



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA,
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA APLICADA



**ESTUDO TEMPORAL DA CONTAMINAÇÃO
MICROBIOLÓGICA DE OSTRAS SUBMETIDAS A UM
AMBIENTE ALTAMENTE IMPACTADO**

Mariana Rangel Pilotto

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

Co-orientadora: MSc. Doris Sobral Marques Souza

**Florianópolis
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA**

Mariana Rangel Pilotto

**ESTUDO TEMPORAL DA CONTAMINAÇÃO
MICROBIOLÓGICA DE OSTRAS SUBMETIDAS A UM
AMBIENTE ALTAMENTE IMPACTADO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial
para obtenção do título de Licenciado e
Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Regina
Monte Barardi
Co-orientadora: MSc. Doris Sobral
Marques Souza

Florianópolis
2011

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais. À minha mãe, por ter lutado tanto para que eu chegasse até aqui, nunca deixando que os obstáculos da vida a impedissem de fazer o melhor para suas filhas e ser feliz. Devo a você todas as minhas conquistas. Ao meu pai, por ser acima de tudo um amigo e sempre ter me incentivado a fazer o que eu gostasse. Sei que você está sempre acompanhando meus passos.

À professora Dr^a. Célia Regina Monte Barardi, pela valiosa orientação, por ter confiado em mim e me incentivado durante todo o estágio e realização do TCC. Eu não podia ter pedido uma melhor pessoa para ter me acompanhado neste período!

Ao “seu” Aílton, por ter me auxiliado em todas as coletas, sempre disposto a tornar este trabalho o melhor possível. Eu não teria conseguido realizar esse trabalho sem sua ajuda, por isso, muito obrigada!

À minha querida co-orientadora Doris, por ser a pessoa que é, por ter guiado meus passos e ter me ajudado em tantos momentos, dentro e fora do laboratório.

Aos membros desta banca, Prof^a. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero e Dr^a. Patrícia Hermes Stoco, por terem aceitado avaliar meu trabalho. Vocês me acompanham desde o início da minha vida acadêmica, e sempre foram duas mulheres que admirei, é um honra para mim tê-las como avaliadoras. À Dr^a. Caroline Rigotto Borges, pelas valiosas dicas ao longo do trabalho, pelo auxílio na padronização da placa de lise e por estar mais uma vez me ajudando sendo suplente da banca deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do LVA Ambiental, Abú, Vanessa, Aline, Mari, Gis e Nicésio, por terem me ajudado tanto a chegar até aqui, e pelas muitas risadas e babagens compartilhadas neste tempo de convívio.

A todo o pessoal do LVA, por terem me recebido de braços abertos, pelas ajudas, discussões, risadas e comilanças!

A todos do terceiro andar do MIP, pelas conversas e risadas de corredor, em especial ao pessoal da Proto e aos professores Mário Steindel e Edmundo Grisard por tudo o que me ensinaram nos dois anos de convivência e pela iniciação na vida científica.

Aos meus grandes amigos Bar (apelido Larissa), Abú (apelido Lucas), PV (apelido Rafael), André, Ju, ao restante da 062 e da Bio, e aos meus grandes professores/amigos Paulo e Jorge, por terem tornado

esses 5 anos de faculdade inesquecíveis e como muitas histórias para contar!

Ao meu namorado e companheiro “Bobby”, que acima de tudo sempre esteve ao meu lado, nos momentos bons ou ruins, nunca duvidando da minha capacidade ou da nossa relação. Sem você, meu caminho até aqui teria sido muito mais difícil.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa.

A minha irmã Isabel e toda a minha família e meus amigos que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho.

Mariana Rangel Pilotto

RESUMO

O Estado de Santa Catarina é responsável por 90% do cultivo nacional de ostras. Devido ao seu hábito filtrante, as ostras são capazes de bioacumular patógenos em seus tecidos, incluindo vírus causadores de doenças humanas. A poluição nos locais de cultivo tem aumentado. Conseqüentemente, um controle sanitário dessas águas e dos produtos de maricultura torna-se urgente. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito acumulativo da contaminação microbiológica em ostras *Crassostrea gigas* alocadas em um local altamente impactado pela ação humana. Vinte dúzias de ostras foram alocadas no bairro Saco Grande em Florianópolis, SC. Foi realizada uma coleta mensal de duas dúzias de ostras e 10L de água, além do monitoramento da mortalidade das ostras e das condições climáticas, no período de fevereiro a setembro de 2011. Nas amostras de ostra e água investigou-se a presença de cópias genômicas (cg) dos Adenovírus Humano (HAdV), Vírus da Hepatite A (HAV), Poliomavírus (JCPyV) e Norovírus (HuNoV) G1 e G2, além de *Salmonella* sp na carne das ostras e *E. coli* na água. As amostras teciduais de ostras apresentaram 50% de positividade para HAdV (variando de $7,00 \times 10^4$ a $3,90 \times 10^9$ cg/ g), e as amostras de água do mar, 62,5 % de positividade (de 2×10^5 a 8×10^7 cg/ L) . Duas amostras teciduais de ostras e uma amostra de água foram positivas para HAV. Nenhuma amostra tecidual ou água do mar foi positiva para os vírus JCPyV ou HuNoV (G1 e G2). As amostras positivas no qPCR para HAdV foram avaliadas para a infecciosidade viral, sendo a coleta de água do mar do mês de maio, a única com vírus viáveis. Quatro amostras foram positivas para *Salmonella* spp., as duas primeiras, coincidindo com o período de alta temporada turística da ilha, e as duas últimas, meses com temperatura baixa da água. Os meses de maio, julho e agosto foram positivos para *E. coli*, com 2.400, 400 e 500 UFC/100ml, dados que coincidiram com período de chuvas nos dias anteriores à coleta. Além disso, houve uma relação direta entre a temperatura da água e a mortalidade de ostras, sendo abril o mês com maior temperatura (24°C) e maior mortalidade (8 ostras), e o mês de julho com a menor temperatura (16°C) e menor mortalidade (zero). O ensaio de infecciosidade por ensaio de placas de lise mostrou 10% de recuperação na técnica da floculação orgânica da água do mar para partículas virais infecciosas. Concentrados virais da técnica da floculação foram congelados a - 80°C e descongelados em tempos pré-determinados para avaliar a ação do congelamento sobre as amostras. Na detecção por cópias genômicas, não houve diferença no período de 10 semanas de

congelamento. Já a detecção de vírus viáveis mostrou uma queda de aproximadamente 1 log viral (90%). Não houve relação direta da contaminação viral com a bacteriana. Estes resultados e a liderança do Estado de S.C. na produção de ostras demonstram a importância de um controle da produção e monitoramento do ambiente.

Palavras-chave: Ostras, vírus, água do mar.

ABSTRACT

Santa Catarina state is responsible for 90% of the national production of oysters. The pollution in shellfish-growing areas has been increasing, highlighting the need of sanitary control of these areas. The aim of this study was to examine the prevalence of enteric viruses in environmentally polluted oysters and sea water and to evaluate their relationship to microbial indicators. Twenty dozens of oysters *Crassostrea gigas* were placed in a coastal polluted area at Saco Grande, Florianópolis. Groups of 24 oysters and 10L of sea water were collected monthly and analyzed by qPCR for Adenovirus (HAdV), Hepatitis A Virus (HAV), Polyomavirus and Norovirus G1 and G2, and for the presence of *Salmonella* sp. in the oysters and *Escherichia coli* in the water. The oyster mortality and climate conditions were also measured. 50% of the oyster samples (from 7×10^4 to $3,90 \times 10^9$ gc/ g) and 62.5% of the water samples (from 2×10^5 to 8×10^7 gc/ L) were positive for HAdV. Two oyster samples and one water sample were positive for HAV. None of the samples were positive for JCPyV or HuNoV (G1 and G2). The positive samples for HAdV were analysed for the infectivity of the viruses, and the water sample from may presented viable viruses. *Salmonella* sp. was found in four oyster samples, the first two during the period of high tourist season in the island, and the other two samples during the winter. The forth, sixth and seventh samples were the only samples to exceed the allowed number of *E. coli* (2.400, 400 and 500 CFU/100mL), probably due to the heavy rainfall occurred in the days prior to the collection of the oysters and the sea water. Concomitant with these findings, oyster mortality seemed to be related to the increase in water temperature (3rd month with 24°C and 8 dead animals, and 6th month without mortality and 16°C). Overall, there was no relationship between the levels of indicator microorganisms and the presence of enteric viruses. It was not observed a pathogen accumulation during the months of the study, indicating that these animals are able to deparurate themselves even in polluted environment.

Keywords: Oysters, viruses, seawater.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus centígrados
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A549	Células epiteliais de carcinoma de pulmão humano
Cg	cópias genômicas
HAdV	Adenovírus Humano
HAdV-2	Adenovírus Humano tipo 2
HAV	Vírus da Hepatite A
HCl	Ácido clorídrico
HuNoV	Norovírus Humano
JCPyV	Poliomavírus cepa JC
L	litro
mL	mililitro
MNV-1	Norovírus Murino 1
MS	Ministério da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativo
RAW 267-4	Macrófagos derivados de <i>Mus musculus</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcrição reversa
SC	Santa Catarina
SFB	Soro fetla bovino
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFP	Unidades Formadoras de Placa
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Coleta e tratamento de esgoto.....	18
1.2. Legislação Brasileira para moluscos e áreas de cultivo.....	18
1.3. Vírus Entéricos.....	19
1.4. Estabilidade viral no ambiente marinho e metodologias de detecção.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Delineamento Experimental.....	26
3.2. Análises Microbiológicas.....	27
3.3. Extração dos Ácidos Nucleicos.....	30
3.4. PCR quantitativo (qPCR)	30
3.5. Vírus e Células.....	34
3.6. Análise Estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. Padronização da técnica de placa de lise e titulação do fluido de HAdV-2.....	40
4.2. Titulação do fluido de MNV-1 pelo ensaio de placa de lise.....	40
4.3. Ensaio de citotoxicidade e teste de inibição da infecção viral pelas amostras ambientais.....	41
4.4. Recuperação e estabilidade viral na água do mar.....	43
4.5. Análises microbiológicas nas amostras ambientais.....	46
5. SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	55
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de moluscos bivalves tem sofrido um grande aumento nos últimos anos, passando de um milhão de toneladas em 1950 a 13,6 milhões de toneladas em 2005 (FAO, 2008). No Brasil, o cultivo de moluscos só passou a ser considerado como atividade econômica a partir de 1990, com as produções artesanais desenvolvidas no estado de Santa Catarina (FERREIRA et al., 2011). Apesar do início relativamente tardio, o Brasil é hoje o maior produtor de moluscos da América Latina (EPAGRI, 2009).

