnaturadas a 99°C durante 5min no termociclador e transferidas rapidamente para gelo. Aos tubos foram adicionados tampão de reação 1X (Gibco) (Tris-HCl 50mM pH8,3; KCl 75mM; MgCl₂ 3,0mM); DTT 5mM; deoxinucleotídeos trifosfatados 500 μ M, os iniciadores BEG9 e END9 ambos na concentração de 100pmoles e 40U de M-MLV transcriptase reversa. As amostras foram incubadas a 37°C, durante 90min para a realização da reação de RT.

Para a primeira reação de amplificação, 2 μ l do produto da RT foram adicionados aos tubos contendo a mistura "PCR SuperMix" (Tris-HCl 22mM pH 8,4; KCl 55mM; MgCl₂ 1,65mM, deoxinucleotídeos trifosfatados 220 μ M e 22U/ml

de *Taq* DNA Polimerase recombinante e os iniciadores BEG9 e END9 na concentração de 100pmoles cada. Uma solução de $MgCl_2$ 1,35mM foi introduzida aos tubos contendo a "PCR SuperMix", com a finalidade de adequar a concentração final do reagente.

As amostras foram cobertas com 20 μ l de óleo mineral e incubadas a 80°C, por 1min, conforme indicações do fabricante. Em seguida, a reação de amplificação foi iniciada, utilizando-se o mesmo programa de temperaturas e ciclos apresentado na Figura 7.

Para a reação de *semi-nested* PCR, 2 μ l do produto da primeira reação de amplificação e 100 pmoles de cada um dos iniciadores internos foram adicionados a "PCR SuperMix". As amostras foram cobertas com 20 μ l de óleo mineral, sendo a reação realizada através do programa de temperaturas e ciclos apresentado na Figura 7.

3.8 Visualização dos produtos de PCR

Os produtos das reações de PCR foram visualizados através de gel de agarose a 1% ou através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10% (Tabela 4), segundo SAMBROOK et al. (1989).

Cinco microlitros de cada amostra foram misturados ao tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40% p/v em água) e aplicados no gel, sendo a eletroforese realizada a 100V em tampão de corrida Tris-borato/EDTA 1X (TBE, Tris-HCl 0,09M, ácido bórico 0,09M e EDTA 0,002M). O marcador de peso molecular 100pb DNA *ladder* (GibcoBRL) foi aplicado a cada

conjunto de amostras, a fim de definir o peso molecular dos fragmentos amplificados. Ao término da eletroforese, o gel foi corado com solução aquosa de brometo de etídeo 0,5µg/ml, sendo os produtos amplificados visualizados através da exposição à luz ultravioleta.

Tabela 4 – Composição do gel de poliacrilamida utilizado para visualização dos produtos das reações de PCR com as concentrações finais de cada componente.

Componente	Concentração final
Acrilamida (Sigma)	10%
Bis-acrilamida (Sigma)	0,26%
TBE 5X (Sigma)	1X
Persulfato de amônio (APS, Sigma)	1%
N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamino (Temed, Sigma)	0,03%

Adaptado de SAMBROOK et al. (1989)

3.9 Preparação dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus

3.9.1 Inoculação experimental das ostras com rotavírus símio SA11

O procedimento de inoculação das ostras com rotavírus foi realizado segundo BARARDI et al. (1999). Exemplares de *C. gigas* foram adquiridos diretamente com produtores, na praia de Ribeirão da Ilha, situada no extremo sul da Ilha de Santa Catarina, voltada para a baía sul, distante 18km do centro da cidade de Florianópolis. Este local foi escolhido para a coleta das ostras, por apresentar um grande número de cultivos de ostras e mexilhões e possuir água de

qualidade bacteriológica satisfatória, segundo a Fundação de Amparo à Tecnologia e ao Meio Ambiente (FATMA).

As valvas foram cuidadosamente limpas com o auxílio de uma escova, cobertas com solução de álcool iodado a 10% por 10min e secas ao ar durante 30min. Posteriormente, as valvas foram abertas com auxílio de faca especial desinfetada através de um solução aquosa de hipoclorito de sódio a 10%.

Duas ostras (10 a 20g de tecido vivo de cada animal) foram processadas como amostra única, sendo inoculadas com $3,0 \times 10^7$ ffu de fluido infeccioso do rotavírus símio SA11, preparado e titulado de acordo com os itens 3.2 e 3.4. A inoculação foi realizada em 3 ou 4 sítios distintos da região gastrointestinal das ostras, utilizando-se ponteira de micropipeta (CROMEANS, NAINAN, MARGOLIS, 1997). Após 30min à temperatura ambiente, as ostras foram processadas conforme protocolo a seguir, visando a preparação de um extrato tissular, designado Extrato B.

Ainda foram preparados extratos tissulares a partir de ostras não inoculadas com rotavírus (sadias), que serviram como controles negativos do experimento e designados Extratos Negativos.

Com a finalidade de obter uma referência de 100% de recuperação viral, ostras não inoculadas com rotavírus, foram processadas de acordo com procedimento descrito a seguir. Ao final, o extrato tissular produzido foi inoculado com a mesma quantidade de fluido infeccioso injetada inicialmente nas ostras para a produção do Extrato B, ou seja, com $3,0 \times 10^7$ ffu. Este foi designado Extrato A.

3.9.2 Preparação do extrato tissular de ostras

A preparação dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus encontra-se esquematizada na Figura 8 (LEWIS & METCALF, 1988; BARARDI et al., 1999, com modificações). Os tecidos das ostras foram macerados com auxílio de um homogeneizador Ultra-Turrax (Modelo T25 basic, IKA Labortechnik) durante 30seg a 24.000 rotações/min, na presença de 100ml de tampão triptose-fosfato (TPB) 10% (v/v) (TPB 100% contém 20g de triptose; 2,0g de glicose; 5,0g de NaCl e 2,5g de Na₂HPO₄, pH 7,3) preparado em glicina 0,05M, pH 9,0. O homogeneizado foi agitado a 4°C, durante 30min e posteriormente centrifugado a 10.000Xg durante 30min, a 4°C. O sobrenadante foi colhido e acrescido de polietileno glicol 8.000 (PEG) 8% (p/v), preparado em TPB 10%, e mantido sob agitação durante 16h, a 4°C. O homogeneizado foi novamente centrifugado a 10.000Xg durante 20min, a 4°C, e o sobrenadante descartado. O precipitado final foi acrescido de 5ml de Na₂HPO₄ 0,15M, pH 9,0. Após, as amostras foram sonicadas em aparelho Sonic Dismembrator, Modelo 60 (Fisher Scientific) na velocidade 20, durante o tempo total de 1min, sendo realizadas duas etapas de 30seg cada com um intervalo de 5seg. Como etapa final do procedimento, os extratos foram agitados durante 20min e centrifugados a 10.000Xg, durante 30min, a 4°C.

Os extratos foram transferidos para tubos novos e estéreis, tiveram seu pH ajustado para 7,4 e foram tratados com solução de penicilina e estreptomicina 150µg/ml cada; 50µg/ml de anfotericina B e 10µg/ml de tripsina. As amostras foram estocadas a -80°C até sua utilização.

Alguns extratos tissulares de ostras não foram submetidos à etapa final do procedimento descrita logo acima (nova etapa de centrifugação após o procedimento de sonicação). Desta forma, após sonicação, os extratos A e B receberam diferentes tratamentos, sendo subdivididos em: A1, A2, B1 e B2. Os extratos A2 e B2 não foram submetidos a esta etapa final, sendo os extratos A1 e B1 submetidos à mesma (Figura 8). Ilustrações da preparação desses extratos estão na Figura 9.

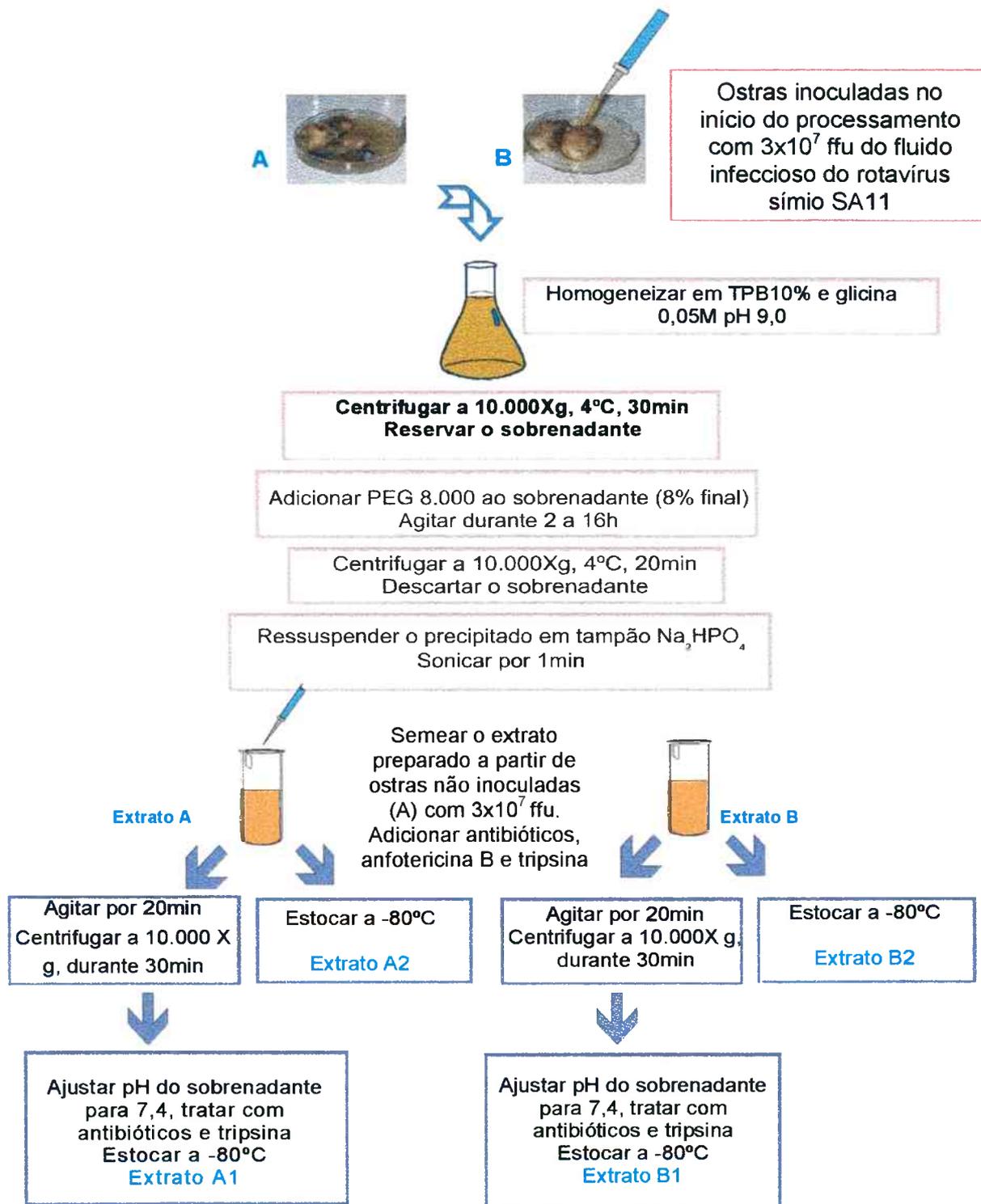


Figura 8 – Procedimento de preparação dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus.

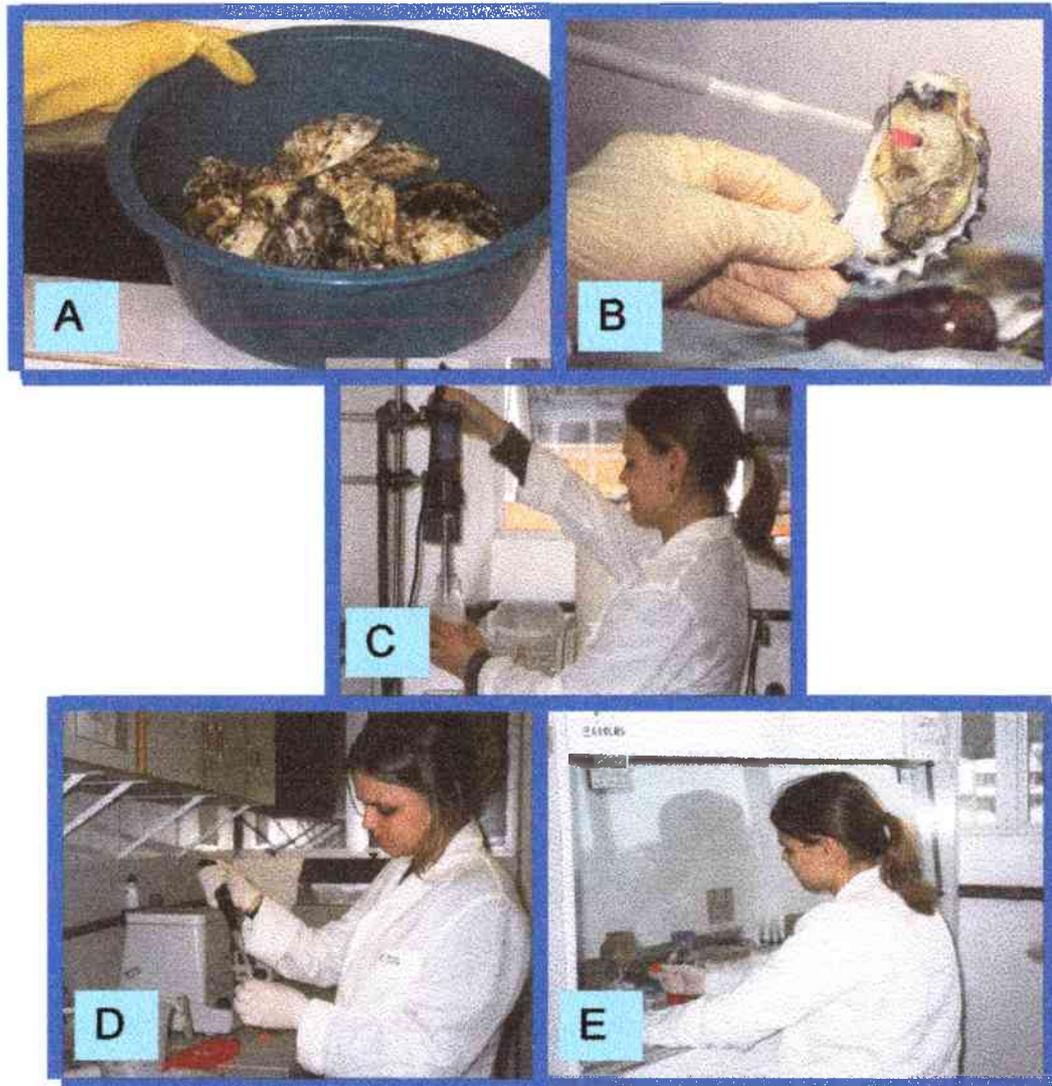


Figura 9 – Esquema ilustrativo do procedimento de preparação dos extratos tissulares de ostras. (A) limpeza e assepsia externa das valvas das ostras (B) inoculação viral na região gastrointestinal da ostra (C) homogeneização dos tecidos das ostras (D) extração do RNA viral a partir dos extratos tissulares das ostras e RT-PCR (E) utilização dos extratos tissulares das ostras em ensaios de cultura celular.

3.10 Extração do RNA viral a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus

O procedimento de extração do RNA viral a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus foi realizado segundo ATMAR et al. (1993); LEES, HENSHILWOOD, DORÉ (1994); BARARDI et al. (1999). Quinhentos microlitros de cada extrato de ostras receberam o mesmo volume de FREON 113, que foram agitados vigorosamente por 30seg e, em seguida, centrifugados a 30.000Xg, por 5min, à temperatura ambiente. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e adicionada de Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA (Sigma) 5mM, SDS 0,5%(p/v) e proteinase K (GibcoBRL) 400µg/ml, sendo incubada a 37°C, durante 30min. Aos tubos foram adicionados brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, Sigma) 1,3%(p/v) e NaCl (Sigma) 0,52M, sendo as amostras incubadas a 56°C durante 30min. Após este período, o procedimento padrão de extração de ácidos nucleicos com fenol:clorofórmio e precipitação com etanol foi realizado de acordo com o descrito no item 3.5.

Alternativamente, o procedimento de extração de ácidos nucleicos com o reagente TRIZOL[®] também foi realizado para os extratos tissulares de ostras, seguindo as especificações do fabricante (Anexo 1).

3.11 Ensaios de RT-PCR e *semi-nested* PCR para detecção do RNA de rotavírus extraído dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas

3.11.1 Definição da concentração ideal de MgCl₂

Com a finalidade de definir a concentração ideal de MgCl₂ para a reação de PCR, foi utilizada somente a diluição 1:5 (160ng ou 5x10⁵ ffu) do RNA viral, não sendo necessário testar outras diluições. As amostras de RNA foram testadas com cinco diferentes concentrações de MgCl₂: 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM e 3,0 mM, através do protocolo de amplificação número 1, conforme o item 3.7.2.1.

3.11.2 Protocolos de amplificação

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade do ensaio de amplificação gênica para recuperação do rotavírus a partir de ostras inoculadas experimentalmente, as amostras de RNA viral, que foram extraídas dos extratos tissulares de ostras (item 3.10) foram diluídas seriadamente desde 1:5 até 1:5.000.000, correspondendo respectivamente a 2x10⁴ e 0,03ffu. Essas concentrações foram calculadas para o Extrato A (Anexo 3).

As amostras foram testadas conforme com os protocolos de PCR números 1 e 2, descritos respectivamente nos itens 3.7.2.1 e 3.7.2.2. Para ambos, foram utilizados 2µl (800ng) de RNA purificado (controle positivo do experimento) e 5µl das diluições do RNA extraído a partir dos extratos, cujas concentrações equivalentes encontram-se no Anexo 3.

3.12 Ensaio de citotoxicidade do extrato tissular de ostras sadias não inoculadas com o rotavírus (Extrato Negativo)

Este ensaio objetivou detectar a citotoxicidade dos extratos tissulares de ostras sadias ou Extrato Negativo (não inoculadas com rotavírus), preparado de acordo com o item 3.9.2. Células MA104 (aproximadamente 10^6 células/ml) foram cultivadas em placas de 24 poços (NUNC) e mantidas como descrito no item 3.1.

Após 48h de incubação a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂, o Extrato Negativo foi diluído seriadamente em meio para infecção desde a proporção 1:2 até 1:1000. Cada um dos 24 poços da placa contendo a monocamada de células foi lavado 2X com 1ml de PBS estéril, pH 7,2 e em seguida, inoculado com 250µl de cada diluição do extrato, bem como com o Extrato Negativo não diluído (puro). As placas foram mantidas durante 1h a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, o extrato foi aspirado e as células suplementadas com 1ml de meio para infecção.

O experimento foi mantido sob as mesmas condições de temperatura e atmosferas de CO₂ mencionadas anteriormente, sendo realizadas observações da camada celular 24, 48 e 72h após a incubação, com a finalidade de identificar as alterações morfológicas celulares. Cada observação foi comparada com um controle negativo, sem o extrato de ostra, contendo apenas a monocamada celular e meio para infecção. Foram realizadas quatro repetições para cada diluição do Extrato Negativo, sendo que o ensaio apresenta-se esquematizado na Figura 10. Os dados semi-quantitativos obtidos diretamente a partir das observações de alterações morfológicas celulares foram transformados em valores quantitativos (Tabela 5), sendo obtidos média e desvio padrão para cada grupo de dados.

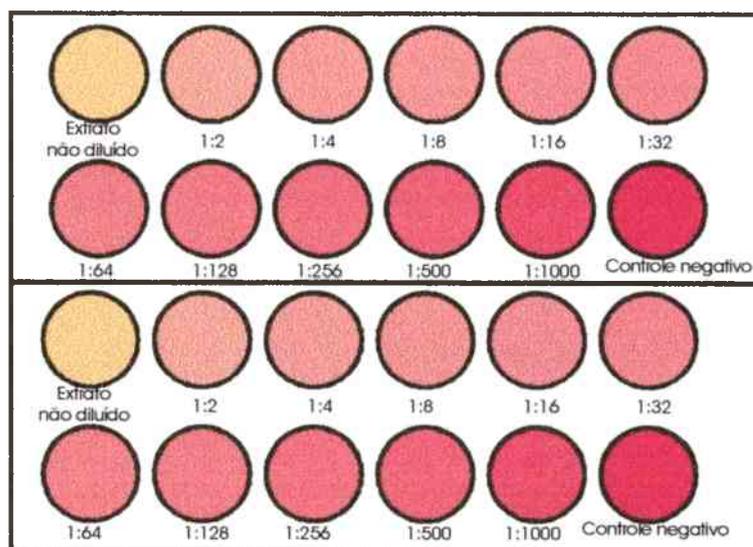


Figura 10 – Disposição da placa de 24 poços utilizada para a determinação da citotoxicidade das diferentes diluições do Extrato Negativo (extrato tissular de ostras sadias, não inoculadas com o rotavírus), em células MA104.

3.13 Ensaio de citopatogenicidade dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus símio SA11

Este ensaio visou comparar dois tipos de extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com fluido infeccioso do rotavírus símio SA11 (A2 e B2) e verificar a recuperação viral após a preparação dos extratos.