O Estado de Santa Catarina se destaca no Brasil como responsável por 95% da produção nacional de moluscos bivalves (SOUZA et al., 2009). Santa Catarina possui condições geográficas excelentes para o cultivo de organismos marinhos (RIGOTTO et al., 2010), pois possui áreas protegidas das intempéries como baías, estuários e enseadas, facilitando o manejo dos cultivos. Segundo dados da EPAGRI, Santa Catarina produziu um total de 15.635 t de moluscos em 2010, sendo que destas, 1.908 t foram de ostras. O município que mais contribuiu para a produção total de ostras do estado foi Florianópolis, com uma produção de 1.477 t, representando 77,4% da produção estadual (EPAGRI, 2010).

Apesar de oferecer condições favoráveis ao cultivo de moluscos, as baías e enseadas são ecossistemas muito sensíveis a modificações, pois são áreas semi-fechadas que podem receber uma forte pressão antrópica (VINATEA ARANA, 2000). A qualidade das águas dos locais de cultivo tem um impacto direto na qualidade dos moluscos ali cultivados. (BOSCH; ABAD; PINTÓ, 2005; SOUZA et al., 2012).

As ostras são animais que se alimentam através da filtração de partículas em suspensão na água, filtração que promove a concentração de partículas orgânicas, como algas e organismos planctônicos que servem como alimentos para a ostra. Como consequência desse hábito alimentar, as ostras podem bioacumular em seus tecidos diversos patógenos, inclusive patógenos humanos, eventualmente presentes nas águas de cultivo, tais como vírus entéricos, bactérias, protozoários e helmintos (SINCERO et al, 2006; SOUZA et al., 2012). Devido a esta característica, os moluscos bivalves recebem o nome de “bioindicadores” ou “monitores” de contaminação ambiental, sendo a eles atribuída a capacidade de evidenciar sintomas de um ambiente costeiro ou estuarino em estresse (CROCI; SUFFREDINI, 2003; SINCERO et al., 2006).

Nos últimos anos, tem sido detectado um aumento da poluição dos locais de cultivo de moluscos na Ilha de Santa Catarina, sendo detectados patógenos bacterianos e virais nos moluscos e nas águas de cultivo (RIGOTTO, et al., 2005; SINCERO, et al., 2006; SOUZA, et al., 2012). O aumento do descarte ilegal de efluentes de origem humana, não tratados ou inadequadamente tratados, nas águas oceânicas e a deficiente fiscalização, podem estar ligados ao crescimento populacional que a cidade de Florianópolis vem vivenciando nos últimos anos, incrementando assim a contaminação das águas costeiras por patógenos virais humanos.

1.1. COLETA E TRATAMENTO DE ESGOTO

De acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico realizada pelo IBGE no ano de 2008, 55% dos municípios brasileiros possuem coleta de esgoto, sendo que este número se refere somente à coleta e não ao tratamento adequado. No estado de Santa Catarina, somente 35% dos municípios possuem coleta de esgoto, dado que coloca o estado no 16º lugar brasileiro em porcentagem de domicílios atendidos por rede de esgoto (IBGE, 2008). Segundo dados da CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento) de 2010, 40% do esgoto gerado pela cidade de Florianópolis é tratado, o que revela um declínio na coleta e tratamento nos últimos anos, uma vez que, em 2007, 56% da cidade possuía tratamento de esgoto.

Os dados do IBGE se referem apenas à coleta, e não ao tratamento do esgoto. Quando existente, o tratamento nem sempre é capaz de prover efluentes tratados livres de vírus, como consequência, patógenos virais humanos são rotineiramente introduzidos em águas marinhas e de estuários, podendo afetar diretamente os locais de cultivo de moluscos (LA ROSA et al., 2010).

1.2. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA MOLUSCOS E ÁREAS DE CULTIVO

A regulamentação corrente, referente à qualidade dos moluscos e águas de cultivo na maioria dos países exportadores, está baseada somente em parâmetros bacterianos (coliformes e *Escherichia coli*).

A atual legislação brasileira para qualidade de moluscos bivalves, a Resolução nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância

Sanitária (ANVISA), exige unicamente a detecção de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva, não sendo necessária a avaliação de coliformes termotolerantes para moluscos “in natura”, (ANVISA, 2001). Apenas para moluscos congelados, secos, salgados ou cozidos a resolução prevê padrões aceitáveis de micro-organismos termotolerantes.

A qualidade das águas de cultivo de moluscos é determinada pela Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). De acordo com ela, a média geométrica da densidade de coliformes termotolerantes ou *E. coli*, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mililitros de água. Porém, como tais micro-organismos são facilmente inativados pelos procedimentos de tratamento de água ou efluentes, um número aceitável destas bactérias não assegura a inexistência de outros patógenos resistentes à inativação, tais como os vírus entéricos, fato que é demonstrado por diversos estudos realizados onde se enfatiza a falta de correlação entre as presenças de bactérias, protozoários e vírus no ambiente aquático (SOBSEY; DAVIS; RULLMAN, 1987; LEES, 2000; RICHARDS, 2001; WYN-JONES et al., 2011).

A pesquisa por vírus só é citada na portaria nº 518/2004 da ANVISA/MS para água de consumo humano, onde há a recomendação de que em complementação às análises de coliformes termotolerantes e *E. coli*, seja realizada a pesquisa de organismos patogênicos, com o objetivo de atingir, como meta, um padrão de ausência, dentre outros, de enterovírus, cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. (ANVISA, 2004). Entretanto, não há nenhuma mudança na lei brasileira no que se refere à obrigatoriedade de utilização destes micro-organismos como padrão de potabilidade até momento.

1.3. VÍRUS ENTÉRICOS

Dentre os vírus que infectam humanos, os vírus entéricos replicam-se no trato gastrointestinal humano e são excretados nas fezes e/ou urina em grandes quantidades (de 10^8 a 10^{11} partículas virais por grama de fezes), sendo capazes de contaminar direta ou indiretamente águas destinadas ao consumo humano (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001). Os vírus entéricos são causadores de diversas doenças, como gastroenterites, infecções respiratórias, conjuntivites, hepatites, meningites, encefalites e paralisia.

A dose infectante desses vírus é extremamente baixa, podendo variar de uma a dez partículas infecciosas (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001). Entretanto, um número elevado desses agentes pode infectar o homem de forma persistente e assintomática, podendo ser eliminado em fezes e urinas de pessoas saudáveis por anos, se tornando importante fonte de infecção e podendo causar sérias doenças em crianças e imunossuprimidos (AGOSTINI et al., 1997; BOFFILMAS et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que pode haver detecção de vírus em tecidos de ostras, mesmo na ausência de detecção de bactérias (SOBSEY; DAVIS; RULLMAN, 1987; RICHARDS, 2001; FORMIGA-CRUZ et al., 2005; MCLEOD et al., 2009; SOUZA et al., 2012). Esses resultados evidenciam que um controle de qualidade sanitária baseado somente em parâmetros bacterianos, não garante a ausência de patógenos virais.

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2007), aproximadamente dois milhões de pessoas morrem a cada ano, na sua maioria, crianças menores de cinco anos, devido unicamente a doenças diarréicas associadas ao consumo de água e alimentos contaminados. Por todo o mundo, contaminantes virais têm sido relacionados a diversos surtos de gastroenterites após a ingestão de moluscos bivalves, ainda mais, tendo em vista o hábito de estes serem consumidos crus ou mal cozidos (MURPHY et al., 1979; MORSE; GUZEWICH; HANRAHAN, 1986; POTASMAN; PAZ; ODEH, 2002; CORRÊA et al., 2007; LE GUYADER et al., 2008; IWAMOTO et al., 2010).

Há cerca de 140 diferentes vírus entéricos humanos conhecidos, dentre estes se destacam os vírus de RNA fita simples (Ex: vírus da hepatite A e norovírus); vírus de RNA fita dupla (Ex: rotavírus) e de DNA fita dupla (Ex: adenovírus e poliomavírus) (LE GUYADER; et al., 2000; GERBA, 2005).

1.3.1. Vírus da Hepatite A (HAV)

O vírus da hepatite A (HAV) é um vírus pequeno, tamanho de 30 nm, com capsídeo de formato icosaédrico, não envelopado e genoma RNA de fita simples de polaridade positiva (CUTHBERT, 2001; HOLLINGER; EMERSON, 2007). A replicação do vírus da hepatite A *in vivo* se dá na maioria das vezes em hepatócitos e em células epiteliais do trato gastrointestinal e *in vitro* em outros tipos de células não hepáticas.

Devido as suas características físico-químicas, o HAV é muito resistente, sobrevivendo por dias, ou meses, quando em contato com diferentes matrizes contaminadas, como águas de superfície, águas residuais, sedimentos marinhos e ostras (CUTHBERT, 2001; HOLLINGER; EMERSON, 2007). É um dos vírus entéricos humanos mais comuns, sendo causador de diversos surtos relacionados ao consumo de água ou alimentos contaminados em diversos países (KOZLOWSKI et al., 2007; GUILLOIS-BÉCEL et al., 2009; PETRIGNANI et al., 2010; SCHEIFELE et al., 2010). Cerca de 40% dos surtos de hepatite A são causados pelo consumo de moluscos cultivados em áreas contaminadas por descargas de esgotos não tratados (PINTÓ, et al., 2010).