Células MA104 foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas a 37°C durante 48h sob atmosfera de 5% de CO₂, conforme descrito no item 3.12.

Os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com fluido infeccioso de rotavírus (A2 e B2), preparados de acordo com item 3.9.2, foram diluídos seriadamente em meio para infecção desde a proporção 1:32 até 1:1000, correspondendo respectivamente a $1,56 \times 10^4$ e 488ffu (Anexo 4). As diluições dos extratos (250µl) foram inoculadas na monocamada de células, sendo as mesmas mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, durante 1h, para a adsorção do inóculo. Após este período, o inóculo excedente foi aspirado e as células suplementadas com 1ml de meio para infecção.

Como controle negativo do experimento, foram incubados na placa de 24 poços, somente células e meio para infecção. O controle positivo constou de fluido infeccioso do rotavírus símio SA11, diluído em meio para infecção nas mesmas proporções dos extratos tissulares de ostras, equivalendo às mesmas concentrações em ffu para os extratos inoculados com rotavírus. Estas amostras foram inoculadas nas células, conforme já descrito acima.

O experimento foi mantido sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera de CO₂ e as células observadas 24, 48 e 72h após a incubação. Ao término de cada período, foram realizadas observações do ECP provocado em

cada amostra, comparando-as com os controles negativo e positivo (ou controle viral) e atribuído um escore semi-quantitativo de uma a cinco cruces. Esta designação variou de acordo com o percentual de destruição da monocamada celular. Posteriormente, visando a aplicação de uma análise estatística aos resultados obtidos, foi designado um escore quantitativo, com valores de 1 a 5 aos atributos semi-quantitativos determinados no momento da observação do ensaio (Tabela 5).

Tabela 5 – Percentuais de destruição da camada celular devido a infecção viral utilizados no ensaio de citopatogenicidade dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11.

Percentual de destruição da camada celular(%)	Escore semi-quantitativo	Escore quantitativo
10%	+	1
30%	++	2
50%	+++	3
80%	++++	4
100%	+++++	5

3.13.1 Análise estatística para os valores obtidos no ensaio de citopatogenicidade dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus símio SA11

Os valores obtidos no ensaio de citopatogenicidade foram submetidos a uma análise da variância (ANOVA) monofatorial, utilizando o programa STATGRAPHICS Plus[®], versão 2.1 (Copyright© 1995, Manugistics, EUA), relacionando os dois extratos A2 e B2 em diferentes diluições seriadas (1:32 a 1:1000) e tempos de incubação (24, 48 e 72h). O teste de separação de médias utilizado foi o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.14 Ensaio de avaliação da recuperação viral a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus símio SA11, por imunofluorescência indireta

Este ensaio foi realizado visando comparar a quantidade de partículas virais viáveis nos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas (A2 e B2) e avaliar a recuperação viral após a preparação dos mesmos. Os extratos tissulares de ostras inoculadas experimentalmente foram diluídos seriadamente em meio para infecção nas proporções: 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400, sendo cada diluição realizada em triplicata.

Células MA104 foram cultivadas em câmaras de 8 poços, especiais para ensaios de imunofluorescência, durante 48h conforme descrito no item 3.4. As monocamadas celulares foram lavadas 2X com 300µl de PBS estéril pH 7,2 e inoculadas com 50µl de cada diluição dos extratos. As câmaras foram incubadas durante 60min a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, o inóculo

de cada poço foi removido e 300 μ l de meio para infecção foram adicionados às células. As câmaras foram então incubadas durante 48h, a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. O procedimento de fixação das células e incubação com os anticorpos foi realizado conforme descrito no item 3.4.

Também foram testados os dois extratos A1 e A2 nas mesmas diluições citadas anteriormente e com 48h de incubação. Posteriormente, foi realizado um experimento adicional, reduzindo-se a concentração de tripsina no extrato para 5 μ g/ml e inoculando-se a monocamada celular com os extratos tissulares de ostras A1 e B1 (ambos receberam a etapa final de centrifugação durante o processo de preparação dos extratos), diluídos seriadamente a 1:50; 1:100; 1:200 e 1:400, num período de incubação de 72h.

4. RESULTADOS

4.1 Título infeccioso do rotavírus símio SA11

O fluido infeccioso do rotavírus, não quantificado, e produzido de acordo com o item 3.2 foi titulado através do ensaio de imunofluorescência indireta (item 3.4) utilizando o anticorpo monoclonal M60 produzido de acordo com o item 3.3 e revelado com anti-IgG de camundongo conjugada a FITC. De acordo com este ensaio, o título viral foi de 5×10^7 ffu/ml (Figura 11).

4.2 Quantificação do RNA viral

O RNA viral obtido a partir do fluido infeccioso do rotavírus, previamente titulado, foi dosado espectrofotometricamente de acordo com o item 3.6. A concentração do RNA do rotavírus SA11 foi de $0,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, apresentando um valor de 1,8 para a relação entre absorbâncias 260/280nm.

4.3 Reações de RT-PCR

4.3.1 Reações de RT-PCR para o RNA viral obtido do fluido infeccioso

4.3.1.1 Comparação entre os procedimentos de extração do RNA viral

Foram avaliados dois procedimentos de extração do RNA viral obtido do fluido infeccioso do rotavírus: utilização da técnica convencional de extração pelo fenol/clorofórmio e da técnica comercial utilizando-se o reagente TRIZOL[®] (item 3.5). O RNA viral foi reversamente transcrito e amplificado através da RT-PCR

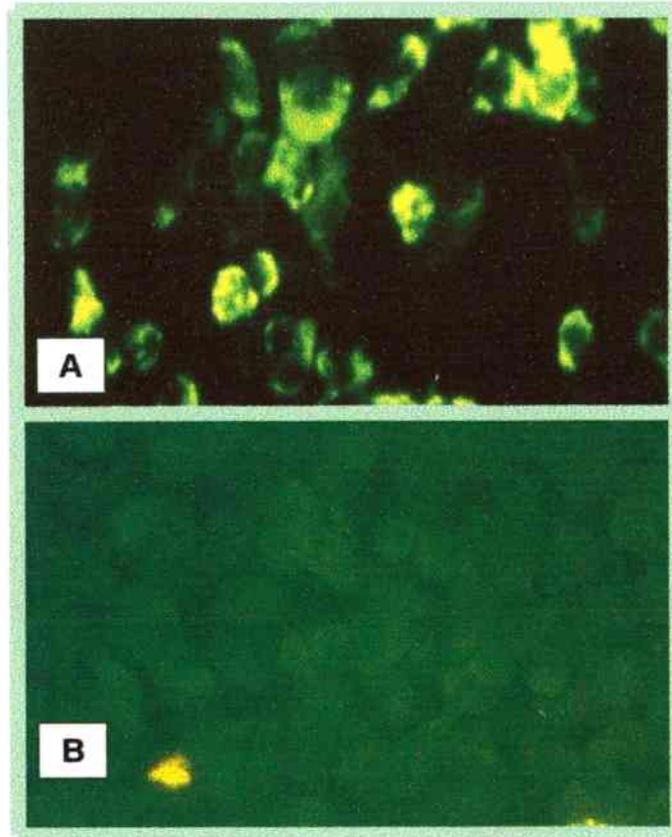


Figura 11 – Imunofluorescência de células MA104 infectadas pelo rotavírus símio SA11 na diluição 10^{-3} , incubadas primeiramente com o anticorpo monoclonal M60 e posteriormente com um anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (A) e controle negativo de células não infectadas pelo rotavírus símio SA11(B).

(iniciadores BEG9 e END9), seguido da reação *semi-nested* PCR (iniciadores END9 e ET3) utilizando-se o protocolo 2 (item 3.7.2.2). A Figura 12 apresenta os resultados de amplificação que indicam sensibilidade similar nos produtos amplificados do rotavírus, em ambos os procedimentos de extração. Nos ensaios subseqüentes foi utilizado somente o procedimento de extração com fenol/clorofórmio, visto apresentar sensibilidade similar na amplificação do RNA viral aliado ao menor custo de processamento, quando comparado com o procedimento de extração com TRIZOL[®].

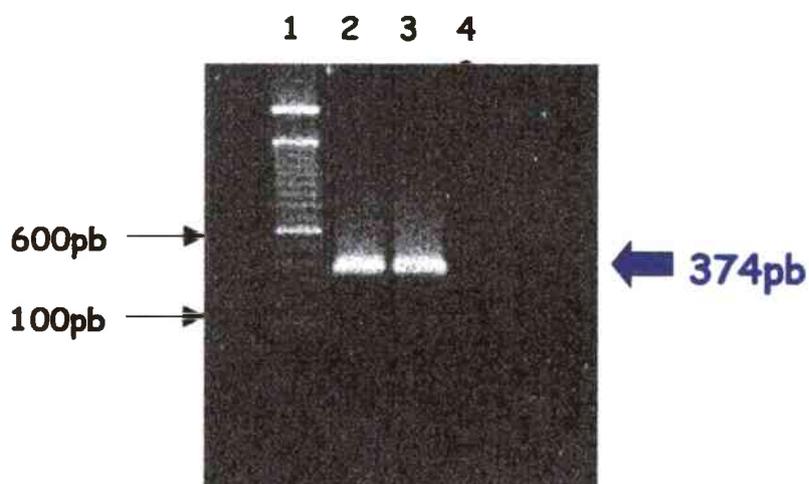


Figura 12 – Produtos da reação de *semi-nested* PCR (protocolo 2 - PCR Supermix) do RNA extraído do fluido infeccioso do rotavírus SA11 e diluído a 1:5 (160ng) utilizando-se diferentes procedimentos de extração. Linhas: 1: marcador de peso molecular (100pb *ladder*); 2: procedimento de extração do RNA com TRIZOL[®]; 3: procedimento de extração do RNA com fenol/clorofórmio; 4: controle negativo.

4.3.1.2 Padronização das concentrações ideais de MgCl₂ e de iniciadores

Foi empregado o ensaio de padronização das concentrações ideais de MgCl₂ e de iniciadores a serem utilizados na primeira e segunda reações de PCR (item 3.7.1) para a amplificação do rotavírus utilizando-se o protocolo 1 (PCR tradicional - item 3.7.2.1). Dentre as concentrações de MgCl₂ testadas (1; 1,5; 2, 2,5 e 3,0mM), observou-se amplificação do segmento gênico 9 do rotavírus somente com as concentrações de 2,5 e 3mM do reagente. Com 3mM de MgCl₂ detectou-se maior intensidade no produto amplificado, demonstrando uma melhor sensibilidade na amplificação (Figura 13A). Para determinar a concentração ideal de iniciadores, foram testados através do protocolo 1 (onde as reações de RT e PCR são feitas num único passo), 400 e 200pmoles de iniciadores para a primeira reação (RT-PCR) e 200 e 100pmoles de iniciadores para a segunda reação (*semi-nested* PCR). Para as concentrações de 200 e 100pmoles de iniciadores foi observada uma maior intensidade no produto amplificado, demonstrando maior especificidade na amplificação (Figura 13B).

4.3.1.3 Limite de detecção do RNA viral

O limite de sensibilidade para detecção do segmento gênico 9 do rotavírus obtido a partir do fluido infeccioso, foi determinado utilizando-se dois diferentes procedimentos de amplificação: os protocolos 1 (PCR tradicional item 3.7.2.1) e 2 (PCR Supermix - item 3.7.2.2).

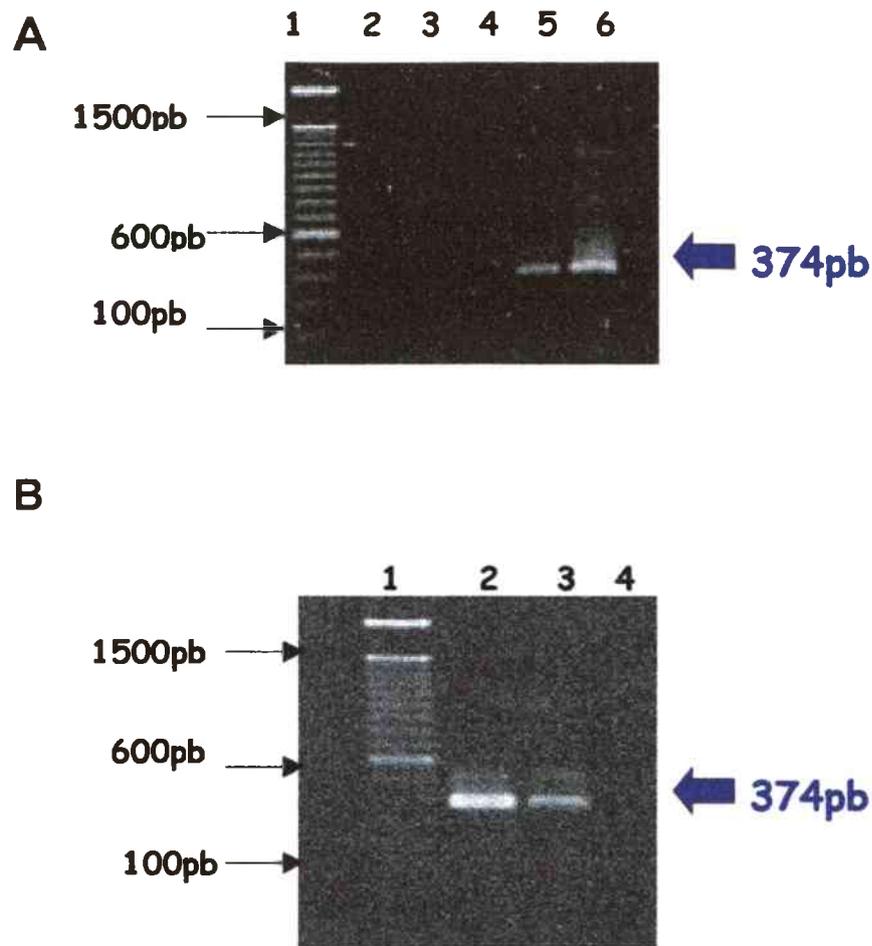


Figura 13 - Produtos das reações de *semi-nested* PCR (protocolo 1 – PCR tradicional) do RNA extraído a partir do fluido infeccioso do rotavírus SA11 (utilizando-se fenol/clorofórmio) e diluído a 1:5 (160ng) com diferentes concentrações de MgCl₂ e iniciadores (géis de agarose a 1%).

(A) Linha 1: marcador de peso molecular; linhas 2 a 6 concentrações de MgCl₂ de 1; 1,5; 2, 2,5 e 3,0mM, respectivamente.

(B) Linha 1: marcador de peso molecular; linha 2: 200 e 100pmoles de iniciadores; linha 3: 400 e 200 pmoles de iniciadores; linha 4: controle negativo.

Utilizando-se o protocolo 1, o limite mínimo de detecção viral foi de $7,8 \times 10^3$ ffu correspondendo a 2,5ng de RNA dosado espectrofotometricamente (Figura 14A). Com o protocolo 2, o limite mínimo de detecção viral foi de 30ffu ou 0,01ng de RNA (Figura 14B). A Figura 15 apresenta graficamente os resultados obtidos com os dois distintos protocolos de RT-PCR.

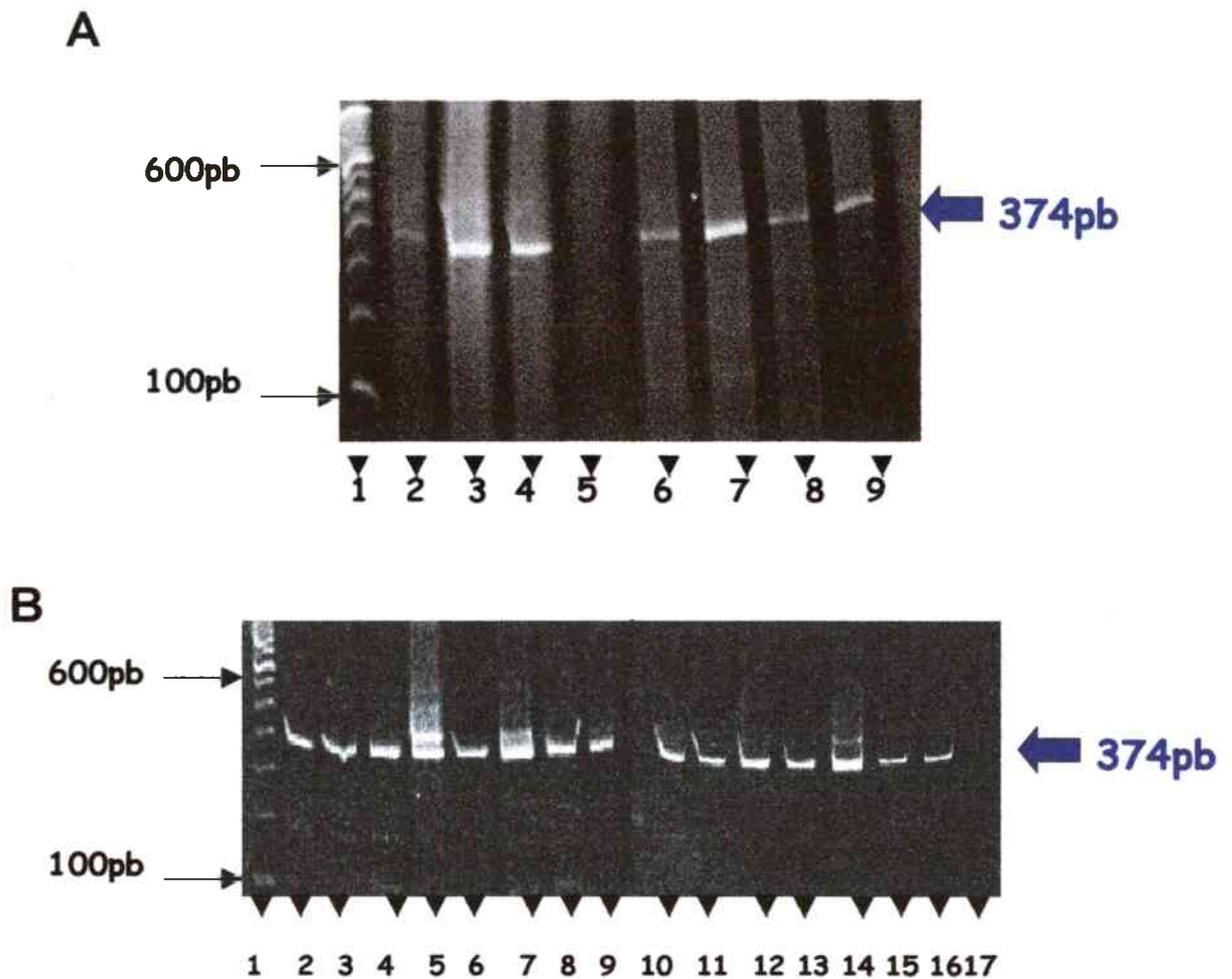
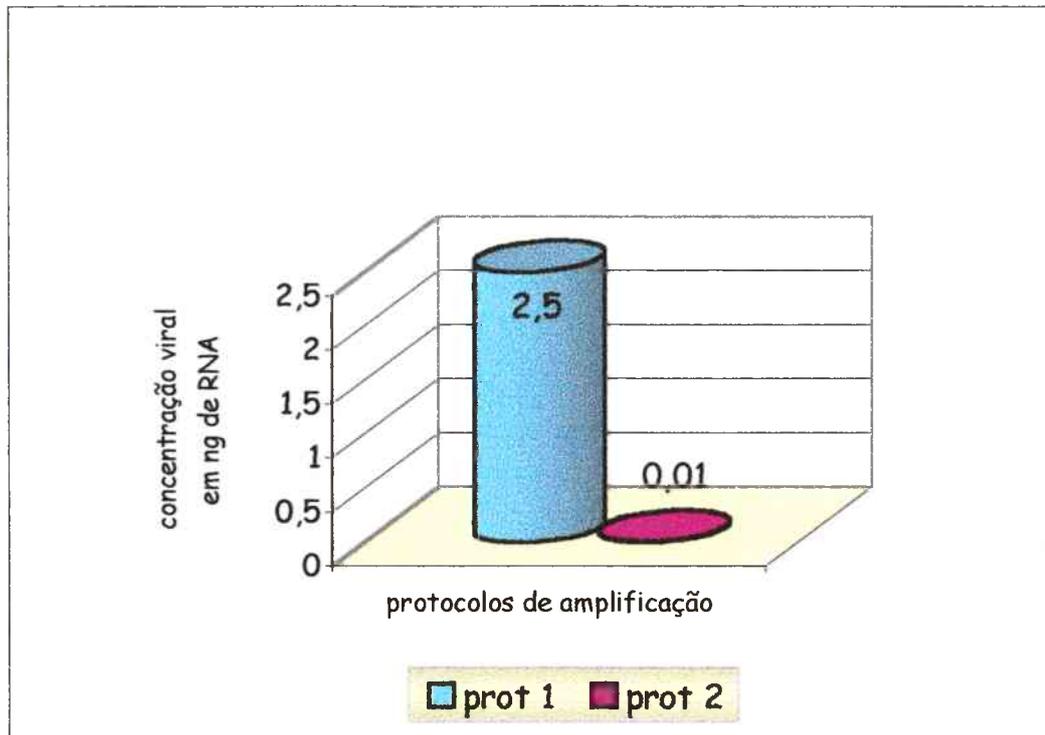


Figura 14 – Produtos da reação de *semi-nested* PCR para o RNA viral extraído do fluido infeccioso e amplificado através de diferentes procedimentos: protocolo 1 (A) e protocolo 2 (B) (géis de poliacrilamida a 10%).