1.3.2. Norovírus Humano (HuNoV)

O gênero *Norovirus* (HuNoV), da família Caliciviridae, é o principal causador de gastroenterites não bacterianas em todo o mundo, sendo estimados 23 milhões de casos por ano nos Estados Unidos da América (GENTRY; VINJÉ; LIPP, 2009). Possuem como características estruturais a ausência de envelope lipídico, capsídeo de formato icosaédrico contendo genoma formado por RNA fita simples de senso positivo, com um tamanho aproximado de 27 a 35 nm (SCIPIONE et al., 2008). Os norovírus são capazes de causar infecções em diversos animais, sendo classificados em cinco genogrupos (G): os que infectam humanos (GI, II e IV), bovinos (GIII), murino (GV), porcino (GII) e felinos (GIV) (ATMAR, 2010).

Estudos epidemiológicos demonstram que o genogrupo GII é o mais comumente encontrado, causando 75 a 90% dos casos relatados de norovirose no mundo, principalmente nos meses de inverno (NORDGREN et al., 2009). O genogrupo GI foi identificado como causador de surtos associados ao consumo de moluscos bivalves (LE GUYADER et al., 2009). Dentre as características que permitem que os HuNoVs sejam tão prevalentes, é a necessidade de uma pequena dose infectante (menos de 10 partículas virais), o longo período que os vírus podem ser excretados nas fezes de um portador, mesmo que assintomático, a alta estabilidade do vírus em elevadas concentrações de cloro e a capacidade de suportar temperaturas de até 60 °C (PATEL et al., 2008).

Ainda não há disponível um modelo de cultivo celular adequado para os norovírus humanos. O norovírus murino (MNV) é o único que apresenta capacidade de replicação *in vitro* em cultura de células

(WOBUS; THACKRAY; HERBERT, 2006), sendo esta cepa utilizada como um substituto para os demais norovírus em diversos ensaios de quantificação e estabilidade (BAERT, et al., 2008).

1.3.3. Adenovírus Humano (HAdV)

Os adenovírus humanos (HAdV) pertencem à família Adenoviridae, sendo que atualmente, são conhecidos 52 sorotipos (AdV1-AdV52), distribuídos em seis subgêneros (A-F) (BÁNYAI, et al., 2009). Possuem como características estruturais a ausência de envelope lipídico, capsídeo de formato icosaédrico, com o genoma composto por DNA fita dupla (BERK, 2007; MENA; GERBA, 2008).

Os adenovírus podem ser transmitidos ao homem através da inalação de aerossóis, no contato pessoa-pessoa e via fecal-oral (através da ingestão de água ou alimentos contaminados) (FORMIGA-CRUZ et al., 2002; RIGOTTO et al., 2010; VAN HEERDEN et al., 2005) causando enfermidades que acometem as vias respiratórias superiores e inferiores causando faringites, pneumonias, doença respiratória aguda, febres; infecções oculares agudas, como conjuntivites; cistites; gastroenterites e diarreia (ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001; HARAMOTO et al., 2007; KUO et al., 2010).

Apesar de nem todos os sorotipos de adenovírus serem responsáveis por causar gastroenterites, todos podem ser transmitidos pela via fecal-oral, sendo excretados em concentrações na ordem de até 10^{11} partículas virais por grama de fezes, sendo esta a principal via de transmissão do vírus (HARAMOTO et al., 2007). A infecção pode ocorrer através do contato com águas contaminadas pela ingestão, inalação ou contato direto com os olhos. A EPA (Agência Norte Americana de Proteção do Meio Ambiente) listou os adenovírus como um dos quatro tipos de vírus candidatos à parâmetro de contaminação do ambiente aquático, junto com os calicivirus, coxsackievirus e echovirus (CROMEANS et al., 2008).

Surtos de gastroenterites ou outras enfermidades causadas pelos adenovírus vêm sendo relatados por diversos estudos e possuem em comum a veiculação do vírus através do ambiente aquático, como por exemplo, em águas utilizadas para recreação, como água do mar, piscinas, rios; água de superfície; água de consumo tratada ou não tratada; águas subterrâneas e águas residuais (XAGORARAKI et al., 2007; LAMBERTINI et al., 2008; SIRIKANCHANA; SHISLER; MARIÑAS, 2008).

1.3.4. Poliomavírus

Os poliomavírus (JCPyV) pertencem à família Poliomaviridae, apresentando a partícula viral de diâmetro variando entre 40-45 nm, com genoma de DNA circular fechado, de fita dupla. Por não possuírem envelope, são resistentes a solventes lipídicos e a inativação por formalina (IMPERIALE; MAJOR, 2007).

Os poliomavírus vêm sendo recentemente estudados como um modelo de vírus emergente para a indicação de contaminação fecal, uma vez que são encontrados com certa prevalência em diferentes amostras de esgoto analisadas em diferentes partes do mundo (HUNDESA, et al., 2006). A forma de transmissão ainda não é bem elucidada, mas sugere-se que seja através da transmissão fecal-oral e por via respiratória (BOFFIL-MAS et al., 2001; BOOTHPUR; BRENNAN, 2010). Entretanto, o JCPyV ainda não pode ser considerado um vírus entérico. Estes vírus são frequentemente excretados na urina, estima-se que a cepa JC, seja excretada por aproximadamente 40 a 80% da população, corroborando assim, para que sirvam como indicadores de contaminação ambiental por efluentes de origem humana (HUNDESA et al., 2006; MCNEES et al., 2005).

1.4. ESTABILIDADE VIRAL NO AMBIENTE MARINHO E METODOLOGIAS DE DETECÇÃO

Os vírus excretados pela via fecal são, em geral, não envelopados, o que lhes confere elevada resistência a condições ambientais adversas, podendo permanecer viáveis por longos períodos na água, resistindo a condições ambientais desfavoráveis ou letais para outros microrganismos, tais como variações de pH, elevadas temperaturas e elevada salinidade (GRIFFIN et al., 2003; BOSCH; ABAD; PINTÓ, 2005). Estes vírus possuem vantagens em relação às bactérias, como marcadores de eficiência do processo de descontaminação da água, sendo mais resistentes aos processos de desinfecção por cloração e radiação ultravioleta (GRIFFIN et al., 2003). Além disso, podem agregar-se a partículas sólidas do meio aquático, protegendo-se dos agentes físico-químicos de inativação (LECLERC; SCHWARTZBROD; DEI-CAS, 2002).

Os passos básicos para análise virológica da água do mar são amostragem, concentração, remoção de inibidores e detecção viral específica (BOSCH; ABAD; PINTÓ, 2005). Por se apresentarem dispersos nas águas, a concentração é um passo crítico nos ensaios de

detecção viral. Um bom método de concentração deve ser tecnicamente simples, rápido, promovendo uma alta recuperação viral, num volume final pequeno e com custo acessível (BOSCH; ABAD; PINTÓ, 2005).

Por sua fisiologia alimentar, a etapa de concentração viral, quando se pesquisa vírus nos tecidos das ostras não é tão crítica quanto nas águas, uma vez que esses animais bioacumulam em seus tecidos de 3 a 100 vezes mais partículas virais em relação à concentração destas partículas nas águas onde vivem (BUTT et al., 2004). O principal desafio encontrado é a grande quantidade de inibidores presentes em seus tecidos, fato que interfere negativamente nas reações enzimáticas, como na amplificação gênica.

A detecção dos vírus em amostras ambientais tornou-se mais sensível e eficaz com o advento das técnicas de biologia molecular, podendo ser realizada através de várias metodologias, como a reação em cadeia da polimerase (PCR e PCR em tempo real) (YEH et al., 2009). Esta última pode ser considerada uma forma de detecção rápida e quantificação precisa do genoma de organismos patogênicos em amostras ambientais (KO et al, 2005). Porém, uma das limitações das técnicas moleculares é a incapacidade de determinar a infecciosidade viral. Dessa forma, técnicas que possibilitem detectar vírus viáveis em amostras ambientais, como técnicas de cultura celular, são ferramentas importantes quando se deseja assegurar a ausência do risco de contaminação por patógenos virais, principalmente em áreas utilizadas para maricultura e lazer como é o litoral da Ilha de Santa Catarina.

Considerando a importância de Florianópolis no cenário nacional de produção de moluscos, o conhecimento acerca dos contaminantes microbiológicos presentes na água de cultivo, bem como a consequência da constante permanência desses animais em áreas contaminadas por um longo período de tempo são de alta relevância.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito cumulativo da contaminação microbiológica em ostras *Crassostrea gigas* em um local altamente impactado pela ação humana, bem como a cinética de decaimento viral em amostras de água do mar, inoculadas com HAdV-2 e MNV-1 e estocadas à - 80°C.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Alocar 20 dúzias de ostras da espécie *C. gigas* num local altamente poluído localizado no bairro Saco Grande, Florianópolis, SC.
- Coletar mensalmente e por um período de oito meses, 2 dz de ostras e 10L de água do mar do ponto onde as ostras foram inicialmente alocadas.
- Monitorar mensalmente a temperatura da água do mar do local de cultivo das ostras, o índice pluviométrico e a mortalidade das ostras estudadas por um período de oito meses.
- Quantificar o número de cópias genômicas de HAdV, HAV, JCPyV e HuNoV nas amostras de ostra e água.
- Investigar a presença de *Salmonella* spp. e *E. coli* nas amostras de ostras e água do mar, respectivamente.
- Avaliar a infecciosidade de HAdV nas amostras positivas para genomas.
- Estudar a cinética de infecciosidade de HAdV em amostras de água do mar estocadas a -80°C.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No mês de fevereiro de 2011, vinte dúzias de ostras da espécie *Crassostrea gigas*, adquiridas de produtores da Ilha de Santa Catarina foram alocadas na baía norte do município de Florianópolis, SC, próxima ao bairro Saco Grande (figura 1).

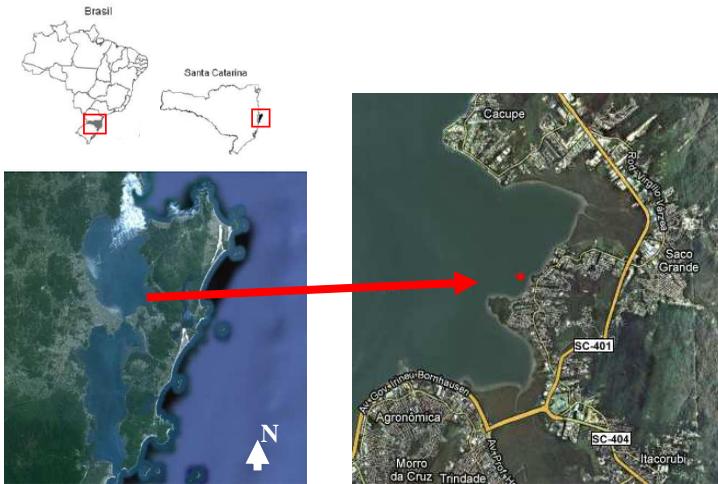


Figura 1. Foto de satélite retirada do Google Maps (www.googlemaps.com) ilustrando o ponto onde as ostras foram cultivadas. Bairro Saco Grande, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

O local avaliado nesse trabalho é considerado altamente poluído por possuir descarte de esgoto, sem nenhum tratamento aparente, diretamente na água do mar, como é possível visualizar na figura 2. A balsa onde as ostras foram cultivadas estava situada a uma distância de cerca de 200 m à esse descarte.



Figura 2. Foto demonstrando a proximidade entre a balsa de alocação das ostras com um cano de descarte de esgoto. A distância entre eles é de aproximadamente 200 m. Fonte: Googlemaps (www.googlemaps.com).

3.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.2.1. Ostras

3.2.1.1 *Salmonella* spp.

Na avaliação da presença de *Salmonella* spp., seguindo as orientações da Resolução nº12 da ANVISA/2001, as conchas de uma dúzia de ostras foram descontaminadas com álcool 70%/10 min e abertas em ambiente asséptico, sendo toda a carne destes animais homogeneizada em um homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax (Modelo T25 basic, IKA Laborotechnik) e tratadas como uma única amostra. Deste homogenato, uma alíquota de 25g foi adicionada ao kit comercial de detecção Reveal *Salmonella* Test System® (Neogen Corporation), que consiste de dois meios de cultura, um inespecífico e outro específico para *Salmonella* spp, sendo considerado um teste completo e de sensível detecção. Primeiramente, a alíquota foi adicionada ao meio Revive® (não seletivo) diluído em 200 mL de água milliQ estéril e mantido por 2 h a 37 °C. Transcorrido o período de incubação foram adicionados 200 mL de água milliQ estéril contendo o meio Reveal® (meio seletivo Selenito de Cistina). Após 20 h de agitação constante a 42°C, 120 µL amostra foi avaliada com o uso de um dispositivo imunocromatográfico, disponível no kit, que detecta a presença de *Salmonella* spp. através de reações imunoenzimáticas. A

presença de uma segunda banda vermelha ao lado da banda controle significa resultado positivo de contaminação por *Salmonella* spp. (figura 3).

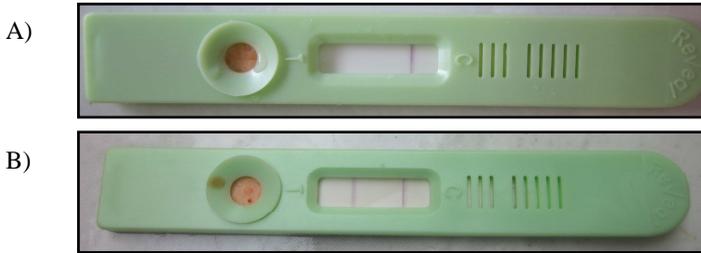


Figura 3: Visualização de resultados de detecção de contaminação por *Salmonella* spp. pelo Kit REVEAL Salmonella Test System[®].

A) Resultado Negativo. B) Resultado Positivo. Foto: Mariana Rangel Pilotto.

3.2.1.2. Análise Viral

Por não ser preconizada por nenhuma legislação brasileira, a amostra para análise viral da carne dos moluscos seguiu a coleta estabelecida, de 12 animais, para a análise bacteriana desse tipo alimento. As ostras foram descontaminadas antes de serem abertas, como descrito no item anterior, e dissecadas com a finalidade de se trabalhar somente com o tecido digestivo, já que estudos comprovam que estes tecidos concentram em maior quantidade os vírus bioacumulados (MCLEOD et al., 2009) e por ser conhecido que o glicogênio presente nos tecidos das ostras podem inibir as reações enzimáticas da PCR (ATMAR et al., 1993; MCLEOD et al., 2009) (figura 4). O tecido digestivo das ostras foi homogeneizado, com um homogeneizador, para a obtenção de uma solução tecidual líquida e homogênea.

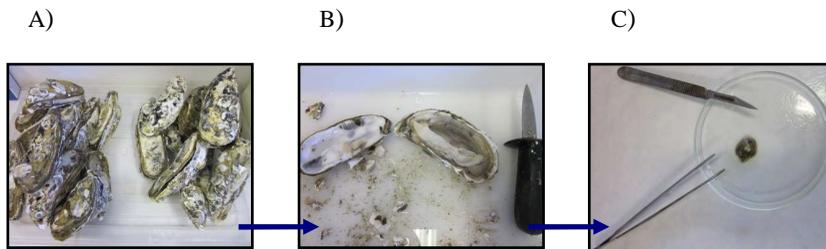


Figura 4. Representação do procedimento de abertura e dissecação das ostras.

A) Ostras em descontaminação com álcool 70%. B) Ostra aberta. C) Tecido digestivo separado do restante do tecido da ostra. Fotos: Mariana Rangel Pilotto.

A partir de 2 mL do homogenato do tecido digestivo das ostras, foi realizado o procedimento de eluição e concentração viral conforme descrito por Lewis & Metcalf (1988), com algumas modificações, de acordo com Rigotto et al. (2010). Essa metodologia tem por finalidade liberar os vírus adsorvidos nos tecidos das ostras para concentrá-los em volumes menores e eliminar possíveis inibidores das reações moleculares.

As amostras foram armazenadas em freezer – 80°C até a extração dos ácidos nucleicos, conforme item 3.3.

3.2.2 Água do Mar

3.2.2.1. *Escherichia coli*

Para proceder à investigação e quantificação da bactéria *E.coli* nas amostras de água do mar, 1 mL da água do mar foi inoculada em placas do kit Petrifilm® (*E. coli*/Coliform Count EC, Plate 3M) para pesquisa de *E. coli*, incubadas em estufa a 37°C±2, seguindo às orientações do fabricante. Este kit consiste em um sistema comercial de detecção que contém os nutrientes do Ágar vermelho-violeta-bile (VRBA), um agente gelificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glicuronidásica (5-bromo-4-cloro-3-indoilo-β-glicuronídeo) e um indicador de tetrazólio para facilitar a enumeração das colônias. A placa foi avaliada por um período de 48 h, sendo contabilizadas as colônias azuis com gás (*E. coli*). O número total de colônias positivas permitiu expressar o resultado em unidades formadoras de colônia por 100 mL (UFC/ 100mL).

3.2.2.2. Concentração viral pela técnica da floculação orgânica

A concentração viral da água do mar foi realizada pelo método da floculação orgânica, segundo descreveu Calgua et al. (2008), utilizando uma solução de leite desnatado acidificado pH 3,5, preparado em 100 mL de uma alíquota da própria amostra (Skim Milk Powder, Fluka Analytical). Esta solução foi adicionada aos 10 L de água do mar coletado, também acidificado a pH 3,5. Neste pH, a solução de leite forma flocos, que funcionam como partículas sólidas onde os vírus presentes na amostra podem se adsorver. Após este processo, a amostra foi mantida sob agitação por um período de 8 h, seguido por um período de 8 h em repouso para sedimentação dos flocos de leite. O sobrenadante foi aspirado, sendo o precipitado (aproximadamente 100 mL) centrifugado a $1.500 \times g$, por 20 minutos a 4°C . O precipitado final foi solubilizado em 10 mL de tampão fosfato (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , 0,2M, pH 7,5), com o objetivo de neutralizar o pH da amostra. A amostra foi alíquotada e estocada em freezer -80°C até a extração dos ácidos nucleicos.

3.3. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

A extração do genoma dos vírus foi realizada a partir de 200 μL dos concentrados das ostras (após eluição) e água (após floculação) por meio do kit comercial QIAGEN®, QLAMP MINELUTE VIRUS SPIN, que permite a extração do genoma tanto de vírus DNA como de vírus RNA, segundo as orientações do fabricante. O produto final obtido neste processo de extração foi de 60 μL .

3.4. PCR QUANTITATIVO (qPCR)

Os ensaios de PCR quantitativo foram realizados para a quantificação número de cópias virais de todos os vírus pesquisados no presente trabalho. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas com amostras diluídas dez e cem vezes, para minimizar a ação de possíveis inibidores de reações enzimáticas presentes muitas vezes nas amostras ambientais, em placas de 96 cavidades (MicroAmp Applied Biosystems), em termociclador Step One Plus (Applied Biosystems). Em cada ensaio também foram adicionados DNAs padrões, pré-quantificados, com número de cópias genômicas variando de 10^3 a 10^{10} , além de controles negativos (que não continham ácidos nucleicos).

3.4.1. Plasmídeos e Curvas Padrões

Para a quantificação dos vírus HAdV, HAV, JCPyV e HuNoV, foram utilizadas curvas-padrões de plasmídeos contendo as sequências gênicas virais clonadas que já haviam sido preparadas anteriormente no LVA.

3.4.2. Reação de qPCR para os vírus de genoma DNA (HAdV e JCPyV)

A quantificação do número de cópias genômicas detectadas para HAdV e JCPyV foi realizada de acordo com os protocolos descritos por Hernroth et al. (2002) e Pal et al. (2006), respectivamente, utilizando-se o kit “TaqMan Universal PCR Master Mix”, (Applied Biosystems), mistura que contém os reativos necessários para a reação de PCR, como a enzima Taq DNA Polimerase, oligonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) além das condições salinas adequadas. Os iniciadores e sondas estão descritos no quadro 1.