(A) Linha 1: marcador de peso molecular; linhas 2 a 9, diluição seriada do RNA viral correspondendo a 800ng (1×10^6 ffu), 160ng (5×10^5 ffu) 80ng ($2,5 \times 10^5$ ffu) 40ng ($1,25 \times 10^5$ ffu) 20ng ($6,2 \times 10^4$ ffu) 10ng ($3,12 \times 10^4$ ffu) 5ng ($1,56 \times 10^4$ ffu) e 2,5ng ($7,8 \times 10^3$ ffu) de RNA respectivamente.

(B) Linha 1: marcador de peso molecular; linhas 2 a 16, diluição seriada do RNA viral de 160ng (5×10^5 ffu) 80ng ($2,5 \times 10^5$ ffu) 40ng ($1,25 \times 10^5$ ffu) 20ng ($6,2 \times 10^4$ ffu) 10ng ($3,12 \times 10^4$ ffu) 5ng ($1,56 \times 10^4$ ffu); 2,5ng ($7,8 \times 10^3$ ffu); 1,25ng ($3,9 \times 10^3$ ffu); 0,65ng ($1,95 \times 10^3$ ffu); 0,31ng (975ffu); 0,16ng (487ffu); 0,08ng (243ffu); 0,04ng (121ffu); 0,02ng (60,9ffu) e 0,01ng (30,4ffu). Linha 17: controle negativo.



prot. 1 = protocolo 1 (PCR tradicional)
prot. 2 = protocolo 2 (PCR Supermix)

Figura 15 – Limites de detecção viral do RNA extraído do fluido infeccioso do rotavírus símio SA11, através de diferentes protocolos de RT-PCR (protocolos 1 e 2).

4.3.2 Reações de RT-PCR para o RNA viral extraído a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11

4.3.2.1 Comparação entre os procedimentos de extração do RNA viral

O método de extração do RNA do rotavírus obtido a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas foi realizado através de dois procedimentos: fenol/clorofórmio e TRIZOL[®] (item 3.10). Este RNA viral, diluído a 1:5 (160ng) e a 1:40 (20ng) foi transcrito e amplificado através de uma reação de RT-PCR seguida de uma reação de *semi-nested* PCR, utilizando o protocolo 2 (item 3.7.2.2). Os resultados encontram-se apresentados na Figura 16, onde a intensidade do produto amplificado foi similar para ambos os procedimentos de extração. A avaliação dos procedimentos de extração do RNA viral foi realizada para os diferentes extratos tissulares de ostras: A1, A2, B1 e B2 (Figura 8). Em todos esses extratos, a intensidade do produto amplificado foi similar para ambos os procedimentos de extração.

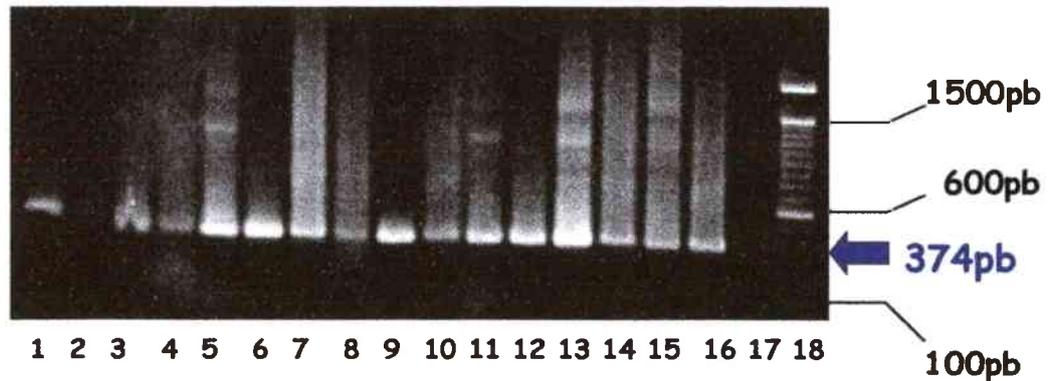


Figura 16 - Produtos da reação de *semi-nested* PCR (protocolo 2 – PCR Supermix) do RNA do rotavírus símio SA11 extraído dos diferentes extratos tissulares de ostras inoculadas experimentalmente, diluído a 1:5 (160ng) e a 1:40 (20ng) e extraído a partir de diferentes procedimentos: fenol/clorofórmio e TRIZOL[®] (géis de agarose a 1%). Linhas 1 e 3 (extrato B1) e 5 e 7 (extrato A1) partindo de 160 e 20ng de RNA, respectivamente, e tratados com TRIZOL[®]; 2 e 4 (extrato B1) e 6 e 8 (extrato A1) partindo de 160 e 20ng de RNA, respectivamente, e tratados com fenol/clorofórmio; 9 e 11 (extrato B2) e 13 e 15 (extrato A2) partindo de 160 e 20ng de RNA, respectivamente, e tratados com TRIZOL[®]; 10 e 12 (extrato B2) e 14 e 16 (extrato A2) partindo de 160 e 20ng de RNA, respectivamente, e tratados com fenol/clorofórmio; 17: controle negativo, 18: marcador de peso molecular.

4.3.2.2 Padronização da concentração ideal de $MgCl_2$

Foi empregado o ensaio de padronização das concentrações ideais de $MgCl_2$ (item 3.11.1) a serem utilizadas nas reações de amplificação do segmento 9 do rotavírus através do protocolo 1 (3.7.2.1). O RNA viral obtido a partir dos diferentes extratos tissulares de ostras: A1, A2, B1 e B2 foram reversamente transcritos e amplificados com as concentrações de 1; 1,5; 2; 2,5 e 3,0mM de $MgCl_2$.

A Figura 17A apresenta os produtos de amplificação do RNA viral extraído dos extratos tissulares de ostras B1 e B2. O RNA viral obtido a partir do extrato B1 foi amplificado somente com as concentrações de 2,5 e 3,0mM de $MgCl_2$, e apresentou intensidades similares para ambos os produtos amplificados. Para o extrato B2, a concentração de 3,0mM de $MgCl_2$ resultou na melhor intensidade do produto amplificado.

Os resultados deste ensaio, usando o RNA viral extraído a partir dos extratos tissulares de ostras A1 e A2, são apresentados na Figura 17B. Para o extrato A1, o RNA foi amplificado somente com as concentrações de 2,5 e 3,0mM de $MgCl_2$; porém, a intensidade dos produtos amplificados com essas concentrações foi diferente. Com a concentração de 3,0mM de $MgCl_2$, a intensidade do produto amplificado foi maior do que com 2,5mM do reagente. Para o extrato A2, foram detectados produtos de amplificação com 1,5; 2; 2,5 e 3,0mM de $MgCl_2$, entretanto, a intensidade do produto foi maior com as três últimas concentrações do reagente.

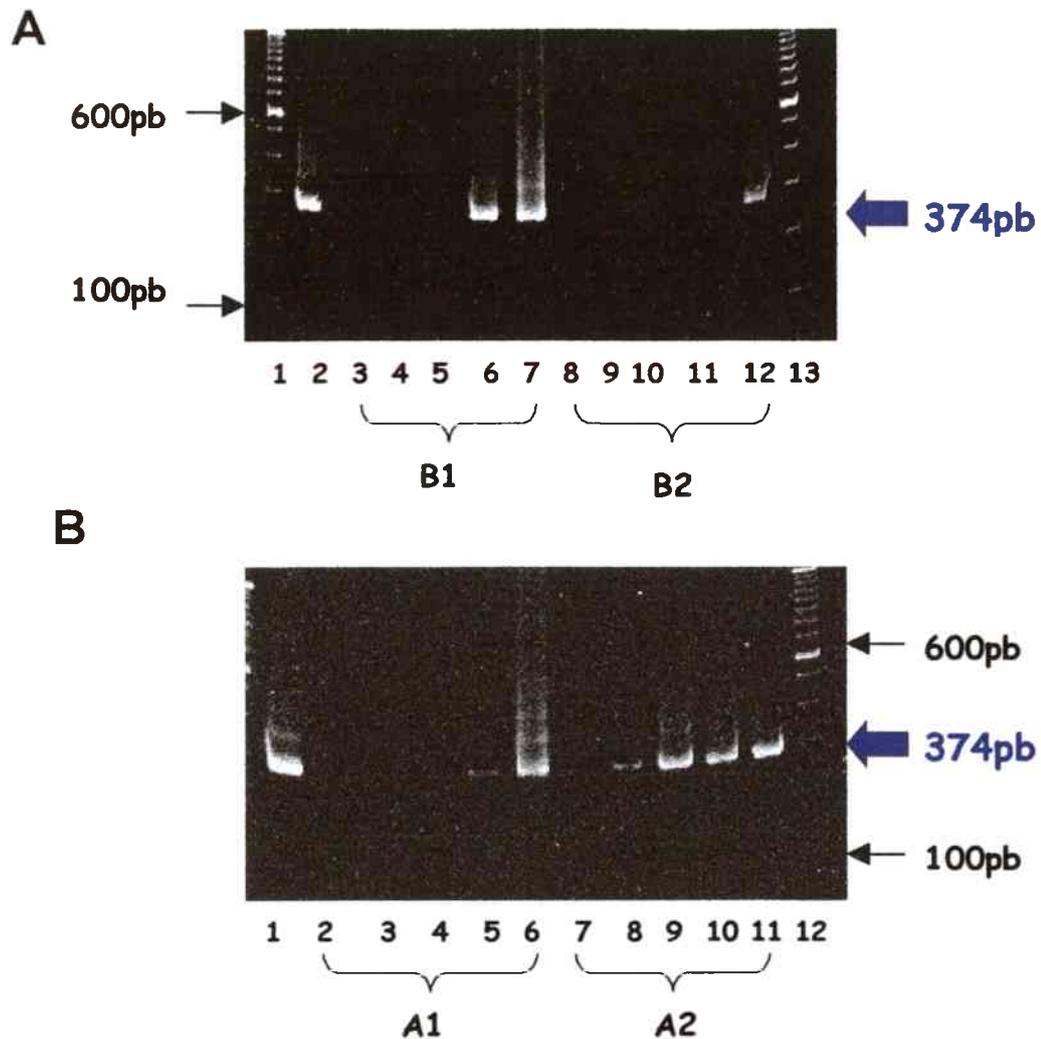


Figura 17 - Produtos da reação de *semi-nested* PCR (protocolo 1- PCR tradicional) do RNA do rotavírus símio SA11 extraído dos extratos tissulares de ostras (géis de poliacrilamida a 10%).

(A) *semi-nested* PCR do RNA viral extraído dos extratos B1 e B2 com diferentes concentrações de $MgCl_2$. Linhas 1 e 13: marcador de peso molecular; linha 2: controle viral (800ng de RNA); linhas 3 a 7: concentrações de $MgCl_2$ de 1; 1,5; 2, 2,5 e 3,0mM, respectivamente para o extrato B1 e linhas 8 a 12 correspondem às mesmas concentrações de $MgCl_2$ para o extrato B2.

(B) *semi-nested* PCR do RNA viral extraído dos extratos A1 e A2 com diferentes concentrações de $MgCl_2$. Linha 12 marcador de peso molecular; linha 1: controle viral (800ng de RNA); linhas 2 a 6: concentrações de $MgCl_2$ de 1; 1,5; 2, 2,5 e 3,0mM, respectivamente para o extrato A1 e linhas 7 a 11 correspondem às mesmas concentrações de $MgCl_2$ para o extrato A2.

4.3.2.3 Limite de detecção do RNA viral

O limite de sensibilidade da amplificação do segmento gênico 9 do rotavírus obtido a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas, foi determinado utilizando-se dois diferentes procedimentos de reação de RT-PCR seguido de uma reação de *semi-nested* PCR: protocolo 1 (PCR tradicional - item 3.7.2.1) e protocolo 2 (PCR Supermix - item 3.7.2.2).

Utilizando-se o protocolo 1, a reação de RT-PCR foi realizada somente para os extratos tissulares de ostras A2 e B2. A Figura 18A apresenta o limite de detecção viral para o extrato A2 (detecção mínima de 312ffu) e a Figura 18B apresenta o limite de detecção para o extrato B2 (detecção mínima de 625ffu).

Utilizando-se o protocolo 2, a reação de RT-PCR foi realizada para todos os extratos tissulares de ostras (A1, A2, B1 e B2). A Figura 19A apresenta o limite de detecção para o extrato B1 (detecção mínima de 1,2ffu) e Figura 19B apresenta o limite de detecção para o extrato A1 (detecção mínima de 0,6ffu). A Figura 19C mostra o limite de detecção para o extrato B2 (detecção mínima de 0,15ffu) e Figura 19D mostra o limite de detecção para o extrato A2 (detecção mínima de 0,03ffu). Nas Figuras 20 e 21 estão representados graficamente os limites de detecção viral obtidos com estes dois protocolos de RT-PCR e com as duas formas de preparação dos extratos.

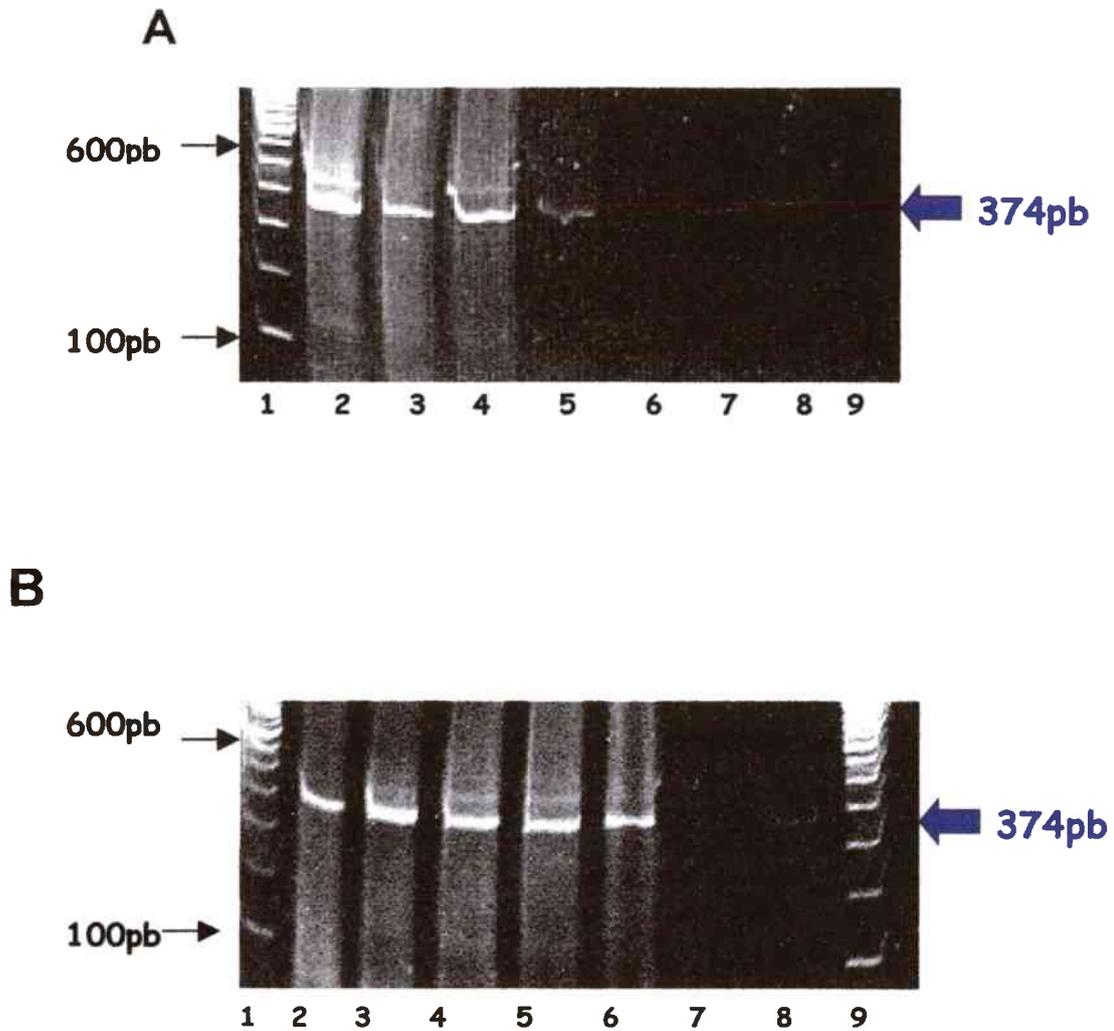
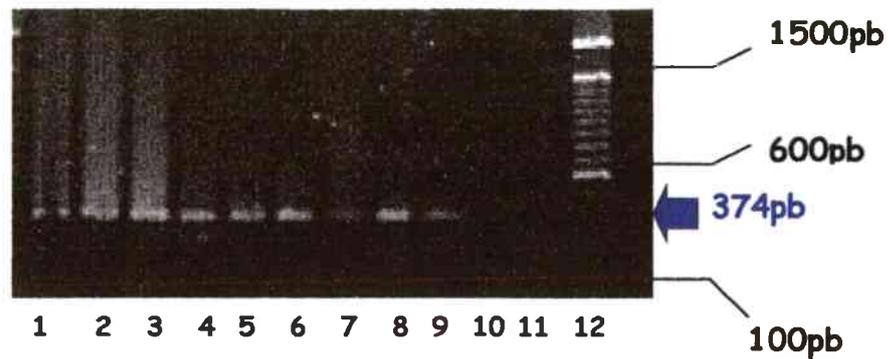


Figura 18 - Produtos de reações de *semi-nested* PCR (protocolo 1- PCR tradicional) do RNA do rotavírus símio SA11 extraído dos extratos tissulares de ostras A2 e B2 (géis de poliacrilamida a 10%).
(A) *Semi-nested* PCR do RNA isolado do extrato A2. Linhas 1: marcador de peso molecular; linhas 2 a 8: diluições seriadas do RNA viral correspondendo desde 2×10^4 até 312ffu respectivamente; linha 9: controle negativo.
(B) *Semi-nested* PCR do RNA isolado do extratos B2. Linha 1 e 9: marcador de peso molecular; linhas 2 a 8: diluições seriadas do RNA viral correspondendo desde $1,6 \times 10^5$ até 625 ffu respectivamente.

A



B

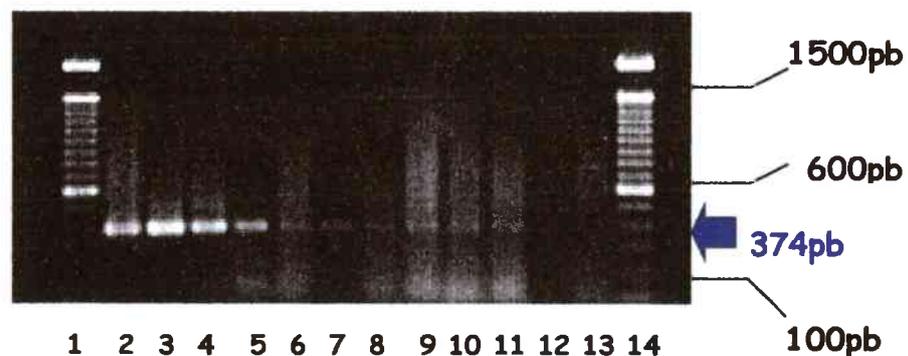
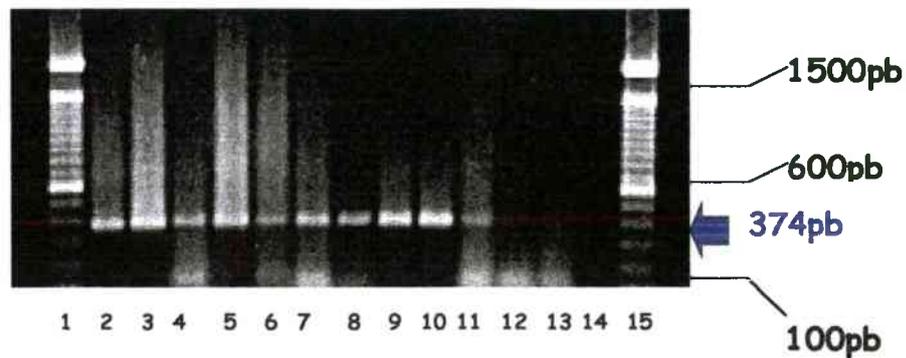


Figura 19 - Produtos da reação de *semi-nested* PCR (protocolo 2 – PCR Supermix) do RNA do rotavírus símio SA11 extraído dos extratos tissulares de ostras A1, A2, B1 e B2 (géis de agarose a 1%).
(A) Limite de detecção do RNA extraído do extrato B1. Linhas 1 a 10: diluições do RNA viral correspondendo desde 1×10^5 até 0,6ffu; linha 11: controle negativo, linha 12: marcador de peso molecular.
(B) Limite de detecção do RNA extraído do extrato A1. Linhas 1 e 14: marcador de peso molecular; linhas 2 a 12: diluições seriadas do RNA viral correspondendo desde 1×10^5 até 0,3ffu, linha 13: controle negativo.