Na reação de qPCR para HAdV, foi adicionado à mistura comercial de reativos, os iniciadores ADF e ADR na concentração final de 0,9 μM e a sonda ADP1 na concentração final de 0,225 μM . Na reação de qPCR para JCPyV, foram adicionados os iniciadores JE3F e JE3R na concentração final de 1,0 μM e a sonda JE3P na concentração final de 0,6 μM . O perfil de temperaturas utilizado no qPCR para os dois vírus foi de 2 min a 50°C, seguido de 10 min a 95°C para ativação e inativação respectivamente da enzima UDG que serve como um controle de contaminação por DNA previamente presente na amostra antes da amplificação seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg e anelamento dos iniciadores e sonda e extensão ambos a 60°C por 1 min.

3.4.3. Reação de transcrição reversa (RT) e de qPCR para o HuNoV

Sendo o HuNoV um vírus de genoma RNA, previamente à reação de qPCR, foi realizada uma reação transcrição reversa (RT), utilizando-se iniciadores randômicos para a síntese do DNA complementar (cDNA). Primeiramente, 5 μL do RNA purificado foi desnaturado a 97 °C por 5 min e resfriado por 2 min em gelo. Após o resfriamento, a amostra foi adicionada à mistura da reação contendo 20 pmoL de iniciadores randômicos (Promega), 0,6 mM de dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 100 U/L de da enzima transcriptase reversa (MMLV-

Promega), 20 U de inibidor de RNase (RNAsin-Promega), em condições salinas adequadas e incubação a 37°C por 60 min em termociclador, em um volume final de 25 µL.

Na reação de qPCR para HuNoV foram usados os iniciadores G1F e G1R (para Genogrupo I) e G2F e G2R (para Genogrupo II) nas concentrações finais de 0,25 µM, e as sondas G1aP e G1bP (para GI) e G2P (para GII) nas concentrações finais de 0,6 µM (quadro 1). O perfil de temperaturas utilizado no qPCR para os dois genogrupos foi de 2 min a 50°C, seguido de 10 min a 95°C, e 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 s, e de 56°C por 1 min, tanto para anelamento dos iniciadores e sonda quanto para extensão dos iniciadores.

Quadro 1. Iniciadores e sondas utilizados para os ensaios de qPCR.

Vírus	Iniciadores e sondas	Seqüências 5' – 3'	Referências
HAdV	ADF ADR	CWTACATGCACATCKCSGG CRCGGGCRAAYTGCACCAG	Hernroth et al. (2002)
	Sonda ADP1	FAM-CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT-TAMRA	
JCPyV	JE3F JE3R	ATGTTTGCCAGTGATGATGAAAA GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT	Pal et al. (2006)
	Sonda JE3P	FAM-AGGATCCCAACACTCTACCCACCT AAAAAGA-TAMRA	
HAV	HAV F HAV R	GGTAGGCTACGGGTGAAAC GCGGATATTGGTGAGTTGTT	Jothikumar et al. (2005)
	Sonda HAVP	FAM-CTTAGGCTAATACTTTATGAAGAGATGC-TAMRA	
HNV GI	G1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	Kageyama et al. (2003)
	G1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	
	Sonda G1aP	FAM-AGATYGCGATCYCCTGTCCA-TAMRA	
	Sonda G1bP	FAM-AGATCGCGGTCTCCTGTCCA-TAMRA	
HNV GII	G2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	
	G2R	TCGACGCCATCTTCATTCACA	
	Sonda G2P	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA	

3.4.4. Reação de qPCR para HAV

Para a detecção de HAV foi utilizado o Kit Quantitect Probe RT-PCR (QIAGEN), pois a reação de transcrição reversa e a qPCR ocorrem na mesma reação. Os iniciadores HAV-F e HAV-R foram utilizados na concentração final de 0,25 μ M e a sonda TaqMan HAVP na concentração final de 0,15 μ M (quadro 1). O perfil de temperaturas utilizado na reação de qRT-PCR para o HAV foi de uma temperatura inicial de 50 °C por 30 min para a realização da RT, seguido por desnaturação a 95 °C por 15 min e amplificação em 45 ciclos de 95 °C por 10 s (desnaturação), 55 °C por 20 s (anelamento) e extensão a 72 °C por 15 s.

3. 5. VÍRUS E CÉLULAS

As células A549 (células epiteliais derivadas de carcinoma de pulmão humano e permissivas ao HAdV-2) e os macrófagos RAW 264.7 (derivados de *Mus musculus* e permissivos ao MNV-1), bem como os vírus HAdV 2 e MNV-1 foram gentilmente cedidos pela Professora Dra. Rosina Girones Llop do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona (Espanha).

3.5.1. Cultivo de Células

As células A549 (Figura 4) foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de tamanho de 75 ou 100 cm² utilizando como meio de crescimento o meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) contendo alta glicose (25 mM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 1% de antibiótico e antifúngico (PSA Cultilab-penicilina G 100U/ mL/ sulfato de estreptomicina 100 g/ mL/ anfotericina B 0,25g/ mL).

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

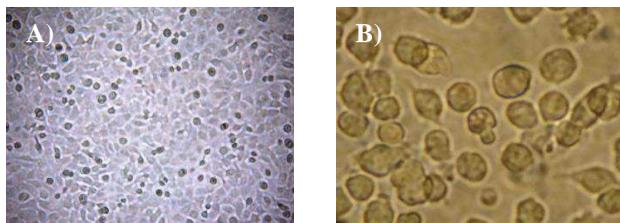


Figura 5. Visualização das células estudadas no microscópio óptico. A) Células A549 sob aumento de 100x. B) Células RAW 264.7 sob aumento de 400x.

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

3.5.2. Produção dos estoques virais

Após atingirem confluência, as monocamadas celulares foram infectadas com vírus para se produzir estoques virais. Em uma garrafa de 75 cm², o meio foi retirado e adicionado 1 mL de uma suspensão viral, já presente no laboratório. A garrafa foi incubada a 37°C por 1h para que ocorresse a adsorção viral. Após esse período, o inóculo viral foi removido e adicionou-se meio de manutenção como descrito anteriormente, porém com uma quantidade de 2% de SFB. A garrafa foi observada diariamente, em microscópio óptico invertido (Olympus), para visualização do efeito citopático nas células. A presença do vírus, em geral, causa uma modificação morfológica na célula hospedeira, e qualquer mudança detectável na célula devido à infecção é denominada de efeito citopático. Células não infectadas foram utilizadas como controles negativos. Quando se obteve 100% de destruição da camada celular, as garrafas foram congeladas a -80°C e descongeladas em temperatura ambiente três vezes para que possíveis células intactas e infectadas fossem rompidas. A suspensão foi centrifugada a 600 xg por 20 min para remover restos celulares. O sobrenadante contendo os vírus foi titulado, aliquotado, e mantido congelado a -80°C até o uso.

3.5.3. Determinação do título infeccioso dos fluidos virais

3.5.3.1 Padronização da titulação do HAdV-2 por ensaio de placa de lise (UFP)

A padronização do método de titulação por placa de lise do HAdV-2 foi baseado no descrito por Cromeans et al. (2008) e Rigotto et al. (2011). Células A549 foram semeadas em placas de seis cavidades na concentração $2,5 \times 10^5$ células/ mL. Após 24 h, período necessário para que as células atingissem confluência, a placa foi lavada duas vezes com solução salina. Foi adicionado 250 μ L das diluições seriadas do vírus de 10^{-1} a 10^{-9} , em triplicatas. A placa foi mantida a 37°C , em atmosfera de 5% de CO_2 por 1h, para promover a adsorção viral, sendo homogeneizada a cada 15 min. Após esse período, o inóculo viral foi aspirado e adicionado 2,5 mL, por poço, de uma solução na proporção 1:1 de meio DMEM 2X com alto teor de glicose (suplementado com 4% de SFB, 1% de PSA, 5% de MgCl_2 a 1M e 1% de piruvato de sódio a 100 mM) e BactoTM-agar (BD Biosciences). O BactoTM-agar irá impedir a difusão da infecção viral a partir de uma célula infectada, permitindo que o vírus infecte apenas células vizinhas. Testou-se três diferentes concentrações do BactoTM-agar: 0,6%, 0,8% e 1%. Após a polimerização do BactoTM-agar, as placas foram incubadas em estufa a 37°C , com atmosfera de 5% de CO_2 por sete dias. Decorrido esse tempo, a camada contendo meio de cultura e BactoTM-agar foi retirada e o tapete celular corado com cristal violeta 1:5 por 5 min. Após o corante ser aspirado, as placas de lise foram contadas e a quantidade de unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ mL) foi inferida utilizando-se a fórmula:

$$\frac{\text{Número de placas contadas} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{Volume adicionado na cavidade}}$$

A titulação do vírus foi determinada pela média das triplicatas de três diluições do vírus.

3.5.3.2. Titulação por Placa de Lise do MNV-1

A titulação do MNV-1 foi realizada de acordo com Bae e Schwab (2008). Células RAW 264.7 foram semeadas em placas de 6 cavidades na concentração de 10^6 células/mL, 24h antes do experimento. Diluições virais de 10^{-1} a 10^{-9} foram preparadas e semeadas na placa em triplicata. A placa foi mantida a 37°C em

atmosfera de 5% de CO₂ por 1 h para promover a adsorção viral, sendo homogeneizada a cada 15 min. O inóculo viral foi removido após a adsorção. Uma solução 1:1 contendo meio MEM 2x (suplementado com 2% de PSA, 2 % de L-glutamina, 2% de aminoácidos não essenciais, 3% de hepes e 4% de SFB) e agarose (SeaPlaque Agarose de baixo ponto de fusão, Lonza, CA, USA) a 3% foi adicionada a placa, e esta novamente incubada.