C



D

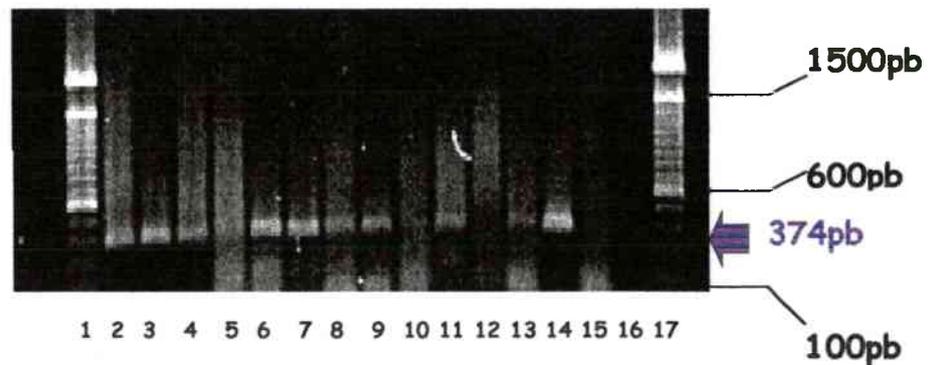


Figura 19 – (cont.)

(C) Limite de detecção do RNA extraído do extrato B2. Linhas 1 e 15, marcador de peso molecular, linhas 2 a 13: diluições seriadas do RNA viral correspondendo desde 1×10^5 até 0,07ffu, linha 14: controle negativo.

(D) Limite de detecção do RNA extraído do extrato A2. Linhas 1 e 17: marcador de peso molecular; linhas 2 a 15: diluições seriadas do RNA viral correspondendo desde 1×10^5 até 0,015ffu, linha 16: controle negativo.

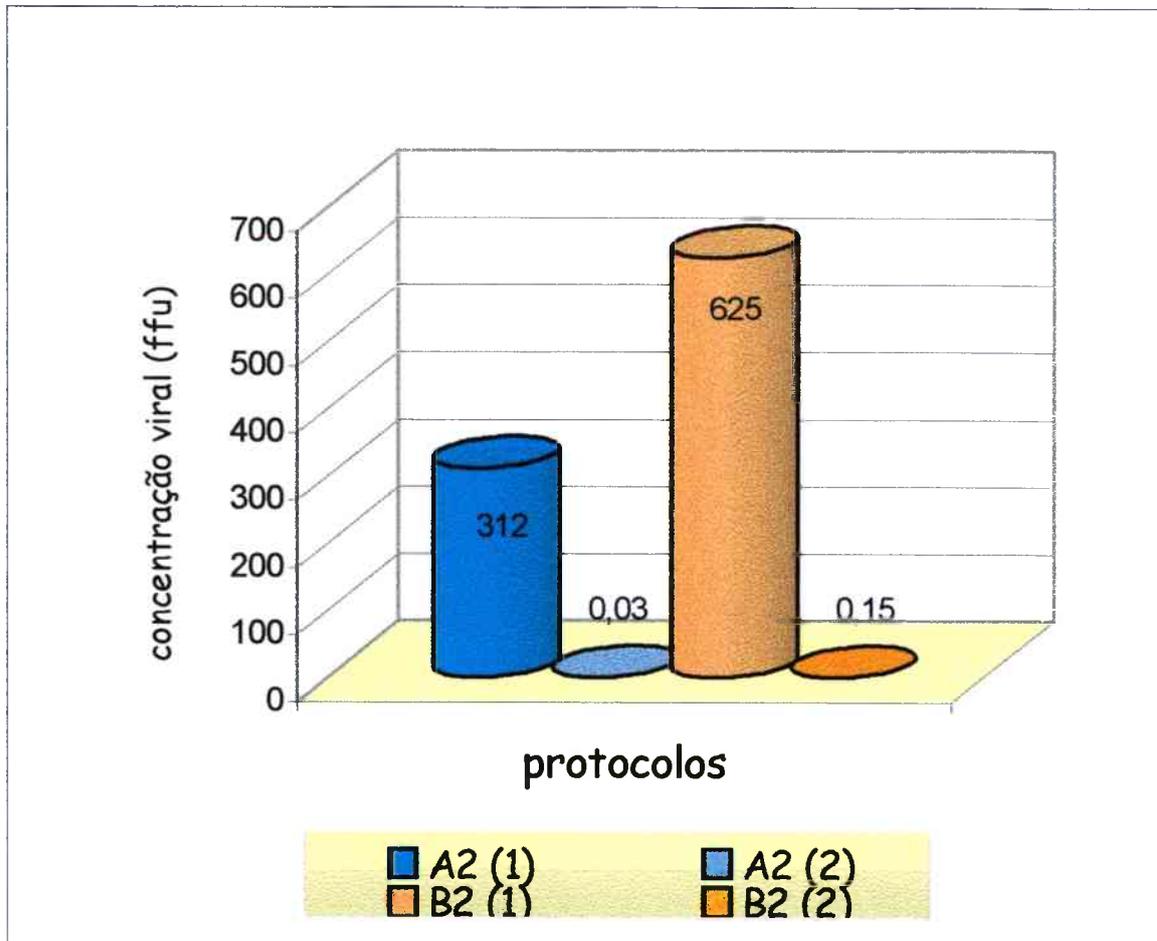


Figura 20 – Comparação entre os resultados da determinação dos limites de detecção viral para os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11 (A2 e B2), que foram obtidos através de dois diferentes protocolos de reações de RT-PCR: protocolos 1(PCR tradicional) e 2(PCR Supermix).

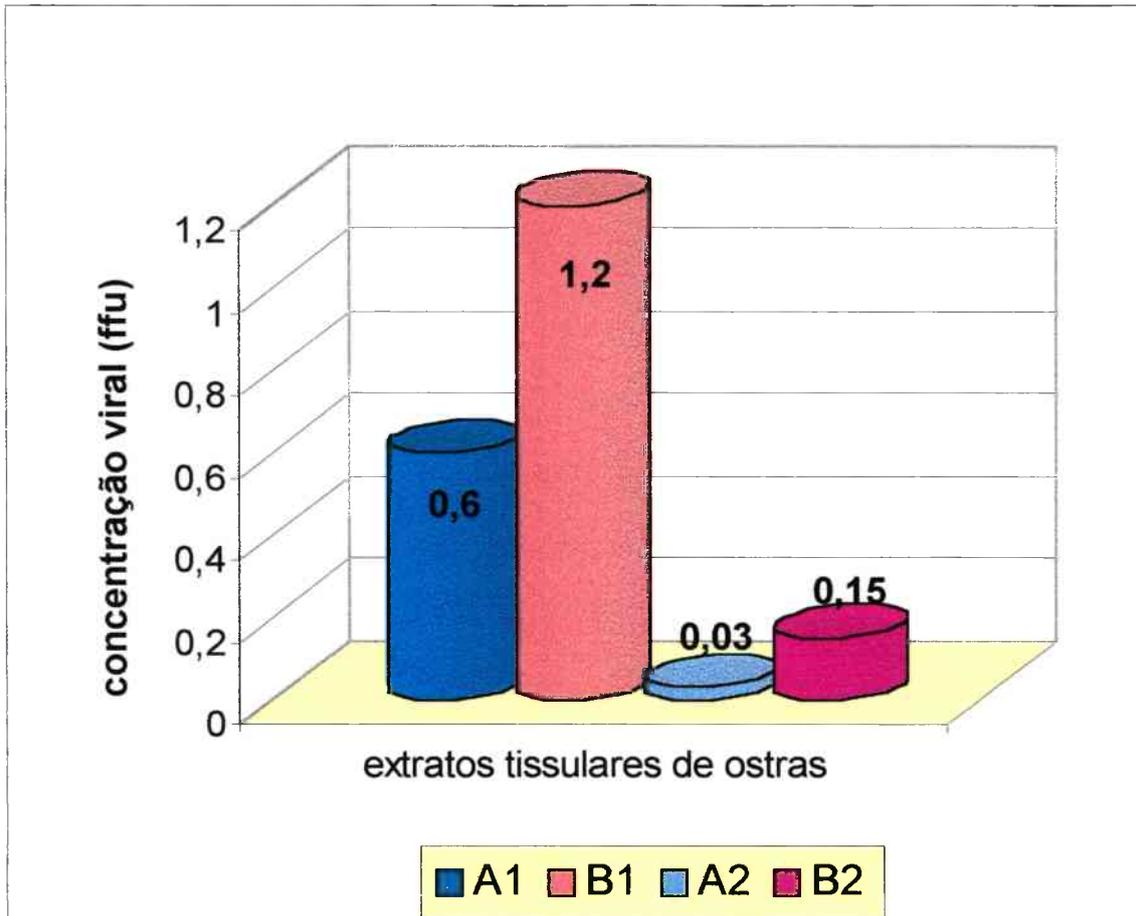


Figura 21 – Comparação entre os resultados da determinação dos limites de detecção viral através da reação de *semi-nested* PCR (protocolo 2) para os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11 (A1, A2, B1 e B2), que foram obtidos através de um processo de preparação simplificado (A2 e B2) e de um protocolo envolvendo uma etapa adicional de centrifugação (A1 e B1).

4.5 Citotoxicidade do extrato tissular de ostras não inoculadas com rotavírus

A avaliação da toxicidade do Extrato Negativo (ou extrato tissular de ostras sadias, não inoculadas com rotavírus) em células MA104 foi realizada de acordo com o item 3.12, em quadruplicata. Neste ensaio, foram feitas observações semi-quantitativas das alterações morfológicas celulares, para cada diluição do Extrato Negativo e em diferentes períodos de incubação: 24, 48 e 72h (dados não mostrados). Essas observações foram transformadas em valores quantitativos, de acordo com a Tabela 5, sendo obtidos os valores de média e desvio padrão para cada amostra (Tabela 6).

A partir da diluição 1:64, o Extrato Negativo não apresentou toxicidade para as células, em 24h de incubação. Com a diluição 1:32 e no mesmo tempo de incubação, o extrato apresentou baixa toxicidade para as células.

Após 48h de incubação, o extrato diluído 1:32 apresentou maior toxicidade do que as diluições subsequentes e do que as observações realizadas em 24h. Também em 48h, o extrato demonstrou baixa toxicidade para as células a partir da diluição 1:64.

Após 72h de incubação, o extrato diluído 1:32 apresentou-se mais tóxico do que nos períodos de incubação anteriores. A partir dessa diluição, a toxicidade celular reduziu, porém apresentou-se maior do que nos períodos de incubação anteriores (24 e 48h) (Figura 22).

Em vista dos resultados obtidos, a diluição 1:32 do Extrato Negativo foi considerada a diluição limite não citotóxica, sendo que para o ensaio subsequente

de citopatogenicidade dos extratos inoculados com rotavírus, foram utilizadas diluições a partir dessa.

Tabela 6 - Avaliação quantitativa da citotoxicidade em células MA104, do extrato tissular de ostras não inoculadas com o rotavírus símio SA11 (Extrato Negativo) após 24, 48 e 72h de incubação e em diferentes diluições.

Diluições do Extrato Negativo	Avaliação quantitativa em 24h*	Avaliação quantitativa em 48h*	Avaliação quantitativa em 72h*
Puro	4,75±0,5	4,75±0,43	5±0
1:2	4,75±0	4,5±0,5	5±0
1:4	2,75±0,5	4,75±0,43	5±0
1:8	2,5±0,5	4,75±0,43	5±0
1:16	2±0	4,75±0,43	5±0
1:32	1,25±0,43	2,75±0,43	4±0
1:64	0	1,25±0,43	3±0
1:128	0	1±0	2,75±0,43
1:256	0	1±0	3±0
1:500	0	1±0	3±0
1:1000	0	1±0	2,75±0,43

*Os valores apresentados acima referem-se a média de quatro repetições ± o valor respectivo do desvio padrão.

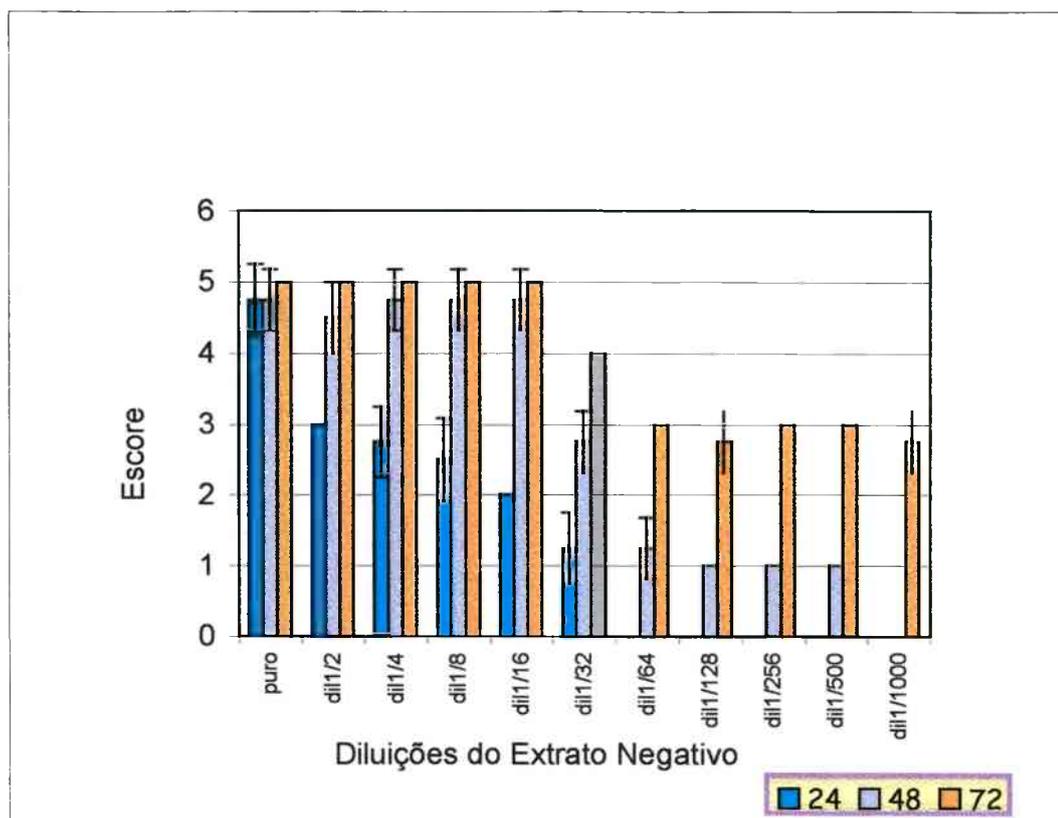


Figura 22 – Avaliação quantitativa da citotoxicidade em células MA104, do extrato tissular de ostras não inoculadas com rotavírus (Extrato Negativo), após 24, 48 e 72h de incubação e em diferentes diluições. Todas as leituras foram realizadas em quadruplicata.

4.6 Ensaio de recuperação viral a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus símio SA11, através de imunofluorescência indireta.

Os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus (A2 e B2) e previamente tratados com 10 μ g/ml de tripsina, foram diluídos seriadamente e incubados com células MA104, de acordo com o item 3.14. Este ensaio visou avaliar através de IFA, a recuperação viral após a preparação dos extratos. A Tabela 7 apresenta os resultados iniciais obtidos neste ensaio, no qual é comparado o número de células infectadas para ambos os extratos tissulares de ostras A2 e B2, e mostra os percentuais de recuperação viral em cada extrato, em diferentes diluições, considerando como referência de 100% de recuperação viral os extratos semeados com vírus ao final do processo de preparação do extrato. O maior percentual de recuperação obtido foi com o extrato diluído a 1:200, porém considera-se este valor de 11,3% muito baixo, indicando que a taxa de recuperação viral foi pequena através deste método. Analisando o desvio padrão para cada diluição do extrato, observa-se que não houve uma distribuição homogênea para a quantificação das células infectadas. Entretanto, comparando-se o número de células infectadas do controle virai com o número inicial de vírus adicionado à monocamada celular, observa-se que esse número (159) também é baixo. Em vista destes resultados insatisfatórios, testou-se a citotoxicidade do extrato tissular de ostras em pequenas câmaras, através da inoculação dos extratos A1 e A2, tratados com a mesma concentração de tripsina acima mencionada e diluídos seriadamente a 1:50; 1:100, 1:200 e 1:400. As diferenças metodológicas na preparação dos dois extratos pode ser observada na Figura 8,

onde o extrato A1 recebeu uma etapa adicional de centrifugação, sendo desta forma, considerado eventualmente menos tóxico para as células. Os resultados deste segundo ensaio estão apresentados na Tabela 8 na qual pode-se observar que com o extrato A1 o número de células infectadas foi maior do que com o extrato A2, em todas as diluições dos extratos, com exceção da diluição 1:400. Somente nessa diluição, o número de células infectadas foi maior para o extrato A2. Porém, para o extrato B2, observa-se uma maior homogeneidade no número de células infectadas para as repetições (menor desvio padrão).

Tabela 7 – Número de células infectadas (ffu) e recuperação viral a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11 (A2 e B2) obtidos através do ensaio de IFA.

Diluição do extrato e do CV	Concentração viral inicial (ffu)	Nº de células infectadas (ffu) Extrato B2	Nº de células infectadas (ffu) Extrato A2	Nº de células infectadas(ffu) CV	% de recuperação viral
1:50	2x10 ⁵	4,66±1,52*	101±67,80*	191	1,58
1:100	1x10 ⁵	4,33±1,52*	66±58,07*	993	6,50
1:200	5x10 ⁴	12,66±8,14*	106,3±107,30*	159	11,30

CV= controle viral; *= valor médio de três repetições e desvio padrão, respectivamente

Tabela 8 - Número de células infectadas obtidas através do ensaio de IFA para os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus símio SA11 (A1 e A2), que foram obtidos através do processo simplificado de preparação do extrato (A2) e de um protocolo envolvendo uma etapa adicional de centrifugação (A1).

Diluição do extrato e do CV	Concentração viral inicial (ffu)	Nº de células infectadas (ffu) Extrato A1	Nº de células infectadas (ffu) Extrato A2
1:50	2x10 ⁵	221**	121**
1:100	1x10 ⁵	219**	89**
1:200	5x10 ⁴	274**	165**
1:400	2,5x10 ⁴	111**	168**

CV= controle viral, **= valor médio de duas repetições

Posteriormente, foi realizado um terceiro ensaio, reduzindo-se a concentração de tripsina para 5 μ g/ml e novamente inoculando-se a monocamada celular com os extratos tissulares de ostras A1 e B1 (ambos foram centrifugados ao final do processo de preparação do extrato), diluídos seriadamente a 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400, num período de incubação de 72h. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos através desse ensaio. Não foram obtidas células infectadas para o extrato B1, indicando uma péssima recuperação viral. O número de células infectadas para o extrato A1 foi menor do que o encontrado no primeiro ensaio (Tabela 7) (extrato B2), com exceção da diluição 1:400. Nessa, o número de células infectadas foi maior com o extrato A1 do que com o extrato A2 (primeiro ensaio). Porém, o número de células infectadas no controle viral foi maior do que o encontrado no primeiro ensaio.

Tabela 9 - Número de células infectadas e recuperação viral a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11 (A1 e B1) obtidos através do ensaio de IFA .

Diluição do extrato ou CV	Concentração virai inicial (ffu)	Nº de células infectadas - extrato A1	Nº de células infectadas - extrato B1	Nº de células infectadas CV	% de recuperação viral
1:50	2x10 ⁵	20,66±17,92*	0*	191	0
1:100	1x10 ⁵	41,66±72,16*	0*	993	0
1:200	5x10 ⁴	11,33±19,62*	0*	159	0
1:400	2,5x10 ⁴	82,33±91,59*	0*	17	0

CV= controle viral; *= valor médio de três repetições e desvio padrão, respectivamente

4.7 Recuperação viral a partir do ensaio de citopatogenicidade dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com rotavírus (A.2 e B.2)

O ensaio de citopatogenicidade foi realizado de acordo com o item 3.13, sendo que os resultados foram obtidos através de observações das alterações morfológicas celulares provocadas pela infecção viral. Para cada período de incubação (24, 48 e 72h) foram realizadas quatro observações semi-quantitativas para cada diluição dos extratos (dados não mostrados). Essas foram posteriormente transformadas em valores quantitativos, visando a realização de uma análise estatística (Tabela 10).

A partir dos valores quantitativos, foi realizada uma análise da variância (ANOVA) monofatorial para 48 e 72h de incubação (Tabela 11), seguida do teste de TUKEY, ao nível de 5% de significância. Para 24h de incubação não foi realizada análise estatística alguma, pois nesse período de incubação não foram detectadas alterações morfológicas celulares. Entretanto, para os períodos de 48 e 72h, a análise da variância indicou que os tratamentos foram significativamente diferentes, ao nível de 5% de significância (indicado pelo F-teste). O teste de TUKEY, usado para ambos os períodos de incubação, indicou diferenças significativas somente entre as diluições de cada extrato. Entretanto, os extratos A2 e B2 não apresentaram diferenças significativas entre si, quando comparados numa mesma diluição (Tabela 10). Desta forma, através deste ensaio pode-se inferir que a recuperação viral foi de aproximadamente 100%, pois não ocorreram diferenças significativas entre os dois extratos, ao nível de 5% de significância.

Tabela 10 – Quantificação das alterações morfológicas celulares (células MA104) após 48 e 72h de incubação com os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11 (A2 e B2), diluídos seriadamente.

Diluições dos extratos	48h		72h	
	Extrato A.2	Extrato B.2	Extrato A.2	Extrato B.2
1:32	2,5±0,57	2,25±0,5	3,5±0,57	3,5±0,57
1:64	2,0±0,81	1,75±0,5	3,25±0,5	3,25±0,5
1:128	2,25±0,5	1,75±0,5	3,5±0,57	3,25±0,95
1:256	1,75±0,5	1,25±0,5	2,75±0,5	3,0±0,81
1:500	2,0±0,0	1,0±0,0	3,0±0,0	2,5±0,57
1:1000	1,0±0,0	1,0±0,0	2,0±0,0	2,25±0,5

Os valores apresentados acima referem-se a média de quatro repetições \pm o valor respectivo do desvio padrão.

Tabela 11 - Análise das variâncias (ANOVA) dos resultados quantitativos das alterações morfológicas celulares (células MA104) após 48h (A) e 72h (B) de incubação com os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11 (A2 e B2).

(A) 48h de incubação

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste
Entre grupos (e)	12,42	11	1,13	5,42*
Dentro dos grupos (d)	7,5	36	0,21	
Total	19,92	47		

SQ = soma de quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrados médios, F-teste= QMe/QMd; * diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

(B) 72h de incubação

Fontes de variação	SQ	GL	QM	F-teste
Entre grupos (e)	11,22	11	1,03	3,13*
Dentro dos grupos (d)	11,75	36	0,33	
Total	22,98	47		

SQ = soma de quadrados; GL= graus de liberdade; QM= quadrados médios, F-teste= QMe/QMd; * diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos no teste de TUKEY realizado separadamente para cada período de incubação, com a finalidade de avaliar similaridades ou diferenças entre as médias dos tratamentos. Entre os pares de tratamentos A1 e B1, A2 e B2, A3 e B3, A4 e B4, A5 e B5, A6 e B6, para ambos os períodos de incubação 48 e 72h, não foram observadas diferenças significativas. Aqui, os tratamentos A e B referem-se aos valores obtidos, respectivamente, com os extratos A2 e B2 (Figura 7) sendo que a numeração de 1 a 6 é indicativa das diluições seriadas dos extratos, ou seja, de 1:32 ($1,56 \times 10^4$ ffu) até 1:1000 (488ffu). Entre as diferentes diluições dos extratos foram observadas diferenças significativas, mas isto parece um tanto óbvio, já que as diluições iniciais apresentam uma maior quantidade de partículas virais do que as finais. Procurando atingir um dos objetivos deste trabalho, foram analisadas somente diferenças ou similaridades entre os dois tipos de extratos A2 e B2, não tendo sido realizada avaliação alguma com relação às diferenças entre as diluições dos extratos.

Tabela 12 – Avaliação estatística , através do teste de TUKEY, dos valores médios das observações das alterações morfológicas celulares (células MA104), após 48 (A) e 72h (B) de incubação com os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus símio SA11 (A2 e B2), diluídos seriadamente.

(A) 48h de incubação

Extrato	Diluições	Médias	Separação de médias
A2	1:1000	1,0	X
B2	1:1000	1,0	X
B2	1:500	1,0	X
B2	1:256	1,25	XX
B2	1:128	1,75	XXX
A2	1:256	1,75	XXX
B2	1:64	1,75	XXX
A2	1:500	2,0	XXX
A2	1:64	2,0	XXX
B2	1:32	2,25	XX
A2	1:128	2,25	XX
A2	1:32	2,5	X

Todas as observações foram realizadas em quadruplicata. $p < 0,05$

(B) 72h de incubação

Extratos	Diluições	Médias	Separação de médias
A2	1:1000	2,0	X
B2	1:1000	2,25	XX
B2	1:500	2,5	XX
A2	1:256	2,75	XX
A2	1:500	3,0	XX
B2	1:256	3,0	XX
B2	1:128	3,25	XX
A2	1:64	3,25	XX
B2	1:64	3,25	XX
A2	1:32	3,5	X
A2	1:128	3,5	X
B2	1:32	3,5	X

Todas as observações foram realizadas em quadruplicata. $p < 0,05$

5. DISCUSSÃO

Os trabalhos iniciais realizados para o isolamento de vírus a partir de amostras ambientais, tais como moluscos e águas, foram bastante limitados em precisão, visto a falta de técnicas quantitativas confiáveis nessa época (GERBA & GOYAL, 1978).

Os métodos envolviam, principalmente, técnicas de cultura celular, na qual a presença dos vírus era detectada através da observação do efeito citopático (ECP) viral nas células infectadas. O ECP pode ser definido como o dano celular resultante da infecção pelo vírus às células, sendo visualizado através de alterações da morfologia celular, tais como arredondamento de células originalmente fibrosas, formação de vacúolos ou granulosidades celulares, entre outros (WHITE & FENNER, 1994). Esses efeitos demonstram que os vírus utilizam gradualmente a maquinaria celular durante seu processo de replicação (BURLESON, CHAMBERS, WIEDBRAUK, 1992).

Entretanto, além do tempo extensivo consumido com estes métodos, as amostras ambientais contêm substâncias tóxicas para as células, causando danos morfológicos, o que diminui a viabilidade de utilização dos mesmos (HEJKAL, GERBA, RAO, 1982; HURST & GOYKE, 1983). Segundo NARDONE (1977), a citotoxicidade é definida como "...as alterações na homeostase celular, afetando a habilidade das células em adaptar-se, sobreviver, reproduzir-se ou desenvolver suas funções especializadas", podendo ser observada através de alterações na morfologia celular (STREISSLE, SCHWOBEL, HEWLETT, 1981). Diversos autores

têm relatado a presença de toxicidade nos extratos obtidos de moluscos bivalves (LARKIN & METCALF, 1980; METCALF, MOULTON, ECKERSON, 1980; CLIVER, ELLENDER, SOBSEY, 1983; TIERNEY et al., 1980; RICHARDS, BEMISS, SAMPLE, 1988). Muitos esforços têm sido realizados na tentativa de eliminar esses produtos tóxicos pela filtração das amostras através de cromatografias em colunas de Sephadex ou Chelex (BERIL, BOHER, SCWARTZBROD, 1991; REYNOLDS, GERBA, PEPPER, 1995), pela diluição simplificada das amostras antes de adicioná-las nas culturas celulares ou pelo tratamento com solventes orgânicos tipo Freon, entre outros (HEJKAL, GERBA, RAO, 1982; HURST & GOYKE, 1983, BARARDI et al., 1999).

O presente trabalho objetivou comparar métodos de cultivo celular, que apresentam a vantagem de detectar partículas virais viáveis em amostras ambientais, com métodos moleculares que são mais sensíveis à detecção de contaminações patogênicas nessas amostras. No primeiro momento, serão discutidos os resultados obtidos com os ensaios de cultura de células MA104 e, em seguida, serão discutidos os resultados obtidos pela utilização da técnica de RT-PCR.

5.1 ENSAIOS ENVOLVENDO CULTURA DE CÉLULAS MA104

Para a produção dos estoques de rotavírus símio SA11 utilizados neste trabalho, bem como para os experimentos de titulação viral por imunofluorescência e os estudos da recuperação viral por ensaios de citopatogenicidade, foram utilizadas células MA104, permissivas à infecção *in vitro* pelo rotavírus. Para a produção das subculturas, as células foram tratadas com

tripsina (1:250, Sigma), enzima proteolítica, que cataliza as reações de quebra da cadeia polipeptídica, e tem a função de promover o desagregamento da monocamada celular (FRESHNEY, 1986; MORASCA & ERBA, 1986; BURLESON et al., 1992). A concentração de CO₂ é importante para manutenção do pH do meio de cultura (que deve permanecer entre 7,2 e 7,4), principalmente quando o sistema tampão HCO₃/CO₂ é utilizado. Os frascos de cultura não são hermeticamente fechados e, portanto, encontram-se sujeitos a pressão do CO₂ atmosférico. Desta forma, a introdução do tampão HEPES auxilia a estabilização do pH do meio de cultura (GRIFFITHS, 1986). A adição de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura tem o propósito de nutrir as células. Esse é uma mistura complexa de biomoléculas, incluindo fatores hormonais, que favorecem o crescimento celular (MAURER, 1986; WALUM, STENBERG, JENSSEN, 1990).

Os fluidos infecciosos do rotavírus símio SA11 (G3) foram produzidos na presença de 10µg/ml de tripsina. A ação da tripsina sobre a infecção viral foi documentada por ESPEJO et al. (1981) e por ESTES et al. (1981), que relacionaram o aumento da infectividade do rotavírus à clivagem da proteína VP4, em duas outras proteínas VP5 e VP8. As sequências que flanqueiam os sítios de clivagem da tripsina (aminoácidos 224 a 235 e 257 a 271) são relativamente conservados em diferentes cepas virais (LOPEZ et al., 1985; GORZIGLIA et al., 1988). Quando a monocamada celular é infectada com uma determinada quantidade de vírions, sua progênie aumenta de forma a infectar todas as células da cultura e o ECP pode ser observado microscopicamente (WHITE & FENNER,

1994). A Figura 6 mostra a morfologia característica das células MA104 normais (A) e infectadas pelo rotavírus, 24 h após a infecção(B).

Para ensaios de titulação virai, diversos anticorpos monoclonais anti-rotavírus têm sido gerados e caracterizados, dirigidos contra as proteínas de superfície viral dos rotavírus do grupo A (HOSHINO & KAPIKIAN, 1994). O anticorpo monoclonal M60 aqui utilizado, reconhece cepas de rotavírus do grupo A sorotipos 1 a 4 (SHAW et al., 1986) e apresenta alta afinidade para a glicoproteína VP7 dos rotavírus.

O título viral infeccioso é definido como o número de partículas virais capazes de infectar células permissivas (BURLESON et al., 1992). Tanto para os ensaios de titulação viral quanto para os ensaios de verificação da recuperação viral a partir dos extratos de ostras inoculadas pelo rotavírus, utilizou-se o ensaio de imunofluorescência indireta. Utilizando-se o anticorpo monoclonal M60 foi possível visualizar marcadamente a existência de uma proteína reativa, a glicoproteína VP7 (Figura 11A), através da fluorescência citoplasmática nas células infectadas. O reconhecimento da glicoproteína VP7 pelo Mab60 também foi observado por BARARDI et al. (1998). A utilização desse anticorpo ainda traz a vantagem de apresentar baixa fluorescência de fundo em células não infectadas (Figura 11B).

Com relação aos extratos de ostras, realizaram-se ensaios de citotoxicidade para determinar o grau de toxicidade dos mesmos inicialmente com o Extrato Negativo (extrato tissular de ostras não inoculadas com rotavírus). Diluições desse extrato foram incubadas com células MA104 durante 24, 48 e 72h, tendo sido observadas alterações morfológicas celulares devido a toxicidade do mesmo.

Como observado na Tabela 6 e na Figura 22 (item 4) e de acordo com a Tabela 5 (item 3), após 24h de incubação, observou-se um certo grau de alteração na morfologia celular, avaliado entre 10 e 30% (entre uma e duas cruzes) para a diluição 1:32, sendo que este percentual, foi similar ao encontrado por BARARDI et al. (1999). Entretanto, esses autores utilizaram um extrato tissular de ostras, purificado através de uma etapa final de centrifugação em alta velocidade (10.000Xg). Nessa dissertação foi testada a citotoxicidade do extrato tissular de ostras sadias, sem este passo final de centrifugação (Figura 8). Desta forma, de acordo com os resultados obtidos, a simplificação do protocolo descrito na literatura não provocou o aumento da citotoxicidade do extrato. O próximo passo foi verificar se a simplificação do protocolo de obtenção do extrato iria influir na recuperação viral.

Para o estudo da recuperação viral, utilizou-se inicialmente o ensaio de imunofluorescência indireta, e testou-se duas possibilidades de preparação dos extratos tissulares de ostras: extrato tissular de ostras com a etapa final de centrifugação (B1), teoricamente menos tóxico para as células, e extrato tissular de ostras preparado de modo simplificado (B2) suprimindo-se a etapa final de centrifugação, com os devidos controles de recuperação viral de 100% para ambos os métodos (A1 e A2, respectivamente) e o controle negativo de extratos tissulares de ostras não inoculadas com rotavírus (extrato negativo). A princípio, esse ensaio forneceria uma ótima indicação da recuperação de partículas virais viáveis. Entretanto, os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 9 demonstraram que esse não foi satisfatório no estudo da recuperação viral. Como os extratos (em diluições não citotóxicas) necessitavam ser incubados por 48h nas células

MA104, que, por sua vez, haviam sido cultivadas por 48h antes da infecção, ao final de todo o período (96h), as células encontravam-se em situação muito precária e descolavam das câmaras de imunofluorescência com muita facilidade, mesmo nos controles negativos. Sendo assim, considerou-se que o número de células fluorescentes, contabilizado ao microscópio de epifluorescência, não condizia com a real quantidade de vírus presente na amostra, já que a monocamada celular divergia aleatoriamente, independente da diluição do extrato ou da concentração viral. Com o objetivo de otimizar este ensaio, diminuiu-se a concentração de tripsina no meio de infecção para 5µg/ml. Esse teste adicional foi realizado porque a própria tripsina, imprescindível no meio para promover a infectividade do rotavírus, já altera a morfologia celular, muitas vezes mimetizando um efeito citopático. Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que, apesar de terem sido encontradas células fluorescentes nos extratos controle (A1 e A2), não foi possível contar um número razoável de células fluorescentes nos extratos experimentais (B1 e B2) (Tabelas 7 e 9), o que forneceu a primeira evidência de que a recuperação viral havia sido próxima de zero.

Sendo assim, utilizou-se outra estratégia para o estudo da recuperação viral através de células MA104 cultivadas em placas de 24 poços, que, apresentando uma superfície maior, resultava em células melhor aderidas e mais resistentes ao processo de incubação com os extratos. O estudo baseou-se na verificação do ECP provocado pelo vírus presente nos extratos, que foram preparados segundo o protocolo simplificado (A2 e B2), com os devidos controles positivo e negativo. Esses ensaios visaram então comparar os dois tipos de extratos tissulares de

ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus (A2 e B2) e verificar a recuperação viral após a preparação dos mesmos. Os resultados das observações das alterações morfológicas celulares foram analisados estatisticamente pela ANOVA e TUKEY (Tabelas 10, 11 e 12), através dos quais os extratos controle (extrato A ou 100% de recuperação) e experimental (extrato B), não diferiram entre si, ao nível de 5% de significância, indicando uma excelente recuperação viral.

5.2 ENSAIOS ENVOLVENDO O RNA VIRAL

No final da década de 70, com o advento das técnicas de biologia molecular, foram desenvolvidas metodologias alternativas visando aumentar a sensibilidade de detecção de vírus a partir de amostras ambientais.

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a detecção de seqüências gênicas de microrganismos, aprimorou a possibilidade de avaliação da presença de vírus entéricos no meio ambiente (ABBASZADEGAN et al., 1993; 1999; ATMAR et al., 1993; JAYKUS, De LEON, SOBSEY, 1993, 1996; GOUVEA et al., 1994a; LEES et al., 1994; Le GUYADER et al., 1994;1996; LEES et al., 1995; TSAI, TRAN, PALMER, 1995; HAFLIGER et al., 1997; HENSHILWOOD, et al., 1998; TRAORE et al., 1998; BARARDI et al., 1999; SUÑÉN & SOBSEY, 1999). Entretanto, a sensibilidade da reação de PCR é diminuída para amostras de composição complexa, tais como os tecidos dos moluscos, que podem apresentar substâncias capazes de interferir no sistema enzimático utilizado na reação, inibindo o processo de amplificação ou promovendo toxicidade às polimerases (WILDE, EIDEN, YOLKEN, 1990; JIANG et

al., 1992; METCALF et al., 1995; SCHWABB, De LEON, SOBSEY, 1995). Os inibidores da reação de PCR são substâncias de natureza diversa, incluindo proteínas (GOUVEA et al., 1990), sais, traços de detergentes (SDS) ou fenol (BEUTLER, GELBART, KULH, 1990) e resíduos do processo de extração. Outras substâncias mais específicas, tais como bilirrubina e sais biliares presentes nas fezes ou polissacarídeos presentes nos tecidos de moluscos têm sido identificadas como inibitórias para a reação de PCR (WILSON, 1997). Desta forma, torna-se necessária a utilização de protocolos que visem eliminar ou minimizar a interferência desses inibidores.

Outra limitação da reação de PCR é a falta de diferenciação entre as partículas virais amplificadas, em suas formas viáveis e não viáveis (REYNOLDS et al., 1995). Assim, a melhor alternativa para a detecção de vírus em amostras ambientais seria um método combinado de cultura celular, a partir da qual seria definida a concentração de partículas virais viáveis, e de técnicas moleculares, que aumentam a sensibilidade da detecção viral.

O primeiro passo a ser realizado para a detecção de vírus em moluscos é a preparação de um extrato (homogeneizado) a partir dos tecidos do animal, que deve apresentar além de boa recuperação viral, baixa toxicidade para as células. Segundo BOUHRITI & GOYAL (1993), os métodos de extração viral consistem basicamente em dois tipos: métodos onde não ocorre a concentração viral, nos quais a extração viral é feita diretamente a partir dos tecidos do molusco com éter etílico, clorofórmio ou Freon, e métodos que envolvem a concentração viral. Esse último consta de etapas consecutivas onde os vírus são separados dos tecidos do molusco e, posteriormente, concentrados num pequeno volume.

Ainda com relação aos métodos de concentração, os procedimentos inicialmente realizados constam de precipitação ácida, floculação polieletrólítica com Cat-Floc, adsorção-eluição-precipitação ou eluição direta sem adsorção viral a partir dos extratos tissulares dos moluscos (GERBA, 1987). A eluição alcalina foi utilizada por LEES et al. (1994, 1995) e LEWIS & METCALF (1988). SOBSEY, CARRICK, JENSEN (1978) observaram que os vírus podem ser separados dos sólidos presentes nos extratos tissulares dos moluscos quando as concentrações de sais e o pH são controlados. Diferentes eluentes contendo glicina, extrato de carne ou outros componentes têm sido comparados com a finalidade de determinar a melhor recuperação viral (LEWIS & METCALF, 1988). Após a eluição, a precipitação ácida pode ser realizada, na qual os vírus precipitam junto com a matéria orgânica contida nos extratos (METCALF et al., 1980). O processo de floculação orgânica (KATZENELSON, FATTAL, HOSTOVESKY, 1976) é utilizado para concentrar vírus a partir de amostras de água, no qual a acidificação na presença de extrato de carne, leite desnatado ou caseína produz um floco com o vírus adsorvido (BITTON, FELDBERG, FARRAH, 1979). Para amostras de moluscos, esse processo também pode ser utilizado, visto que a floculação pode ocorrer através das próprias proteínas dos extratos tissulares. Quando os níveis de contaminação viral nos moluscos são muito pequenos, torna-se necessário incluir um passo adicional de concentração, através da adição de polietileno glicol (PEG), floculação orgânica ou ultracentrifugação.

Visando remover os inibidores das reações de PCR a partir dos concentrados, numerosos protocolos de extração dos ácidos nucléicos podem ser aplicados (ARNAL et al., 1999), tais como meios compostos por Sephadex (De

LEON et al., 1992; STRAUB, PEPPER, GERBA, 1994), celulose (WILDE et al., 1990) ou Chelex (STRAUB et al., 1994; HALE, GREEN, BROWN, 1996), através dos quais os sais e as proteínas podem ser eliminadas eficientemente. Por outro lado, através de processos químicos baseados em brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB) tem sido possível a eliminação de polissacarídeos presentes nos tecidos dos moluscos (ZHOU et al., 1991; JIANG et al., 1992; STRAUB et al., 1994).

No presente trabalho, duas metodologias distintas de extração do RNA viral, tanto dos extratos tissulares quanto dos fluidos infecciosos foram empregadas: a metodologia clássica utilizando-se fenol-clorofórmio e a metodologia utilizando-se o reagente TRIZOL[®], uma mistura comercial de fenol e isotiocianato de guanidina.

O RNA viral obtido a partir do fluido infeccioso do rotavírus foi quantificado espectrofotometricamente através da leitura da densidade ótica (D.O.) nos comprimentos de onda 260 e 280nm, simultaneamente. O valor da D.O. a 260nm fornece a concentração de ácidos nucléicos da amostra, sendo definido que amostras de RNA com densidade ótica igual a 1 (1 unidade de absorvância) possuem concentração de RNA equivalente a 40µg/ml (SAMBROOK et al, 1989).

Para ambas as metodologias de extração do RNA viral testadas neste trabalho, a taxa de pureza das amostras foi medida através da razão entre as absorvâncias a 260nm e 280nm, onde são calculadas as impurezas protéicas. Para amostras puras de RNA, o valor esperado seria próximo de 2,0, desvios dessa ordem, portanto, indicam a presença de impurezas na amostra (SAMBROOK et al., 1989). A razão encontrada nas dosagens

espectrofotométricas realizadas foi de 1,8 para os dois métodos de extração, indicando um grau de pureza considerável do material genético viral obtido.