No momento que as placas de lise se tornaram visíveis, 48 h após a infecção, uma nova camada da solução contendo meio MEM e agarose, agora com 0,1% do corante Vermelho Neutro, foi sobreposta à primeira camada. As placas de lise foram contadas após 6-8 h e o título viral expresso em UFP/ mL de acordo com a fórmula apresentada no item anterior.

3. 5. 4. Avaliação da viabilidade de HAdV por placa de lise

3. 5. 4. 1. Ensaio de citotoxicidade

Todas as amostras de tecidos de ostras e de água do mar, positivas no qPCR, foram submetidas ao ensaio de placa de lise para determinação da viabilidade viral. Para isso, foi necessário determinar a diluição não citotóxica das amostras.

As células A549 foram cultivadas na densidade de 2×10^5 células/ mL em placas de 24 cavidades por 24 h, período necessário para atingirem a confluência. Após esse período, às células lavadas com solução salina foram adicionados 200 µL da amostra pura e também diluídas (seriadamente em base dois) em DMEM, com alto teor de glicose, suplementado com 2% de PSA e 2% de anfotericina B. As amostras foram tratadas previamente com 3% de PSA e 3% anfotericina B (250 µg/ mL). A placa foi incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 1 h, com homogeneização a cada 15 min. Após o período de incubação, as amostras foram aspiradas e adicionado 1,0 mL de DMEM, com alto teor de glicose, suplementado com 5% de SFB, 1% de piruvato de sódio e 1% de PSA.

Após 72 h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram observadas ao microscópio invertido para visualizar possíveis alterações morfológicas provocadas pelas amostras testadas. A placa foi então corada pela adição de 250 µL de corante preto de naftaleno (0,1%) (Sigma) e homogeneizada por 15 min a 37°C. O excedente foi aspirado. A diluição escolhida das amostras para análise da viabilidade viral foi aquela que não provocou danos ao tapete celular.

3. 5. 4. 2. Teste de inibição de infecção

Uma amostra de ostra e uma amostra de água do mar negativas para HAdV foram submetidas a um ensaio para determinação de uma possível inibição da infecção viral provocada pela amostra. Para isso, ensaios de placa de lise desenvolvidos segundo o protocolo descrito no item 3.5.3.1 foram realizados, sendo as amostras incubadas com 3% de PSA e 3% de anfotericina B previamente à infecção. O preparo das amostras foi realizado de acordo com a figura 6.

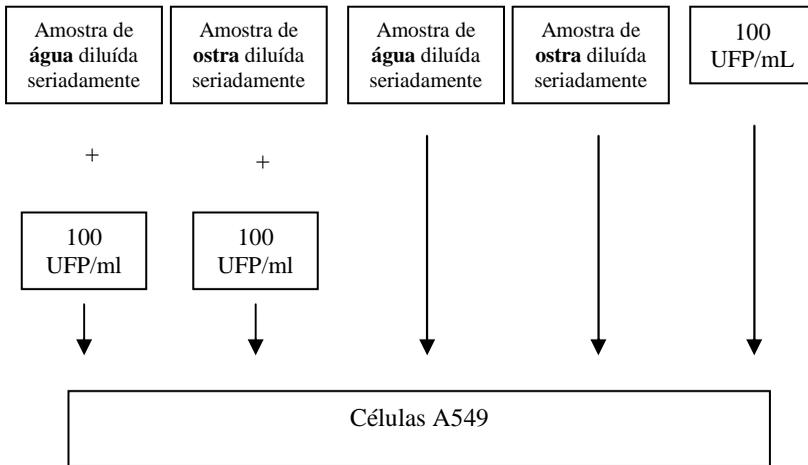


Figura 6. Esquema da diluição das amostras para teste de inibição de infecção.

Dessa forma, foi semeada na placa uma amostra de extrato tecidual ou de água do mar, com uma quantidade de vírus viável suficiente para apresentar efeito citopático. Controles positivos, contendo apenas o vírus diluído em meio de cultura e controles negativos, contendo apenas as amostras de tecidos de ostras ou água do mar, também foram utilizados.

3.5.4.3. Ensaio de viabilidade viral por placa de lise

Todas as amostras positivas para HAdV no qPCR foram testadas para determinar a viabilidade do vírus. Para isso, diluições não citotóxicas das amostras de água do mar e de tecidos de ostras foram submetidas ao ensaio de placa de lise, descrito no item 3.5.3.1. Todas as

amostras foram incubadas com 3% de PSA e 3% de anfotericina B previamente ao ensaio, e diluídas em meio DMEM, com alta glicose, suplementado com 2% de PSA e 2% de anfotericina B.

3.5.5. Ensaio de recuperação e estabilidade viral em água do mar

Para avaliar a recuperação viral da técnica da floculação orgânica, 10^8 UFP/ mL de HAdV-2 e de MNV-1 foram inoculados em 10 L de água do mar. Após a adição dos vírus na água, realizou-se a concentração pelo método da floculação orgânica de acordo com o descrito no item 3.2.2.2.

Após o término da floculação, o concentrado foi inoculado em placas de 6 cavidades em uma monocamada de células A549 (HAdV-2) ou RAW 264.7 (MNV-1), com o objetivo de avaliar a recuperação de partículas virais infecciosas pelo método. O restante do concentrado foi aliqotado em tubos de 2 mL e estocado a -80°C .

Para avaliar a estabilidade dos vírus em amostras de água do mar concentradas por floculação e congeladas a -80°C , alíquotas da amostra foram descongeladas em tempos diferentes de congelamento e avaliadas pela técnica de placa de lise. Os descongelamentos ocorreram 1 semana, 2 semanas, 4 semanas e 10 semanas após o congelamento.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A construção dos gráficos utilizados neste trabalho e o teste de correlação de Pearson foram realizados com o uso do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PLACA DE LISE E TITULAÇÃO DE HAdV-2

Para a padronização do ensaio de placa de lise para HAdV-2, três concentrações de Bacto-agar foram testadas: 0,6%, 0,8% e 1 %. A concentração de 0,6% foi a escolhida por ter sido a camada que pôde ser retirada mais facilmente. Além da titulação do HAdV-2, todos os ensaios de infecciosidade viral foram realizados com essa concentração.

A titulação do vírus foi determinada através da contagem do número de placas formadas em cada triplicata da diluição, em três diluições distintas. A média dos resultados permitiu determinar o título viral de $4,0 \times 10^6$ UFP/ mL. Como controle positivo dos ensaios de infecciosidade, utilizou-se a diluição 10^6 desse estoque, inoculando 400 UFP/ mL do vírus neste controle. Na figura 7 observa-se um dos poços, corado com cristal violeta, na diluição utilizada.

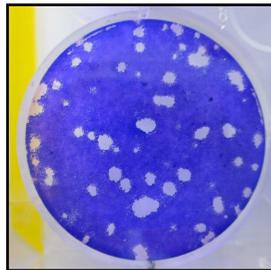


Figura 7. Representação de placas de lise formadas por HAdV-2 em células A549, em um poço corado com cristal violeta. Foto: Mariana Rangel Pilotto.

4.2. TITULAÇÃO DO FLUIDO DE MNV-1 PELO ENSAIO DE PLACA DE LISE

O título do fluido infeccioso do MNV-1, utilizando-se o ensaio de placa de lise, foi determinado através da contagem do número de placas de lise formadas nas triplicatas, de três diluições seriadas do vírus. Essa técnica permitiu determinar o título viral de $6,0 \times 10^6$ PFU/ mL. Para os

ensaios de placa de lise de MNV-1, utilizou-se como controle positivo 300 UFP/ mL, demonstrado na figura 8.

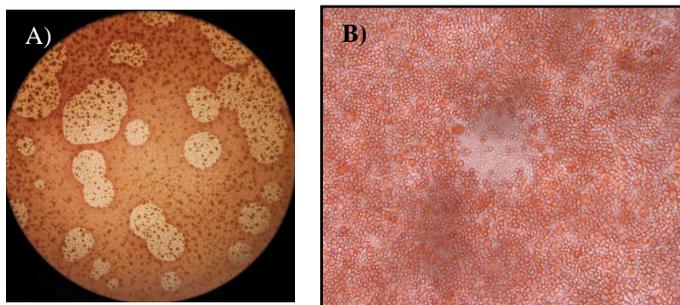


Figura 8. Representação de um poço contendo células da linhagem RAW 264.7 infectadas com MNV-1 coradas com vermelho neutro. A) Visualização de placas em uma lupa sob aumento de 2x. B) Visualização de uma placa sob aumento de 100x no microscópio óptico invertido. Fotos: Mariana Rangel Pilotto.

4.3. ENSAIOS DE CITOTOXIDADE E TESTE DE INIBIÇÃO DA INFECCÃO VIRAL PELAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

Anteriormente aos ensaios de placa de lise utilizando-se amostras ambientais, amostras dos tecidos das ostras e amostras de água, sorteadas aleatoriamente, foram testadas para avaliar a diluição não citotóxica de cada tipo de amostra. De uma forma geral, amostras de tecidos de ostras apresentaram baixa citotoxicidade apenas quando sem diluição, sendo utilizada então para os ensaios de placa de lise a diluição 1:2. Já as amostras de água do mar apresentaram uma citotoxicidade maior, sendo determinada a diluição de 1:4 como não citotóxica para os ensaios subsequentes.

A fim de se determinar possíveis inibições na infecção das células pelos vírus por interferentes presentes nas amostras ambientais, os concentrados de uma amostra de tecidos de ostras e de uma amostra de água do mar foram inoculados com HAdV-2, realizando-se então o experimento de placa de lise. Não se observou nenhuma alteração da infecção do vírus nas amostras em relação ao controle positivo contendo apenas fluido viral, fato que demonstra que as características físico-

químicas dessas amostras não interferiram com a infecção viral (figuras 9 e 10). O objetivo da realização desse teste foi descartar resultados falsos negativos nos ensaios de placa de lise, tendo certificado que as amostras ambientais não iriam impedir a infecção das células por vírus viáveis presentes nas amostras.