Os ensaios de transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR) visaram a amplificação do segmento gênico 9 do rotavírus símio SA11. Para tal, foram realizadas duas reações de amplificação, tendo sido convencionadas como primeira reação de amplificação (1^oPCR) e segunda reação de amplificação (2^oPCR ou *semi-nested* PCR). Na primeira, foram produzidas cópias integrais do gene 9 (fragmento de 1062pb), utilizando-se os iniciadores BEG9 e END9, definidos por GOUVEA et al. (1990) (Tabela 4). Na segunda reação, foram produzidas cópias das seqüências internas ao gene 9 e específicas para cada sorotipo do rotavírus. Nessa última foram utilizados os iniciadores END9 e o sorotipo-específico ET3 definido por GOUVEA et al. (1990), que gera fragmentos de 374pb.

Com a finalidade de definir as concentrações ideais de MgCl₂ e dos iniciadores para as reações utilizando tanto o RNA purificado quanto o RNA obtido a partir dos extratos de ostras, foi empregada a diluição 1:5 (equivalente a 400ng) do RNA.

Torna-se importante ressaltar a influência da concentração dos íons Mg⁺² em diversas etapas da reação de PCR, tais como anelamento dos iniciadores, especificidade do produto, temperatura de dissociação das fitas, formação de dímeros de iniciadores e atividade e especificidade das enzimas, que requerem cátions divalentes. Altas concentrações desse íon podem promover amplificações inespecíficas, resultando numa baixa especificidade de reação, enquanto que

pequenas concentrações podem resultar em pouca eficiência (SAMBROOK et al., 1989; INNIS & GELFAND, 1990; PERSING, 1993; SIMMONDS, 1995).

Em vista do exposto, as amostras de RNA foram testadas com cinco diferentes concentrações de $MgCl_2$: 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM e 3,0 mM, através do protocolo de amplificação número 1, descrito no item 3.7.2.1.

A concentração ideal dos iniciadores foi definida para a reação de PCR, pois quando presentes em concentrações excessivas, os iniciadores podem favorecer anelamentos inespecíficos e promover interações entre si, formando os "dímeros", que competem pela amplificação do produto desejado, resultando numa baixa eficiência de reação (SAMBROOK et al., 1989; INNIS & GELFAND, 1990 ; PERSING, 1993; SIMMONDS, 1995). Foram utilizadas as concentrações de 200 e 400pmoles dos iniciadores para a primeira reação de amplificação e 100 e 200pmoles para a segunda reação. Nas Figuras 13A (fluido infeccioso), 17A e 17B (extratos tissulares de ostras, preparados de acordo com os dois protocolos definidos no trabalho), observa-se que a concentração de 3mM de $MgCl_2$ apresentou a maior intensidade do produto de PCR corado pelo brometo de etídeo. Este resultado foi contrário aos obtidos por BARARDI et al. (1999) e GOUVEA et al. (1990), que encontraram que a concentração de 1,5 mM deste reagente seria a ideal na reação. Considerou-se importante a realização desta padronização também com o RNA viral obtido de cada extrato tissular de ostras por acreditar que o meio de extração poderia interferir na concentração de íons presentes, mas isto não foi observado. Com relação aos iniciadores (Figura 13B), observou-se que as menores concentrações de iniciadores foram mais favoráveis à amplificação, minimizando a formação de produtos inespecíficos.

Os produtos de PCR obtidos a partir do RNA viral, purificado com fenol/clorofórmio ou TRIZOL[®] foram comparados utilizando-se as concentrações otimizadas de íons magnésio e iniciadores. As Figuras 12 (fluido infeccioso) e 16 (extratos tissulares de ostras) mostram que não há diferença na intensidade dos produtos para ambos os métodos de extração. Sendo assim optou-se pelo método do fenol/clorofórmio por ser mais econômico visando sua aplicabilidade em amostras de campo.

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade do ensaio de amplificação para detecção do rotavírus, as amostras de RNA viral que foram extraídas a partir de fluido infeccioso (item 3.5) e de extratos tissulares de ostras (item 3.10), foram diluídas seriadamente e testadas conforme os protocolos de PCR números 1 (PCR tradicional) e 2 (PCR Supermix). Comparando-se os produtos de PCR obtidos a partir do RNA viral isolado do fluido infeccioso, observa-se nas Figuras 14^A, 14B e 15 que o PCR Supermix (protocolo 2) foi muito mais sensível na detecção do RNA. Este protocolo foi capaz de amplificar produtos até quando utilizou-se 0,01ng do RNA, ao contrário do primeiro que detectou no máximo 2,5ng do material genético viral.

Assim como no estudo da recuperação viral utilizando cultivo de células, neste caso, os RNAs isolados dos extratos preparados de forma simplificada (B2) e os que receberam a etapa final de centrifugação (B1), bem como os respectivos controles (A2 e A1) foram testados através de RT-PCR. Os protocolos de RT-PCR tradicionais (protocolo 1) e Supermix (protocolo 2) foram comparados no caso dos extratos A2 e B2. A Figura 18 A mostra os resultados da reação de *semi-nested*

PCR para o extrato A2, utilizando-se o protocolo 1, na qual a sensibilidade de amplificação foi, no máximo de 312ffu. Em contrapartida, quando o protocolo 2 foi utilizado para esse mesmo extrato, a sensibilidade de detecção foi de 0,03ffu (Figura 19D).

A figura 18B mostra os resultados da reação de *semi-nested* PCR para o extrato B2, utilizando-se o protocolo 1. A sensibilidade de amplificação foi, no máximo de 625ffu. Em contrapartida, quando o protocolo 2 foi utilizado para esse mesmo extrato, a sensibilidade de detecção foi de 0,15ffu (Figura 19B). Desta forma, após comparar os resultados obtidos com os extratos A (controle) com os extratos B (experimental), concluiu-se que a diferença na detecção foi de apenas uma diluição no RNA. Em ambos os casos, a utilização do kit PCR Supermix resultou num grande aumento da sensibilidade de detecção viral.

Em vista do exposto, somente o protocolo 2 (PCR Supermix) foi testado para os extratos A1 e B1. A Figura 19A mostra os resultados da reação de *semi-nested* PCR para o extrato B1 (experimental). A sensibilidade de amplificação foi, no máximo de 1,2ffu. Para o extrato A1 (controle) a sensibilidade de amplificação foi, no máximo de 0,6ffu (Figura 19B), mostrando novamente uma altíssima sensibilidade de detecção viral. Um sumário dos protocolos utilizados com os dois tipos de extratos pode ser visualizado na Figura 20. Novamente, enfatiza-se a grande sensibilidade do kit PCR Supermix na detecção dos rotavírus a partir do extratos tissulares de ostras.

Com relação aos protocolos de preparação de extratos, pode-se observar que a sensibilidade de detecção viral foi maior quando o protocolo simplificado de preparação foi utilizado (extratos A2 e B2). Esta afirmação mostra que os nossos

objetivos foram plenamente atingidos, já que foi desenvolvido um protocolo simplificado e econômico para a detecção de rotavírus em ostras experimentalmente inoculadas, que poderá ser aplicado em ensaios de rotina para o monitoramento de amostras ambientais.

6. CONCLUSÕES

6.1 Ensaios envolvendo cultura celular

- ✓ O limite de citotoxicidade do extrato tissular de ostras não inoculadas com o rotavírus (Extrato Negativo) foi a diluição 1:32 do extrato.

- ✓ Utilizando-se o ensaio de citopatogenicidade com os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus, não foram detectadas diferenças significativas (observadas pelo teste de TUKEY) ao nível de 5% de significância entre os extratos A2 (controle) e B2 (experimental). Isto indicou que o método de preparação dos extratos utilizado neste trabalho, proporcionou uma boa recuperação viral.

- ✓ ensaio de imunofluorescência indireta para avaliar a recuperação viral não foi adequado para este propósito quando utilizados os extratos de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus; entretanto, o mesmo foi utilizado com sucesso para a titulação do rotavírus símio SA11.

6.2 Ensaio envolvendo o RNA viral

- ✓ Através dos ensaios de RT-PCR, foi detectada uma boa recuperação do rotavírus símio SA11, a partir dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas.
- ✓ O método simplificado de preparação dos extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus SA11 que não envolveu a etapa final de centrifugação foi mais sensível na detecção do RNA viral através dos ensaios de RT-PCR.
- ✓ Os produtos de RT-PCR obtidos quando, para os procedimentos de extração do RNA viral, foram utilizados fenol/clorofórmio ou o reagente TRIZOL[®] apresentaram intensidade similar quando analisados por eletroforese. Isto foi observado tanto para o RNA viral extraído dos fluidos infecciosos quanto para o extraído dos extratos tissulares das ostras.
- ✓ O protocolo de RT-PCR número 2 (PCR Supermix) foi mais sensível para a amplificação gênica do rotavírus símio SA11 do que o protocolo 1 (PCR tradicional) tanto para o RNA extraído do fluido infeccioso quanto dos extratos. Para o RNA extraído de fluido infeccioso, com o protocolo 1, foi detectado o limite máximo de 2,5ng de RNA ($7,8 \times 10^3$ ffu), enquanto que com o protocolo 2 detectou-se até 0,01ng (30,4ffu).
- ✓ Para os extratos tissulares de ostras experimentalmente inoculadas com o rotavírus, através do protocolo 1 foram detectadas até 312ffu para o extrato A2 e 625ffu para o extrato B2. Em contrapartida, utilizando-se o protocolo número 2 foram detectadas até 0,03ffu para o extrato A2 e 0,15ffu para o extrato B2.
- ✓ Utilizando-se o protocolo 2, foram detectadas até 0,6ffu e 1,2ffu respectivamente para os extratos tissulares de ostras A1 e B1.

-
- ✓ A concentração ideal de $MgCl_2$ foi otimizada para as reações de RT-PCR para o quanto dos extratos de ostras e ficou definida em 3,0mM para ambos os RNAs.

 - ✓ A concentração ideal de iniciadores foi otimizada para as reações de RT-PCR para o RNA viral extraído do fluido infeccioso, sendo definida em 200 e 100pmoles para a primeira e segunda reações, respectivamente.

 - ✓ A metodologia desenvolvida neste trabalho, para a detecção de rotavírus a partir de ostras experimentalmente inoculadas tem aplicabilidade prática, pois poderá ser utilizada no monitoramento e controle virológico das ostras cultivadas e consumidas na região de Florianópolis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, F.X.; PINTÓ, R.M.; BOSCH, A. - Survival of enteric viruses on environmental fomites. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60(10)**: 3704-3710, 1994.
- ABAD, F.X.; PINTÓ, R.M.; GAJARDO, R.; BOSCH, A. - Viruses in mussels: public health implications and depuration. **J. Food Protect.**, **60(6)**: 677-681, 1997.
- ABBASZADEGAN, M.; STEWART, P.; LeCHEVALLIER, M. - A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65(2)**: 444-449, 1999.
- ABBASZADEGAN, M.; HUBER, M.S.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. - Detection of enterovirus in groundwater with the polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**: 1318-1324, 1993.
- AHMED, F.A. - Review: assessing and managing risk due to consumption of seafood contaminated with microorganisms, parasites, and natural toxins in the US. **Int. J. Food Sci. Tech.**, **27**: 243-260, 1992.
- AKABOSHI, S. & SINQUE, C. - Cultivo experimental de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) na região estuarina lagunar de Cananéia (25°05'S; 48°01'W), São Paulo, Brasil. **Bol. Inst. Pesca** **10**: 1-8, 1983.
- AKABOSHI, S.; PEREIRA, O.M.; JABIBAGN, O.; YAMANAKA, N. - Fecundação e crescimento larval de ostra *Crassostrea gigas* em laboratório - Cananéia, São Paulo, Brasil. **Bol. Inst. Pesca** **9**: 45-50, 1982.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. - Microbiological examination. In: EATON, A.; CLESCERI, L.; GREENBERG, A.E. ed. - **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19.ed. Maryland, United Book Press, 1995. p. 9-1 a 9-117.
- ANDERSEN, V.; MAAGE, A.; JOHANNESSEN, P.J. - Heavy metals in blue mussels (*Mytilus edulis*) in the Bergen Harbor Area, Western Norway. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **57**: 589-596, 1996.
- ANSARI, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A. - Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. **Rev. Inf. Dis.**, **13**: 448-461, 1991.
- ARIAS, C.F.; LÓPEZ, S.; ESPEJO, R.T. - Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. **J. Virol.**, **41**: 42-50, 1982.
- ARIAS, C.F.; ROMERO, P.; ALVAREZ, V.; LÓPEZ, S. - Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. **J. Virol.**, **70(9)**: 5832-5839, 1996.
- ARNAL, C.; FERRÉ-AUBINEAU, V.; BESSE, B.; MIGNOTTE, B.; SCHWARTZBROD, L.; BILLAUDEL, S. - Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. **J. Virol. Methods**, **77**: 17-26, 1999.
- ATMAR, R.L. ; METCALF, T.G. ; NEILL, F.H. ; ESTES, M.K. - Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59(2)**:631-635, 1993.
- BADAWY, A.S.; GERBA, C.P.; KELLEY, L.M. - Survival of rotavirus SA11 on vegetables. **Food Microbiol.**, **2**: 199-205, 1985.

- BARARDI, C.R.M. ; EMSLIE, K.R. ; VESEY, G. ; WILLIAMS, K.L. – Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. **J. Virol. Methods**, **74**:31-38, 1998.
- BARARDI, C.R.M. ; YIP, H. ; EMSLIE, K.R. ; VESEY, G. ; SHANKER, S.R. ; WILLIAMS, K.L. – Flow cytometry and RT-PCR for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **Int. J. Food Microbiol.**, **49**:9-18, 1999.
- BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; GARRIGUES, P.; DIZER, H.; HANSEN, P.D. - Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. **Mar. Environ. Res.**, **47**: 17-47, 1999.
- BEDFORD, A.J.; WILLIAMS, G.; BELLAMY, A.R. - Virus accumulation by the rock oyster *Crassostrea glomerata*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **35**: 1012-1018, 1978.
- BERIL, C.; BOHER, S.; SCWARTZBROD, L. – Detoxification by sephadex LH20 of seafood concentrates for rotavirus assay. **Wat. Sci. Tech.**, **24(2)**: 417-421, 1991.
- BERN, C.; MARTINES, J.; De ZOYSA, I.; GLASS, R.I. - The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, **70**: 705-714, 1992.
- BERNARD, F.R. - Uptake and elimination of coliform bacteria by four marine bivalve mollusks. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, **46**: 1592-1599, 1989.
- BEUTLER, E.; GELBART, J.; KULH, W. - Interference of heparine with polymerase chain reaction. **Biotechniques** **9**: 166-166, 1990.
- BIRCH, C.J.; RODGER, S.M.; MARSHALL, J.A.; GUST, I.D. - Replication of human rotavirus in cell culture. **J. Med. Virol.**, **11**: 241-250, 1983.
- BIRKBECK, T.H. & Mc HENERY, J.G. - Degradation of bacteria by *Mytilus edulis*. **Mar. Biol.**, **72**: 7-15, 1982.
- BISHOP, R.F. - Natural history of human rotavirus infection. **Arch. Virol.**, **12** (Suppl.): 119-128, 1996.
- BISHOP, R.F.; DAVIDSON, G.P.; HOLMES, I.H.; RUCK, B.J. - Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. **Lancet**, **2**: 1281-1283, 1973.
- BITTON, G. - Wastewater microbiology. New York, Wiley-Liss, 1994. 478p.
- BITTON, G.; FELDBERG, B.N.; FARRAH, S.R. - Concentration of enterovirus from seawater and tapwater by organic flocculation using non-fat dry milk and casein. **Water Air Soil Poll.** **12**: 187-195, 1979.
- BOCQUENÉ, G.; ROIG, A.; FOURNIER, D. - Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. **Febs Lett.**, **407(3)**: 261-266, 1997.
- BOSCH, A., ABAD, F. X.; GAJARDO, R.; PINTÓ, R. M. - Should shellfish be purified before public consumption? **The Lancet**, **344**: 1024-1025, 1994.
- BOSCH, A.; PINTÓ, R.M.; ABAD, F.X. - Differential accumulation and depuration of human enteric viruses by mussels. **Wat. Sci. Tech.** **31(5-6)**: 447-451, 1995.

- BOUCHRITI, N. & GOYAL, S.M. - Methods for the concentration and detection of human enteric virus in shellfish: a review. **Microbiologica**, **16**: 105-114, 1993.
- BRIDGER, J.C. - Non-group A rotavirus. In: KAPIKIAN, A.Z., ed. - **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2.ed. New York, Marcel Dekker Inc, 1994. p. 369-408.
- BURLESON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. - **Virology: a laboratory manual**. San Diego, Academic Press, 1992. 250p.
- BUSSE, K.M. - Water quality and shellfish management in Tillamook Bay, Oregon. **Coast. Manage.**, **26**: 291-301, 1998.
- CANADIAN SHELLFISH SANITATION PROGRAM - Growing area survey and classification. In: Canadian Shellfish Sanitation Program, **Manual of Operations**. Canada, 1992. 40p.
- CARDUCCI, A.; GEMELLI, C.; CANTIANI, L.; CASINI, B.; ROVINI, E. - Assessment of microbial parameters as indicators of viral contamination of aerosol from urban sewage treatment plants. **Lett. Appl. Microbiol.**, **28**: 207-210, 1999.
- CASTRO, L.; RODRIGUES, D.P.; FLAUZINO, R.; MOURA, M.; LEITE, J.P.G.L. - An outbreak of diarrhea associated with rotavirus serotype 1 in a day care nursery in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **89(1)**: 5-9, 1994.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - **Food-borne surveillance data for all pathogens in fish/shellfish for years 1973-1987**. Atlanta, CDC, 1989.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - Multistate outbreak of viral gastroenteritis related to consumption of oysters - Louisiana, Maryland, Mississippi, and North Carolina, 1993. **MMWR**, **49(42)**: 945-948, 1993.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters - Los Angeles, 1996. **JAMA**, **276(12)**: 937-938, 1996.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - Viral gastroenteritis associated with consumption of raw oysters - Florida, 1993. **MMWR**, **43(24)**: 446-449, 1994.
- CHAI, T.; HAN, T.; COCKEY, R. R. - Microbial quality of shellfish-growing waters in Chesapeake Bay. **J. Food Protect.**, **57(3)**: 229-234, 1994.
- CHALAPATI, R.V.; METCALF, T.G.; MELNICK, J.L. - Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotaviruses from estuarine waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **52**: 484-488, 1986.
- CHALMER, J.W.T. & Mc MILLAN, J.H. - An outbreak of viral gastroenterites associated with adequately prepared oysters. **Epidemiol. Infect.**, **1115**: 163-167, 1995.
- CHAN, T.Y.K. - Shellfish-borne illnesses. **Trop. Geogr. Med.**, **47(6)**: 305-307, 1995.
- CHEN, Y.S. & VAUGHN, J.M. - Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine dioxide. **Appl. Environ. Microbiol.**, **56(5)**: 1363-1366, 1990.
- CHRISTENSEN, B.F.; LEES, D.; HENSHILWOOD, K.; BJERGSKOV, T.; GREEN, J. - Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 1996/97. **J. Shellfish Res.**, **17(5)**: 1633-1635, 1998.

- CLARK, R.M.; HURST, C.J.; REGLI, S. - Costs and benefits of pathogen control in drinking water. In: CRAUN, G.F., ed. - **Safety of water disinfection: balancing chemical and microbial risks**. Washington DC, ILSI Press, 1993. p.181-196.
- CLIVER, D. O.; ELLENDER, R.D.; SOBSEY, M.D. - Methods to detect viruses in foods-testing and interpretation of results. **J. Food Protect.**, **46(3)**: 345-357, 1983.
- CONNER, M.E.; MATSON, D.O.; ESTES, M.K. - Rotavirus vaccines and vaccination potential. In: RAMIG, R.F., ed. - **Rotaviruses**. Berlin, Springer-Verlag, 1994. p. 286-337.
- CONAMA - Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente – Conselho Nacional do Meio Ambiente - Diário Oficial da União, 30 de julho de 1986. **Resolução/CONAMA/nº 020/86**, 1986.
- CONSTANZA, R. - Toward an operational definition of ecosystem health. In: CONSTANZA, R.; NORTON, B.G.; HASKELL, B.D., ed. - **Ecosystem health: new goals for environmental management**. Washington DC, Island Press, 1992. 269p.
- COOPER, J.I. - **Viruses in the environment**. 2.ed. London, Chapman & Hall, 1995. 210p.
- CROMEANS, T.L. ; NAINAN, O.V. ; MARGOLIS, H.S. – Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63(6)**:2460-2463, 1997.
- DAME, R.F. - **Ecology of marine bivalves: an ecosystem approach**. Boca Raton, CRC Press, 1996. 254p.
- De LEON, R. & GERBA, C.P. - Viral disease transmission by seafood. In: NRAIGU, J.O. & SIMMONS, M.S., ed. - **Food Contamination from environmental sources**. New York, Wiley, 1990. p.639-662.
- De LEON, R.; MATSUI, S.M.; BARIC, R.S.; HERRMANN, J.E.; BLACKLOW, N.R.; GREENBERG, H.B.; SOBSEY, M.D. - Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 3151-3157, 1992.
- DOMBROSKI, C.S.; JAYKUS, L.A.; GREEN, D.P.; FARKAS, B. - Use of a mutant strain for evaluating processing strategies to inactivate *Vibrio vulnificus* in oysters. **J. Food. Protect.**, **62(6)**: 592-600, 1999.
- DORE, I. - **Shellfish: a guide to oysters, mussels, scallops, clams and similar products for the commercial use**. New York, Van Nostrand Reinhold, 1991. 240p.
- DUFOUR, A.P. - **Health effects for fresh recreational waters**. EPA 600/1-84-004. Cincinnati, Oh.: U. S. Environmental protection Agency, 1984.
- ESPEJO, R.T; LÓPEZ, S. ARIAS, C. - Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. **J. Virol.**, **37**: 156-160, 1981.
- ESTES, M.K. - Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E., ed. - **Fields Virology**. 3.ed. Philadelphia, Lippincott, 1996. p.1625-1655.
- ESTES, M.K.; GRAHAM, D.; MASON, B.B - Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: biologic mechanisms. **J. Virol.**, **39**: 879-888, 1981.

- FANTIN, M. & SILVA, Z.D. - **A realidade da pesca artesanal em quatro comunidades pesqueiras na região de Florianópolis.** UFSC-NEF, 1990. 62p. (relatório CNPq).
- FAO – FAO Fisheries Department. Food and Agriculture Organization. Disponível na internet. <http://www.fao.org/fi/default.asp>. 20 fevereiro 2000.
- FAYER, R., FARLEY, C. A., LEWIS, E. J., TROUT, J. M.; GRACZYK, T. K. - Potential role of the eastern oyster *Crassostrea virginica*, in the epidemiology of *Cryptosporidium parvum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**: 2086-2088, 1997.
- FAYER, R.; GRACZYK, T. K.; LEWIS, E. J.; TROUT, J. M.; FARLEY, C. F. - Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64(3)**: 1070-1074, 1998.
- FERNANDES, W.M. - **Crescimento do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca:Bivalvia) em sistemas de cultivo suspenso fixo na região de Santo Antônio de Lisboa, Ilha de Santa Catarina.** Florianópolis, 1993. (Tese - Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina).
- FLEWETT, T.H.; BRYDEN, A.S.; DAVIES, H.; WOODE, G.N.; BRIDGER, J.C.; DERRICK, J.M. - Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, **2**: 61-63, 1974.
- FRAISER, M.B. & KOBURGER, J.A. - Incidence of salmonellae in clams, oysters, crabs and mullet. **J. Food Protect.**, **47(5)**: 343-45, 1984.
- FRESHNEY, R.I. - Introduction: principles of sterile technique and cell propagation. In: _____, ed. - **Animal cell culture: a practical approach.**, Washington DC, IRL Press, 1986. p.1-20.
- GAJARDO, R.; BOUCHRITI, N.; PINTÓ, R.M.; BOSCH, A. - Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61(9)**: 3460-3462, 1995.
- GARREIS, M.J. - Sanitary surveys of growing waters. In: HACKNEY, C.R. & PIERSON, M.D., ed. - **Environmental indicators and shellfish safety.** New York, Chapman & Hall, 1994. p. 289-330.
- GERBA, C.P.; GOYAL, S.M.; CECH, I.; BOGDAN, G.F. - Bacterial indicators and environmental factors as related to contamination of oysters by enteroviruses. **J. Food. Protect.**, **43(2)**: 99-101, 1980.
- GERBA, C.P. & GOYAL, S.M. - Detection and occurrence of enteric virus in shellfish: a review. **J. Food Protect.**, **41(9)**: 743-45, 1978.
- GERBA, C.P. - Recovering viruses from sewage, effluents, and water. In: BERG, G., ed. - **Methods for recovering viruses from the environmental.** CRC Press, Boca Raton, FL., 1987, p. 1-23.
- GERBA, C.P. - Viral disease transmission by seafoods. **Food Technol.**, **42**: 99-103, 1988.
- GERBA, C.P.; ROSE, J.B.; HAAS, C.N; CRABTREE, K.D. - Waterborne rotavirus: a risk assessment. **Wat. Res.**, **30(12)**: 29-29-2940, 1996.
- GILGER, M.A.; MATSON, D.O.; CONNER, M.E.; ROSENBLATT, H.M.; FINEGOLD, M.J.; ESTES, M.K. - Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. **J. Pediatr.**, **120(6)**: 912-917, 1992.

- GILL, O.N.; CUBBITT, W.D.; MCSWAGGAN, N.A.; WATNEY, B.M.; BARTLETT, C.L.R. - Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small, round structured viruses. **Br. Med. J.**, **287**: 1532-1534, 1983.
- GLASS, R.I.; KILGORE, P.E.; HOLMAN, R.C.; JIN, S.; SMITH, J.C; WOODS, P.A. - The epidemiology of rotavirus diarrhea in the United States: surveillance and estimates of disease burden. **J. Infect. Dis.**, **174**: S5-11, 1996.
- GLASS, R.I.; KEITH, J.; NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T.; ASKAA, J.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M.; FLORES, J. - Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus; comparison with homologous gene from four strains of human and animal rotaviruses. **Virology**, **141**: 292-298, 1985.
- GOLDBERG, E.D.; KOIDE, M.; HODGE, M.; FLEGAL, A.R.; MARTIN, J. - U.S. mussel watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. **Estuar. Coast. Shelf. S.**, **16**: 69-93, 1983.
- GORZIGLIA, M.; GREEN, K.; NISHIKAWA, K.; TANIGUCHI, K.; JONES, R.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. - Sequence of the fourth gene of human rotaviruses recovered from asymptomatic or symptomatic infections. **J. Virol.**, **62**: 2978-2984, 1988.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C.; ESTES, M.K. - Identification of Norwalk virus in artificially seeded shellfish and selected foods. **J. Virol. Methods**, **48**: 177-187, 1994a.
- GOUVEA, V. ; GLASS, R.I. ; WOODS, P. ; TANIGUCHI, K. ; CLARK, H.F. ; FORRESTER, B. ; FANG, Z. - Polymerase chain reaction and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **28(2)**:276-282, 1990.
- GOUVEA, V.; CASTRO, L.; TIMENETSKY, M.C.S.T.; GREENBERG, H.; SANTOS, N. - Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, **32(5)**: 1408-1409, 1994b.
- GREEN, K.Y.; MIDTHUN, K.; GORZIGLIA, M.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M.; FLORES, J. - Comparison of the amino acid sequence of the major neutralization protein of four rotavirus serotypes. **Virology**, **165**: 153-159, 1987.
- GRIFFIN, D.W.; GIBSON III, C.J.; LIPP, E.K.; RILEY, K.; PAUL III, J.H.; ROSE, J.B. - Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65(9)**: 4118-4125, 1999.
- GRIFFITHS, B. - Scaling-up of animal cell cultures. In: FRESHNEY, R.I. , ed. - **Animal cell culture: a practical approach**. Oxford, Washington DC, 1986. p.1-11.
- GROHMAN, G.S.; GREENBERG, H.B.; WELCH, B.M; MURPHY, A. M. - Oyster-associated gastroenteritis in Australia: The detection of norwalk virus and its antibody by immune electron microscopy and radioimmunoassay. **J. Med. Virol.**, **6**: 11-19, 1980.
- GUERRANT, R.L.; HUDHES, J.M.; LIMA, N.L.; CRANE, J. - Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. **Rev. Infect. Dis.**, **12**: S41-S50, 1990.

- GUSMÃO, R.H.P.; D'ARC, J.; MASCARENHAS, P.; GABBAY, I.; LINS-LAISSON, Z.; RAMOS, F.L.P.; MONTEIRO, T.A.F.; VALENTE, S.A.; LINHARES, A.C. - Rotaviruses as a cause of nosocomial, infantile diarrhoea in Northern Brazil: pilot study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **90(6)**: 743-749, 1995.
- HAFLIGER, D.; GILGEN, M.; LÜTHY, J.; HÜBNER, P.H. - Seminested RT-PCR systems for small round structure viruses and detection of enteric viruses in seafood. **Int. J. Food Microbiol.**, **37**: 27-36, 1997.
- HALE, A.D.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G. - Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. **J. Virol. Methods**, **57**: 195-201, 1996.
- HARLOW, E. & LANE, D. - Monoclonal antibodies. In: _____ - **Antibodies: a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. p.139-243.
- HEIKAL, T.W.; SMITH, E.M.; GERBA, C.P. - Seasonal occurrence of rotavirus in sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, **47**: 588-590, 1984.
- HEJKAL, T.W.; GERBA, C.P.; RAO, V.C. - Reduction of cytotoxicity in virus concentrates from environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **43(3)**: 731-733, 1982.
- HENSHILWOOD, K.; GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, W.G.; LEES, D.N. - The development of polymerase chain reaction assays for detection of small round structure and other human enteric viruses in molluscan shellfish. **J. Shellfish Res.**, **17(5)**: 1675-1678, 1998.
- HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. - Rapid diagnosis of rotavirus infection by the direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, **16**: 473, 477, 1982.
- HESPANHOL, I. & PROST, A.M.E. - Who guidelines an national standards for reuse and water quality. **Water Res. (G.B.)**, **28**: 119, 1994.
- HOSHINO, Y. & KAPIKIAN, A.Z. - Rotavirus antigens. In: RAMIG, R.F. , ed. - **Rotaviruses**. Berlin Heidelberg, Spinger-Verlag, 1994. p.179-227.
- HOSHINO, Y., SERENO, M.M., MIDTHUN, K., FLORES, J., KAPIKIAN, A.Z., CHANOCK, R.M. - Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 8701-8704, 1985.
- HUNG, T.; WANG, C.; FANG, Z.; CHOU, Z.; CHANG, X.; LIONG, X.Q.; CHEN, G.M.; YAO, H.L.; CHAO, T.X.; YE, W.W.; DEN, S.S.; CHANG, W.C. - Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. **Lancet**, **1**: 1139-1142, 1984.
- HURST, C.J. & GOYKE, T. - Reduction of interfering cytotoxicity associated with wastewater sludge concentrates assayed for indigenous enteric viruses. **Appl. Environ. Microbiol.**, **46(1)**: 133-139, 1983.
- HURST, C.J. & GERBA, C.P. - Stability of simian rotavirus in fresh and estuarine water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **39(1)**: 1-5, 1980.
- IMAI, T. - **Aquaculture in shallow seas: progress in shallow sea culture**. part II. Rotterdam, Balkema, 1982. p. 115-260.

- INNIS, M.A. & GELFAND, D.H. – Optimization of PCRs. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J., ed. - **PCR protocols: a guide to method and applications**. San Diego, Academic Press, 1990. p.3-12.
- JØRGENSEN, C.B. - **Bivalve filter feeding: hydrodynamics, bioenergetics, physiology, and ecology**. In: OLSEN & OLSEN, ed., Fredensborg, Denmark, 1990. 140p.
- JACOBSON, R.M. - The current status of the rotavirus vaccine. **Vaccine**, **17**: 1690-1699, 1999.
- JAYKUS, L.A.; De LEON, R.; SOBSEY, M.D. – Application of RT-PCR for the detection of enteric viruses in oysters. **Wat. Sci. Tech.** **27(3-4)**: 49-53, 1993.
- JAYKUS, L.A.; De LEON, R.; SOBSEY, M.D. – A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62(6)**: 2074-2080, 1996.
- JAYKUS, L.A.; HEMARD, M.T.; SOBSEY, M.D. – Human enteric pathogenic viruses. In: HACKNEY, C.R. & PIERSON, M.D., ed. – **Environmental indicators and shellfish safety**. New York, Chapman & Hall, 1994. p.92-153.
- JAYKUS, L.A.; HEMARD, M.T.; SOBSEY, M.D. - Human enteric pathogenic viruses. In: PIERSON, M.D. & HACKNEY, C.R., ed. - **Environmental indicators of shellfish safety**. New York, Van Nostrand Reinhold, 1993.
- JIANG, X.; WANG, J.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K. – Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 2529-2534, 1992.
- JULSHAMN, K. & GRAHL-NIELSEN, O. - Distribution of trace elements from industrial discharges in the Handangerfjord, Norway: a multivariate data analysis of saithe, flounder and blue mussel as sentinel organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, **32(7)**: 564-571, 1996.
- KAPIKIAN, A.Z. & CHANOCK, R.M. - Rotaviruses. In: FIELDS B. N., KNIPE, D.N.; HOWLEY, R.M., CHANOCK, R.M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; SATRAUS S. E., ed. - **Fields Virology**. 3.ed. Philadelphia, Lippincott, 1996. p.1657-1708.
- KATZENELSON, E.; FATTAL, B.; HOSTOVESKY, T. - Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for detection of viruses in tap water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **32**: 638-639, 1976.
- KAWAMOTO, H.; HASEGAWA, S.; SAWATARI, S.; MIWA, C.; MORITA, O.; HOSOKAWA, T.; TANAKA, H. - Small, round-structure (SRSVs) associated with acute gastroenteritis outbreaks in Gifu, Japan. **Microbiol. Immunol.**, **37(12)**: 991-997, 1993.
- KEIDAN, I.; SHIF, I.; KEREN, G.; PASSWELL, J.H. - Rotavirus encephalopathy: evidence of central nervous system involvement during rotavirus infection. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **11(9)**: 773-774, 1992.
- KELLY, M.T. & STROH, E.M. - Occurrence of *Vibrionaceae* in natural and cultivated oyster populations in the Pacific Northwest. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** **9**: 1-5, 1988.
- KENNISH, M.J. & RUPPEL, B.E. - DDT contamination in selected estuarine and coastal marine fish and shellfish of New Jersey. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, **31**: 256-262, 1996.

- KIØRBOE, T. & MØHLENBERG, F. - Particle selection in suspension-feeding bivalves. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, **5**: 291-296, 1981.
- KOHN, M.A.; FARLEY, T.A.; ANDO, T.; CURTIS, M.; WILSON, S.A.; JIN, Q.; MONROE, S.; BARON, R.C.; McFARLAND, L.; GLASS, R.I. - An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters: implications for maintaining safe oyster beds. **JAMA**, **273(6)**: 466-471, 1995.
- KUKKULA, M.; ARSTILA, P.; KLOSSNER, M.; MAUNULA, L.; BONSDORFF, C.V.; JAATINEN, P. - Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. **Scan. J. Infect. Dis.**, **29**: 415-418, 1997.
- LANDRY, E.F.; VAUGHN, J.M.; VICALE, T.J.; MANN, R. - Accumulation of sediment-associated viruses in shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, **45**: 238-47, 1983.
- LANGDON, C.J. & NEWELL, R.I.E. - Utilization of detritus and bacteria as food sources by two bivalve suspension-feeders, the oyster *Crassostrea virginica* e the mussel *Geukensia demissa*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, **58**: 299-310, 1990.
- LARKIN, E.P. & METCALF, T.G. - Cooperative study of methods for the recovery of enteric viruses from shellfish. **J. Food Protect.**, **43(2)**: 84-86, 1980.
- LCMM - Projeto BMLP-LCMM. Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos. Disponível na internet. <http://www.lcmm.ufsc.br>. 10 fevereiro 2000.
- Le GUYADER, F.; NEILL, F.H.; ESTES, M.K.; MONROE, S.S.; ANDO, T.; ATMAR, R.L. - Detection and analysis of a small round-structure virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62(11)**: 4268-4272, 1996.
- Le GUYADER, F.; DUBOIS, E.; MENARD, D.; POMMEPUY, M. - Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60(10)**: 3665-3671, 1994.
- Le GUYADER, F.; MIOSSEC, L.; HAUGARREAU, L.; DUBOIS, E.; KOPECKA, H.; POMMEPUY, M. - RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21-month period. **Wat. Sci. Tech.**, **38(12)**: 45-50, 1998.
- LEE, R.J. & GLOVER, R.J.O. - Evaluation of the impact of different sewage treatment processes on shellfishery pollution using a geographic information system (GIS). **Wat. Sci. Tech.**, **38(12)**: 15-22, 1998.
- LEE, K.M.; KRUSE, H.; WASSERMANN, O. - The pattern of organochlorines in mussels *Mytilus edulis* L. from the South West Baltic Sea. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, **31**: 68-76, 1996.
- LEES, D.N. ; HENSHILWOOD, K. ; GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W. - Detection of small round-structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 4418-4424, 1995.
- LEES, D.N. ; HENSHILWOOD, K. ; DORÉ, W. - Development of a method for detection of enterovirus in shellfish by PCR with poliovirus as a model. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60(8)**: 2999-3005, 1994.
- LEVINTON, J.S., WARD, E.J.; THOMPSON, R.J. - Biodynamics of particle processing in bivalve molluscs: models, data, and future directions. **Invertebr. Biol.** **115(3)**: 232-242, 1996.
- LEWIS, G.D. & METCALF, T.G., - Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from

- oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54(8)**:1983-1988, 1988.
- LINHARES, A.C.; GABBAY, I.; MASCARENHAS, P.; FREITAS, R.B.; FLEWETT, T.H.; BEARDS, G.M. - Epidemiology of rotavirus subgroups and serotypes in Belem, Brazil: a three-year study. *Ann. Inst. Pasteur/Virol*, **139**: 89-99, 1988.
- LIU, M.; OFFIT, P.A.; ESTES, M.K. - Identification of the simian rotavirus SA11 genome segment 3 product. *Virology*, **163**: 26-32, 1988.
- LÓPEZ, S.; ARIAS, C.F.; MENDES, R.T.; ESPEJO, R.T. - Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology*, **154**: 224-227, 1985.
- MAGALHÃES, A.R.M. - **Teor de proteínas do mexilhão *Perna perna* (Linné, 1758) (mollusca: bivalvia), em função do ciclo sexual.** São Paulo, 1985. (Tese - Mestrado - Universidade de São Paulo).
- MAKINO, M.; TANABE, Y.; SHINOZAKI, K.; MATSUNO, S.; FURUYA, T. - Haemorrhagic shock and encephalopathy associated with rotavirus infection. *Acta Paediatr.*, **85**: 632-634, 1996.
- MASCARENHAS, J.D.P.; GUSMÃO, R.H.P.; BARARDI, C.R.M.; PAIVA, F.L.; SIMÕES, C.O.; GABBAY, I.B.; MONTEIRO, T.A.F.; LINHARES, A.C. - Characterization of rotavirus P genotypes circulating among paediatric inpatients in northern Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **41(3)**: 165-170, 1999.
- MASCARENHAS, J.D.P.; PAIVA, F.L.; BARARDI, C.R.M.; GABBAY, I.B.; SIMÕES, C.O.; LINHARES, A.C. - Rotavirus G and P types in children from Belém, northern Brazil, as determined by RT-PCR: occurrence of mixed P type infections. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, **16(1)**: 8-14, 1998.
- MASON, B.B.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K. - Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.*, **46**: 413-423, 1983.
- MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H.; SATO, M.I.Z.; SANCHEZ, P.S.; RIVERA, I.G.; MARTINS, M.T. - Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**: 281-287, 1994.
- MAURER, H.R. - Towards chemically-defined, serum-free media for mammalian cell culture. In: FRESHNEY, R.I. , ed. - **Animal cell culture: a practical approach.** Washington DC, Oxford, 1986. p.13-31.
- Mc DANIELS, A.E.; COCHRAN, K.W.; GANNON, J.J.; WILLIAMS, G.W. - Rotavirus and reovirus stability in microorganism-free distilled and waste waters. *Wat. Res.*, **17**: 1349-1353, 1983.
- Mc NULTY, M.S. - Rotaviruses. *J. Gen. Virol.* **40**: 1-18, 1978.
- MEDEIROS, R.P.; POLETTE, M.; VIZINHO, S.C. - **Caracterização sócio-econômica e cultural das comunidades pesqueiras artesanais do litoral centro norte.** Itajaí, 1996. 40p. (não publicado)
- MEGLITSCH, P.A & SCHRAM, F.R. - Mollusca. In: _____ - **Invertebrate Zoology.** 3.ed. New York, Oxford University Press, 1991. p. 212-273.
- MEHNERT, D. U. & STEWIEN, K. E. - Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 140-143, 1993.