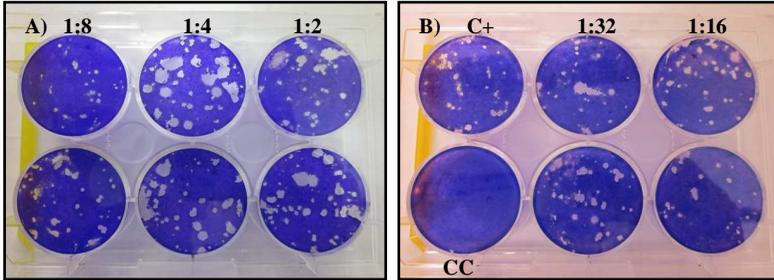


Figura 9. A) e B) Ensaio de UFP em células A549 realizado com amostras de tecidos de ostras inoculados com HAdV-2. Foram utilizadas as diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, assim como um controle positivo (C+) contendo apenas fluido viral e um controle celular (CC) contendo apenas o tapete celular. Foto: Mariana Rangel Pilotto.

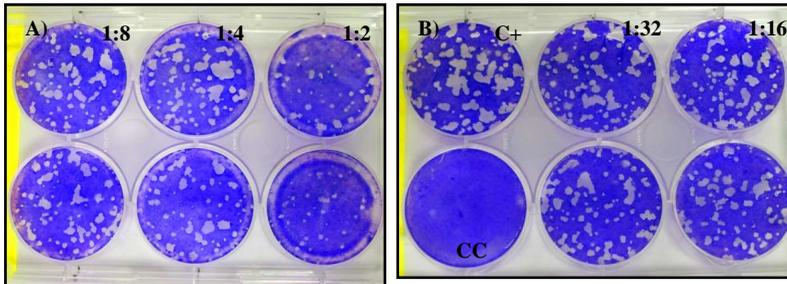


Figura 10. A) e B) Ensaio de UFP em células A549 realizado com amostras de água do mar inoculadas com HAdV-2. Foram utilizadas as diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, assim como um controle positivo (C+) contendo apenas fluido viral e um controle celular (CC) sem amostra. Observa-se citotoxicidade na diluição 1:2. Foto: Mariana Rangel Pilotto.

4.4. RECUPERAÇÃO E ESTABILIDADE VIRAL NA ÁGUA DO MAR

Foram utilizadas neste experimento duas matrizes de água do mar: uma amostra do próprio local de coleta deste trabalho, na região costeira do bairro Saco Grande e uma amostra de água do mar filtrada, retirada da caixa d'água existente na UFSC. Dessa forma, avaliou-se uma matriz com muita matéria orgânica e uma matriz mais limpa.

Para o teste da recuperação da técnica da floculação orgânica, o concentrado final do ensaio foi diretamente inoculado em células semeadas no dia anterior. Como foram inoculados na água do mar HAdV-2 e MNV-1, as células A549 e RAW 264.7 foram utilizadas nestes ensaios. O restante da amostra foi alíquotado e mantido a -80°C , descongelados após 1, 2, 4 e 10 semanas para avaliar a estabilidade viral em amostras congeladas. Uma vez descongelada, a amostra era utilizada e descartada. Nenhuma amostra foi re-congelada.

A recuperação de partículas virais viáveis pela metodologia da floculação orgânica foi de 10% para os dois vírus (inoculado 10^8 UFP/mL de ambos os vírus e recuperado 10^7 UFP/mL), nas duas matrizes de água de mar utilizadas. Como não houve diferença de viabilidade viral nas duas matrizes de água do mar, a figura 11 mostra os resultados somente da água do mar da região de Saco Grande onde foram coletadas as ostras. A viabilidade das partículas decai gradualmente com o tempo de congelamento, sendo detectadas diferenças de 1 log (90%) de decaimento após 10 semanas de congelamento. Também observa-se que o HAdV-2 se mostrou mais estável que o MNV-1. Devido às suas características estruturais, os HAdV possuem alta estabilidade, podendo permanecer viáveis por determinados períodos de tempos em diferentes superfícies e ambientes. Eles são capazes de sobreviverem por meses na água, principalmente em baixas temperaturas (MENA; GERBA, 2008). A fita dupla de DNA do vírus pode fornecer uma maior estabilidade no ambiente, além de poder utilizar as enzimas da célula hospedeira para reparar danos no DNA (MENA; GERBA, 2008).

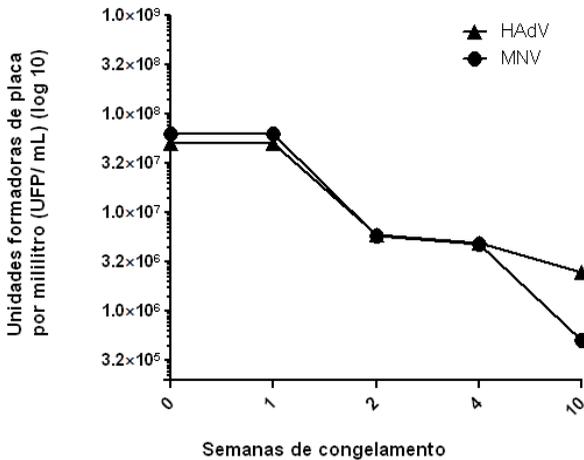


Figura 11. Recuperação viral da floculação orgânica (T0) e da estabilidade viral de amostras de água do mar congeladas a -80°C a 1, 2, 4 e 10 semanas, testadas por ensaio de placa de lise.

Estudos já demonstraram haver influência da estocagem e do congelamento em amostras ambientais. Olson, Axler e Hicks (2004) testaram a influência da estocagem de amostras de esgoto tratadas e não tratadas em diversas temperaturas (4°C , -20°C e -80°C) sobre a viabilidade do bacteriófago MS2. A temperatura de 4°C foi a que menos afetou a amostra quando avaliada até uma semana após a coleta. Já a temperatura de -80°C foi a que manteve maior viabilidade viral para amostras avaliadas por um período de tempo maior que uma semana. Eles afirmam que a temperatura de -20°C pode ocasionar uma maior formação de cristais de gelo, podendo romper os capsídeos virais, não sendo recomendado o uso dessa temperatura para armazenamento de amostras ambientais.

O mesmo sorotipo de HAdV utilizado neste trabalho foi avaliado por Rigotto et al. (2011) na comparação de duas diferentes temperaturas de estocagem de amostras de águas superficiais e subterrâneas inoculadas com vírus, avaliadas também por ensaios de placa de lise. A concentração de HAdV-2 foi relativamente estável em todos os tipos de água a 10°C por até 23 semanas e, em algumas amostras, até 43 semanas. Entretanto, além das amostras de água utilizadas terem sido de água doce (a utilizada neste trabalho foi de água salgada), as

amostras foram autoclavadas previamente à inoculação dos vírus (RIGOTTO et al., 2011). Esses dados demonstram que características como salinidade da amostra e presença de micro-organismos são características de extrema importância na redução da viabilidade viral.

A fim de se comparar a influência do congelamento na recuperação de vírus viáveis e de genomas virais, as amostras de HAdV-2 foram avaliadas também no ensaio de qPCR, além de placa de lise (figura 12).

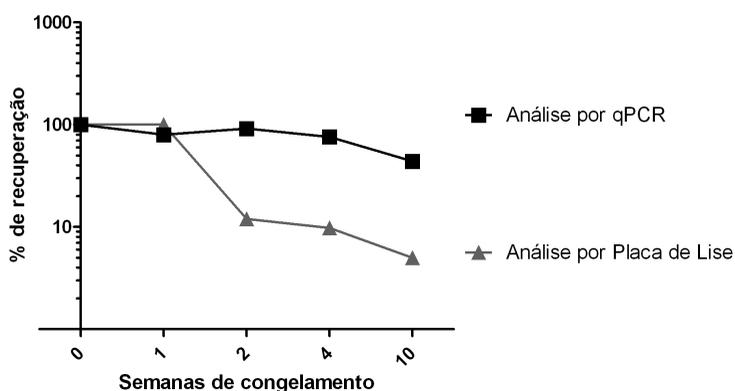


Figura 12. Comparação da porcentagem de recuperação por qPCR e placa de lise para HAdV-2.

Não houve diferença de detecção de cópias genômicas ao longo do período de congelamento. Entretanto, quando as mesmas amostras foram avaliadas para a presença de infecciosidade viral, um decaimento de 1 log (90%) foi observado. Isso demonstra que o congelamento não teve ação sobre o genoma do vírus, demonstrando que mesmo quando se perdia viabilidade viral, o genoma continuava a ser detectado por qPCR.

Calgua et al. (2011) comparou a detecção de partículas virais de HAdV e JCPyV por qPCR e ensaio de imunofluorescência (IFA) em amostras de água. O ensaio de IFA é uma das metodologias disponíveis para detecção de partículas virais viáveis. Após o tratamento a 99°C e

luz UV, os ensaios de IFA apresentaram resultados negativos para a presença viral. Entretanto, o DNA viral ainda foi detectado por qPCR, demonstrando que os ensaios de detecção do genoma viral não devem ser correlacionados com partículas virais infecciosas.

4.5. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA NAS AMOSTRAS AMBIENTAIS

No total foram realizadas oito coletas de ostras e oito coletas de água do mar, entre os meses de fevereiro e setembro de 2011, totalizando 16 amostras. O resultado da contaminação microbiológica encontra-se na tabela 1 e figura 13.

Tabela 1. Avaliação da contaminação microbiológica em ostras e água do mar coletadas, mensalmente, durante oito meses, no bairro Saco Grande (de fevereiro a setembro de 2011).