- MELNICK, J.L. - Human enteric virus in sediments, sludges, and soils: an overview. In: RAO, V.C. & MELNICK, J.L., eds. - **Human enteric virus in sediments, sludges, and soils**. Boca Raton, FL, CRC Press, 1987. p. 1-2.
- MELNICK, J.L. & GERBA, C.P. - The ecology of enterovirus in natural waters. **Crit. Rev. Environ. Control**, **10**: 65-93, 1980.
- MELNICK, J.L.; GERBA, C.P.; WALLIS, C. - Viruses in water. **Bull. WHO**, **56**: 499-508, 1978.
- METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. - Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology – a trip of over 50 years. **Annu. Rev. Microbiol.**, **49**: 461-487, 1995.
- METCALF, T.G.; MOULTON, E.; ECKERSON, D. - Improved method and testing strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, **39**: 141-152, 1980.
- METCALF, T.G. & STILES, W.C. - The accumulation of enteric viruses by the oyster *Crassostrea virginica*. **J. Infect. Dis.** **115**: 68-76, 1965.
- MIOSSEC, L.; Le GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; COMPS, M.A.; POMMEPUY, M. – Possible relation between a winter of acute gastroenteritis in France and viral contamination of shellfish. **J. Shellfish Res.**, **17(5)**: 1661-1664, 1998.
- MORASCA, L. & GERBA, E. – Flow cytometry. In: FRESHNEY, R.I., ed. – Animal cell culture: a practical approach. Washington DC, Oxford, 1986. p. 1125-1148.
- MORRIS, G.J.Jr. – Epidemiological studies. In: HACKNEY, C.R. & PIERSON, M.D., ed. – **Environmental indicators and shellfish safety**. New York, Chapman & Hall, 1994. p. 381-391.
- MUNIZ, E.M.; SALVADOR, A.J.; HELM, M.M. - Condition index, meat yield and biochemical composition of *Crassostrea brasiliiana* and *Crassostrea gigas* grow in Cabo Frio, Brasil. **Aquaculture**, **59**: 235-250, 1986.
- MURPHY, A.M.; GROHMAN, G.S.; SEXTON, M.F. – Infectious gastroenteritis in Norfolk Island and recovery of viruses from drinking water. **J. Hyg.**, **91**: 139-146, 1983.
- MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G.S.; THOMPSON, J.H. JR. - Reovírus. In: **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. p. 453-462.
- NARDONE, R.M. – Toxicity testing in vitro. In: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J., ed. - **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York, Academic, 1977. v.3. p. 471-495.
- NASCIMENTO, I.A. - Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura** **7(35)**: 871-876, 1983.
- NASSER, A.M. & OMAN, S.D. - Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. **Wat. Res.**, **33(7)**: 1748-1752, 1999.
- NATIONAL ADVISORY COMMITTEE - Microbial criteria for raw molluscan shellfish. **J. Food Protect.**, **55**: 463-480, 1992.
- NEWMAN, J.F.E.; BROWN, F.; BRIDGER, J.C.; WOODE, G.N. - Characterization of a rotavirus. **Nature**, **258**: 631-633, 1975.

- NISHIMURA, S.; USHIJIMA, H.; NISHIMURA, S.; SHIRAIISHI, H.; KANAZAWA, C.; ABE, T.; KANEKO, K.; FUKUYAMA, Y. - Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of the reverse transcription polymerase chain reaction. **Brain Dev-JPN**, **15**: 457-459, 1993.
- O'CONNOR, T.P.; CANTILLO, A.Y.; LAUENSTEIN, G.G. - Monitoring of temporal trends in chemical contamination by the NOAA-National Status and Trends Mussels Watch project. In: KRAMER, K.J.M., ed. - **Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries**. Boca Raton, FL, CRC Press, 1994. p. 29-50.
- OGAWA, H.; TOKUNO, H.; SASAKI, M.; KISHIMOTO, T. - Distribution of enteropathogenic *E. coli* in oyster farm areas. **J. Food Hyg. Soc. Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)** **21(1)**: 5-12, 1980.
- PANCORPO, O.C.; EVANSHEN, B.G.; CAMPBELL, W.F.; LAMBERT, S.; CURTIS, S.K.; WOOLLEY, W. - Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**: 1803-1811, 1987.
- PATTI, A.M.; AULICINO, F.A.; SANTI, A.L. - Reovirus as indicators of enteric virus pollution. **Biologi Italiani**, **2**: 35-38, 1997.
- PERSING, D.H. - Target selection and optimization of amplification reactions. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J., ed. - **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Washington, DC, 1993. p.88-104.
- PINA, S.; PUIG, M.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R. - Viral pollution in the environmental and shellfish: human adenovirus detection by PCR as a index of human viruses. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64(9)**: 3376-3382, 1998.
- PLUSQUELLEC, A.; BEUCHER, M.; PRIEUR, D.; LE GAL, Y. - Contamination of the mussel, *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, by enteric bacteria. **J. Shellfish Res.**, **9(1)**: 95-101, 1990.
- PLUSQUELLEC, A.; BEUCHER, M.; LE LAY, C.; GUEGUEN, D.; LE GAL, Y. - Uptake and retention of *Salmoella* by bivalve shellfish. **J. Shellfish Res.**, **13(1)**: 221-227, 1994.
- POLI, C.R. - **O cultivo de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) no sul do Brasil**. Florianópolis, 1994. (Tese - Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina).
- PRIEUR, D. - Experimental studies of trophic relationships between marine bacteria and bivalve molluscs. **Kieler Meeresforsch. Sonderh.**, **5**: 376-383, 1981.
- RAO, V.C.; SEIDEL, K.M.; GOYAL, S.M.; METCALF, T.G.; MELNICK, J.L. - Isolation of enterovirus from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. **Appl. Environ. Microbiol.**, **48**: 404-409, 1984.
- RAPHAEL, R.A.; SATTAR, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S. - Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. **Can. J. Microbiol.**, **31**: 124-128, 1985.

- REGAN, P.M.; MARGOLIN, A.B.; WATKINS, W.D. - Evaluation of microbial indicators for the determination of the sanitary quality and safety of shellfish. **J. Shellfish Res.**, **12**: 95-100, 1993.
- REYNOLDS, K.A.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. - Detection of enterovirus in marine waters by direct RT-PCR and cell culture. **Wat. Sci. Tech.**, **31(5-6)**: 323-328, 1995.
- REYNOLDS, K.A.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. - Rapid PCR-based monitoring of infectious enterovirus in drinking water. **Wat. Sci. Tech.**, **35**: 423-427, 1997.
- RICHARDS, G.P.; BEMISS, J.A.; SAMPLE, J.D. - A simple planimetric method to quality cytotoxicity in cell culture monolayers. **J. Virol. Methods**, **20**: 33-38, 1988.
- RICHARDS, G.P. & HETRICK, F.M. - Detection of enteric virus in oysters from the environment. **Abstr. Am. Meet. Am. Soc. Microbiol.**, **88**: 290, 1988.
- RIPPEY, S.R. - Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. **Clin. Microbiol. Ver.**, **7(4)**: 419-425, 1994.
- RODERICK, G.E. & SCHNEIDER, K.R. - Depuration and relaying of molluscan shellfish. In: HACKNEY, C.R. & PIERSON, M.D., ed. - **Environmental indicators and shellfish safety**. New York, Chapman & Hall, 1994. p. 331-363.
- RODGER, S.M.; SCHNAGL, R.D.; HOLMES, I.H. - Biochemical and biophysical characterization of diarrhoea viruses of human and calf origin. **J. Virol.**, **16**: 1229-1235, 1975.
- ROOS, R. - Hepatitis epidemic conveyed by oysters. **Svenska Lakartidningen**, **53**: 989-1003, 1956.
- ROSE, J.B. & SOBSEY, M.D. - Quantitative risk assessment for viral contamination of shellfish and coastal waters. **J. Food Protect.**, **56(12)**: 1043-1050, 1993.
- RUPPERT, E.E. & BARNES, R.D. - Moluscos. In: _____ - Zoologia dos Invertebrados. 6.ed. São Paulo, ROCA, 1996. p. 353-484.
- SAIF, L.J. & JIANG, B. - Nongroup A rotaviruses of humans and animals. In: RAMIG, R.F., ed. - **Rotaviruses**. Berlin, Springer-Verlag, 1994. p. 339-371.
- SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F.; MANIATIS, T. - Gel electrophoresis of DNA. In: _____ - **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.
- SANTOS, N.; LIMA, R.C.C.; PEREIRA, C.F.A.; GOUVEA, V. - Detection of rotavirus types G8 e G10 among brazilian children with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, **36(9)**: 2727-2729, 1998.
- SATO, A. - Enteropathogenic *Escherichia coli* in commercial foods. **J. Food Hyg. Soc. Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)** **12(6)**: 473-77, 1971.
- SATO, M.I.Z.; MONTEIRO, C.K.; STOPPE, N.C.; SANCHEZ, P.S.; OSTINI, S.; MATTÉ, G.R. - Shellfish and marine water microbiological quality. **Environ. Toxic. Water**, **7**:95-105, 1992.
- SATTAR, S.A.; RAPHAEL, R.A.; SPRINGTHORPE, V.S. - Rotavirus survival in conventionally treated drinking water. **Can. J. Microbiol.**, **30**: 653-656, 1984.
- SATTAR, S.A. - Virus survival in receiving waters. In: GODDARD, M. & BUTLER, M. - **Virus and wastewater treatment**. Toronto, Pergamon Press, 1981. p.91-108.

- SCHWABB, K.J., De LEON, R.; SOBSEY, M.D. - Concentration and purification of beef extracts mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse-transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** **61**: 531-537, 1995.
- SHAW, R.D.; VO, P.T.; OFFIT, P.A.; COULSON, B.S.; GREENBERG, H.B. - Antigenic mapping of the surface proteins of Rhesus rotavirus. **Virology**, **155**: 434-451, 1986.
- SHIM, W.J.; OH, J.R.; KAHNG, S.H.; SHIM, J.H.; LEE, S.H. - Accumulation of tributyl- and triphenyltin compounds in pacific oyster *Crassostrea gigas*, from the Chinhae Bay System, Korea. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, **35**: 41-47, 1998.
- SIMMONDS, P. - Polymerase chain reaction. In: DESSELBERGER, U., ed. - **Medical virology: a practical approach**, Oxford, 1995, p. 107-145.
- SMAAL, A.C. & WIDDOWS, J. - The scope for growth of bivalves as an integrated response parameter in biological monitoring. In: KRAMER, K.J.M., ed., **Biomonitoring of coastal waters and estuaries**. Boca Raton FL, CRC Press, 1994. p.247-267.
- SMITH, A.W.; VEDROS, N.A.; AKERS, T.F.; GILMARTIN, W.G. - Hazards of disease transfer from marine mammals to land animals: review and recent findings. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **173**: 1131-3, 1978.
- SMITH, E.M. & GERBA, C.P. - Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, **43**: 1440-1450, 1982.
- SOBSEY, M.D.; CARRICK, R.J.; JENSEN, H.R. - Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **36**: 121-128, 1978.
- SOBSEY, M.D. - Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. **Wat. Sci. Tech.**, **21**: 179-195, 1989.
- SOBSEY, M.D.; DAVIS, A.L.; RULLMAN, V.A. - Persistence of hepatitis A virus and other viruses in depurated eastern oysters. **Proceedings Oceans'87 Coastal and Estuarine Pollution.**, **5**: 1740-1745, 1987.
- SPELLMANN, S.K.; TRAUB, F.; SCHWYZER, M.; WYLER, R. - Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. **Appl. Environ. Microbiol.**, **53**: 2077-2081, 1987.
- STEINMANN, H. - Detection of rotavirus in sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, **41**: 1043-1045, 1981.
- ST-JEAN, S.D.; COURTENAY, S.C.; PELLETIER, É; ST-LOUIS, R. - Butyltin concentrations in sediments and blue mussels (*Mytilus edulis*) of the southern gulf of St. Lawrence, Canada. **Environ. Technol.**, **20**: 181-189, 1999.
- STRAUB, T.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. - Detection of naturally occurring enterovirus and hepatitis A in undigested anaerobically digested sludge using the polymerase chain reaction. **Can. J. Microbiol.**, **40**: 884-888, 1994.
- STREISSLE, G.; SCHÖBEL, W.; HEWLETT, G. - Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus. **Adv. Cell Cult.**, **1**: 67-90, 1981.
- SUÑÉN, E. & SOBSEY, M.D. - Recovery and detection of enterovirus, hepatitis A virus and Norwalk virus in harshell clams (*Mercenaria mercenaria*) by RT-PCR methods. **J. Virol. Methods**, **77**: 179-187, 1999.

- SZEFER, P.; IKUTA, K.; KUSHIYAMA, S.; FRELEK, K.; GELDON, J. - Distribution of trace metals in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and crabs from the east coast of Kyushu Island, Japan. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **58**: 108-114, 1997.
- TAKAHASHI, S.; OKI, J.; MIYAMOTO, A.; KOYANO, S.; AZUMA, H.; OKUNO, A. - Encephalopathy associated with haemophagocytic lymphohistiocytosis following rotavirus infection. **Eur. J. Pediatr.**, **158**: 133-137, 1999.
- TANI, N.; DOHI, Y.; KURUMATANI, N.; YONEMASU, K. - Seasonal distribution of adenoviruses, enteroviruses and reoviruses in urban river water. **Microbiol. Immunol.**, **39(8)**: 577-580, 1995.
- TANIGUCHI, K. & URASAWA, S. - Diversity in rotavirus genomes. **Virology**, **6**: 123-131, 1995. (seminars)
- TEIXEIRA, O.A. & TEIXEIRA, P.L. - **Os pescadores artesanais**. Florianópolis, ACARPESC, 1986. 115p.
- TIERNEY, J.T.; FASSOLITIS, A.; VAN DONSEL, D.; RAO, V.C.; SULLIVAN, R.; LARKIN, E.P. - Glass wool hydroextraction methods for recovery of human enteroviruses from shellfish. **J. Food Protect.**, **43(2)**: 102-104, 1980.
- TIMENETSKY, M.C.S.T.; GOUVEA, V.; SANTOS, N.; CARMONA, R.C.C.; HOSHINO, Y. - A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. **J. Gen. Virol.**, **78**: 1373-1378, 1997.
- TIMENETSKY, M.C.S.T. & CARMONA, R.C.C. - Genotipos de rotavirus associados a gastroenterites humanas no estado de São Paulo. **Bol. Ins. Adolfo Lutz**, **1**: 5-6, 1999.
- TIMENETSKY, M.C.S.T.; GOUVEA, V.; SANTOS, N.; ALGE, M.; KISIELLIUS, J.J.; CARMONA, R.C.C. - Outbreak of severe gastroenteritis in adults and children associated with type G2 rotavirus. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, **14(2)**: 71-74, 1996.
- TIMENETSKY, M.C.S.T.; KISIELLIUS, J.J.; GRISI, S.J.F.E.; ESCOBAR, A.M.U.; UEDA, M.; TANAKA, I. - Rotavírus, adenovírus, astrovírus, calicivírus e "small round virus particles" em fezes de crianças, com e sem diarreia aguda, no período de 1987 a 1988, na grande São Paulo. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, **35(3)**: 275-280, 1993.
- TRAORE, O.; ARNAL, C.; MIGNOTTE, B.; MAUL, A.; LAVERAN, H.; BILLAUDEL, S.; SCHWARTZBROD, L. - Reverse transcriptase PCR detection of astrovirus, hepatitis A virus, and poliovirus in experimentally contaminated mussels: comparison of several extraction and concentration methods. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64(8)**: 3118-3122, 1998.
- TSAI, Y.; TRAN, B.; PALMER, C.J. - Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 363-366, 1995.
- USHIJIMA, H.; XIN, K.; NISHIMURA, S.; MORIKAWA, S.; ABE, T. - Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **32(12)**: 2893-2897, 1994.
- VON BONSDORFF, C.H.; HOVI, T.; MAKELA, P.; MORTINEN, A. - Rotavirus infection in adults in association with gastroenteritis. **J. Med. Virol.**, **2**: 21-28, 1978.

- WAIT, D.A.; HACKNEY, C.R.; CARRICK, R.J.; LOVELACE, G.; SOBSEY, M.D. - Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in herd shell clams. **J. Food Protect.**, **46**: 493-496, 1983.
- WALUM, E.; STENBERG, K.; JENSSEN, D. - How to culture cells. In: _____.- Understanding cell toxicology: principles and practice. New York, Ellis Horwood, 1990. 206p.
- WARD, J.E.; Mac DONALD, B.A.; THOMPSON, R.J.; BENINGER, P.G. - Mechanisms of suspension feeding in bivalves: resolution of current controversies by means of endoscopy. **Limnol. Oceanogr.**, **38**: 265-272, 1993.
- WARD, R.L.; BERSTEIN, D.I.; YOUNG, E.C. - Human rotavirus studies in volunteers of infectious dose and serological response to infection. **J. Infect. Dis.**, **154**: 871-877, 1986.
- WARD, R.L.; KNOWLTON, D.R.; SCHIFF, G.M.; HOSHINO, Y.; GREENBERG, H.B. - Relative concentrations of serum neutralizing antibody to VP3 e VP7 proteins in adults infected with a human rotavirus. **J. Virol.**, **62**: 1543-1549, 1988.
- WHITE, D.O. & FENNER, F.J. - Virus-induced changes in cells. In: _____ - Medical virology. 4.ed. San Diego, California, 1994. p.74-86.
- WHITTON, J.L.; HUNDLEY, F.; O'DONELL, B.; DESSELBERGER, U. - Silver staining of nucleic acids: application in virus research and in diagnostic virology. **J. Virol. Methods**, **7**: 185-198, 1983.
- WIDDOWS, J. & DONKIN, P. - Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: GOSLING, E., ed. - **The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture**. Elsevier, Amsterdam, 1992. p.383-424.
- WILDE, J.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. - Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 1300-1307, 1990.
- WILSON, I.G. - Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**: 3741-3751, 1997.
- WITTMAN, R.J. & FLICK, G.J. - Microbial contamination of shellfish: prevalence, risk to human health, and control strategies. **Annu. Rev. Public Health**, **16**: 123-140, 1995.
- WOODS, P.A.; GENTSCH, J.; GOUVEA, V.; MATA, L.; SIMHON, M.; SANTOSHAM, Z.; BAI, S.; URASAWA, S.; GLASS, R.I. - Distribution of serotypes of human rotavirus in different populations. **J. Clin. Microbiol.**, **30(4)**: 781-785, 1992.
- WRIGTH, S.H. - A nutritional role for amino acid transport in filter-feeding marine invertebrates. **Am. Zool.**, **22**: 261-302, 1982.
- WU, H., TANIGUCHI, K., WAKASUGI, F., UKAE, S., CHIBA, S., OHSETO, M., HASEGAWA, A., URASAWA, T.; URASAWA, S. - Survey on the distribution of the gene 4 alleles of human rotaviruses by PCR. **Epidemiol. Infect.**, **112**: 615-622, 1994
- ZHOU Y.L.; ESTES, M.E.; JIANG, X.; METCALF, T. - Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus from shellfish by hibbridization tests. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57(10)**: 2963-2968, 1991.

8. ANEXOS

Anexo 1 – Procedimento para extração de RNA com TRIZOL[®]

Passos	Procedimentos
1	Colocar 250 μ l de fluido viral ou de extratos de ostra em tubos Eppendorf
2	Adicionar 750 μ l de TRIZOL [®] a cada tubo
3	Homogeneizar várias vezes com a pipeta
4	Incubar a 15-30°C, durante 5min
5	Adicionar 200 μ l de clorofórmio a cada tubo. Agitar vigorosamente com as mãos durante 15seg
6	Incubar a 15-30°C, durante 2 a 15min
7	Centrifugar até 12.000Xg, a 4°C, durante 15min
8	Transferir a fase aquosa para novo tubo e adicionar 500 μ l de álcool isopropílico
9	Incubar a 15-30°C, durante 10min
10	Centrifugar até 12.000Xg, a 4°C, durante 10min
11	Remover o sobrenadante
12	Lavar o precipitado (invisível) com 1ml de etanol 75%
13	Misturar a amostra com vortex
14	Centrifugar até 7.500Xg, a 4°C, durante 5min
15	Descartar o sobrenadante. Secar o precipitado ao ar por 5 a 10min
16	Dissolver o precipitado em água livre de RNase

Anexo 2 – Diluições do RNA obtido a partir do fluido infeccioso do rotavírus símio SA11 (G3) e concentrações equivalentes.

Diluições do RNA viral	Concentração	
	ng	ffu
Puro	800	1×10^6
1:5	160	5×10^5
1:10	80	$2,5 \times 10^5$
1:20	40	$1,25 \times 10^5$
1:40	20	$6,2 \times 10^4$
1:80	10	$3,12 \times 10^4$
1:160	5	$1,56 \times 10^4$
1:320	2,5	$7,8 \times 10^3$
1:640	1,25	$3,9 \times 10^3$
1:1.280	0,65	$1,95 \times 10^3$
1:2.560	0,31	975
1:5.000	0,16	487
1:10.000	0,08	243
1:20.000	0,04	121
1:40.000	0,02	60,9
1:80.000	0,01	30,4
1:160.000	0,005	15,2

Anexo 3 - Diluições do RNA do rotavírus símio SA11 (G3) obtido a partir do extrato tissular de ostras experimentalmente inoculadas (A2) e concentrações equivalentes (ffu).

Diluições do extrato A2	Concentração (ffu)
puro	1×10^5
1:5	2×10^4
1:10	1×10^4
1:20	5×10^3
1:40	$2,5 \times 10^3$
1:80	$1,25 \times 10^3$
1:160	625
1:320	312
1:640	156
1:1.280	78
1:2.560	39
1:5.000	19
1:10.000	9,8
1:20.000	4,9
1:40.000	2,4
1:80.000	1,2
1:160.000	0,6
1:320.000	0,3
1:640.000	0,15
1:1.280.000	0,07
1:2.560.000	0,03
1:5.000.000	0,015

Anexo 4 – Diluições do extrato tissular de ostras experimentalmente inoculadas com fluido infeccioso do rotavírus símio SA11 (extrato A2) e concentração de partículas virais equivalentes (ffu) utilizadas para o experimento de citopatogenicidade.

Diluições	Concentração (ffu)
1:2	$2,5 \times 10^5$
1:4	$1,25 \times 10^5$
1:8	$6,25 \times 10^4$
1:16	$3,12 \times 10^4$
1:32	$1,56 \times 10^4$
1:64	$7,8 \times 10^3$
1:128	$3,9 \times 10^3$
1:256	$1,95 \times 10^3$
1:500	976
1:1.000	488