Coletas	HAdV		HAV		HuNoV		JCPyV		<i>Salmonella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i> ***
	Água *	Ostra **	Água *	Ostra **	Água *	Ostra **	Água *	Ostra **		
Fev	ND	$3,90 \times 10^9$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	positivo	ND
Mar	$3,30 \times 10^5$	ND	$3,30 \times 10^{10}$	ND	ND	ND	ND	ND	positivo	ND
Abr	ND	ND	ND	$1,40 \times 10^9$	ND	ND	ND	ND	negativo	ND
Mai	$1,30 \times 10^7$	$8,20 \times 10^6$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	negativo	2.400
Jun	$1,90 \times 10^6$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	negativo	ND
Jul	$2,10 \times 10^5$	ND	ND	$1,00 \times 10^5$	ND	ND	ND	ND	negativo	400
Ago	$8,00 \times 10^7$	$7,00 \times 10^4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	positivo	500
Set	ND	$1,90 \times 10^8$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	positivo	ND

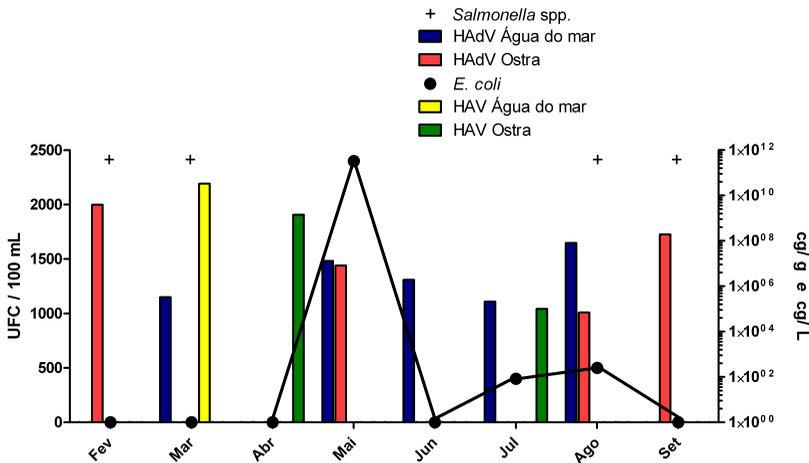


Figura 13. Avaliação da contaminação microbiológica em ostras e água do mar coletadas mensalmente, no bairro Saco Grande (de fevereiro a setembro de 2011).

A coleta de fevereiro representa a avaliação inicial do ambiente. As ostras provenientes da fazenda de cultivo ficaram alocadas por um dia no mar, no local avaliado, antes de serem analisadas. Não foi possível analisá-las antes de serem alocadas neste ponto. Logo, os resultados positivos para HAdV ($3,90 \times 10^9$ cg/ g) e *Salmonella* spp. não necessariamente se referem a uma contaminação do local de origem das ostras, uma vez que em um dia as ostras são capazes de bioacumular patógenos presentes no ambiente (BOSCH et al., 2010), essa contaminação pode ter ocorrido no próprio local da coleta, e não na fazenda de cultivo. Para outras análises, como mortalidade das ostras, temperatura da água e precipitação, os dados de fevereiro foram desconsiderados.

Salmonella spp. foi detectada nas ostras nas coletas de fevereiro, março, agosto e setembro, totalizando 50% das amostras de ostras analisadas. A baixa positividade pode estar relacionada a ausência de surtos nos períodos onde a detecção foi negativa, uma vez que a presença de *Salmonella* em amostras ambientais coincide com surtos da doença na população. As coletas fevereiro e março coincidem com o período de alta temporada turística da ilha, quando a população de Florianópolis é triplicada, havendo um grande aumento na quantidade de

resíduos produzidos e, conseqüentemente nas descargas de resíduos tratados pela CASAN e daqueles despejados sem qualquer tipo de tratamento, como ocorre nas ligações clandestinas de esgoto. As coletas de agosto e setembro representam meses com baixas temperaturas da água do mar (figura 13), fato que pode ter contribuído para uma maior estabilidade da bactéria no ambiente. Surtos de gastroenterites relacionados à infecção por *Salmonella* spp, após o consumo de ostras, não são mais tão frequentes, uma vez que a legislação preconiza a ausência desse patógeno na carne dos moluscos.

A contagem de *E. coli* na água só excedeu ao permitido pela legislação nas coletas de maio, julho e agosto (figura 14). Na maior parte dos meios aquáticos, a presença de *E. coli* pode ser um indicativo de contaminação recente (LAWS, 1993). Em todos esses períodos, houve forte chuva nos dias anteriores à coleta, podendo ser esta a causa da contaminação recente. A temperatura da água do mar também possui um importante papel na sobrevivência de *E. coli* em ambientes aquáticos. Um estudo realizado por Noble, Lee e Schiff (2004) revela que a inativação de *E.coli* à 20°C foi maior do que à 14°C, sendo esta bactéria mais estável a uma temperatura mais baixa. Ainda que o processo da inativação bacteriana no meio marinho possa diferir de acordo com a espécie envolvida, podendo *E.coli* e *Salmonella* se comportarem de maneira diferente, as duas espécies são passíveis de serem afetadas pela temperatura do ambiente.



Figura 14. Análise de *E. coli* da coleta T3 de água do mar, indicando a quantidade de 2.400 UFC/100mL após 48h. Foto: Mariana Rangel Pilotto.

Além da pluviosidade e da temperatura do mar, outros fatores podem afetar a presença de bactérias no ambiente, como por exemplo, a irradiação solar. Alguns estudos demonstraram que a variação diurna

observada na concentração de coliformes foi devido à exposição ou não a radiação solar, sendo o declínio muito menor à noite (POMMEPUY, 2006). Florianópolis é uma cidade que sabidamente sofre uma alta incidência de radiação ultravioleta, principalmente nos meses de verão. Devido a essas razões, buscou-se realizar as coletas no início da manhã a fim de minimizar diferenças que poderiam ser ocasionadas por este fator.

Apenas um mês de coleta apresentou positividade para os dois testes microbiológicos (Petrifilm® e Reveal®). Nos outros sete meses de coleta, as amostras apresentaram positividade para apenas um teste, ou negatividade para ambos. Este dado demonstra haver necessidade do monitoramento de ambos os microrganismos, já que a ausência de um, não assegura a ausência do outro.

Após a concentração viral e extração dos ácidos nucleicos, foi realizado o qPCR para cada um dos vírus estudados (tabela 1). Não se obteve nenhuma amostra positiva para os HuNoV (GI e GII) e JCPyV.

Existem poucos estudos analisando a presença de JCPyV na água e, quando encontrados, em geral são em concentrações relativamente baixas (BOFFIL-MAS et al., 2010; MORESCO et al., 2011). Já uma análise em moluscos bivalves cultivados na Europa para a presença de JCPyV, 50% delas apresentaram positividade para o vírus, com quantificação de 1 a 10 partículas virais por grama (BOFFIL-MAS et al., 2001). Em Florianópolis, um estudo publicado este ano encontrou apenas uma amostra de ostra contaminada dentre quatro diferentes locais analisados (SOUZA et al., 2012). Vale destacar que os iniciadores e sondas utilizados neste trabalho são específicos para uma região conservada do sorotipo JC, não apresentando homologias para outros sorotipos (PAL et al., 2006).

Em relação à detecção de HuNoV, estudos realizados anteriormente em ostras e águas de Florianópolis, detectaram a presença do vírus em poucas amostras (VICTORIA et al., 2010; MORESCO et al., 2011; SOUZA et al., 2012). Realizou-se qPCR específico para cada um dos dois genogrupos pois a distribuição de cada genogrupo é diferenciada, sendo o HuNoV GI em geral mais relacionado a surtos causados por moluscos e água contaminada que o GII, sugerindo que GI possui uma maior resistência à inativação no ambiente. Esperava-se encontrar HuNoV nas amostras nos meses de inverno, uma vez que se sabe que esses vírus são mais estáveis em temperaturas mais baixas (WYN-JONES et al., 2011). Entretanto, não se encontrou nenhuma amostra positiva para HuNoV.

Com relação ao HAdV, 62,5% das amostras de água do mar e 50% das amostras de tecidos de ostras foram positivas. Apenas uma amostra de água do mar (12,5%) e duas amostras teciduais (25%) foram positivas para HAV (figura 13).

HAdV foi o mais prevalente entre os vírus analisados, corroborando com dados de outros trabalhos (CALGUA et al., 2008; RIGOTTO et al., 2010; MORESCO et al., 2011; WYN-JONES et al., 2011; SOUZA et al., 2012). Calgua et al. (2008), analisando amostras de água do mar através da mesma metodologia de concentração utilizada neste trabalho e detecção por qPCR, obteve médias de quantificação genômica para o HAdV de $1,26 \times 10^4$ cg/ L e Moresco et al. (2011) encontrou uma média de 10^5 cg/ L em amostras de diferentes praias de Florianópolis. Essa alta detecção de HAdV pode sugerir uma liberação contínua desses vírus em fezes humanas, e uma alta resistência a estresses ambientais, como temperatura e radiação ultra-violeta (WYN-JONES et al., 2011; SOUZA et al., 2012). A prevalência de HAdV nas amostras indica que não houve diferença de sazonalidade, já demonstrado em outros trabalhos (FORMIGA-CRUZ et al., 2005; RIGOTTO et al., 2010).

A detecção de HAV para água do mar ficou abaixo do encontrado por outros estudos realizados em Florianópolis. Rigotto et al. (2010) obteve valores de 16% na detecção de HAV por *nested*-PCR e Moresco et al. (2011) encontrou 51,5% das amostras positivas para qPCR. Entretanto, as duas amostras positivas para HAV no presente trabalho, foram maiores que a única amostra positiva obtida por Souza et al. (2012). A detecção desse vírus em ostras merece atenção, uma vez que a resistência do HAV a temperaturas elevadas permite a infecção mesmo em ostras parcialmente cozidas.

As coletas de maio e agosto foram as que apresentaram maior diversidade de patógenos, provavelmente devido ao fato da ocorrência de forte chuva nos dois dias anteriores às coletas. A presença de patógenos na água do mar vem sendo comumente associada à precipitação pluviométrica. A ocorrência de alta precipitação e surtos diarreicos na população pode levar a uma alta contaminação da água do mar por vírus entéricos. No inverno, a viabilidade destes vírus permanece, graças às temperaturas médias mais baixas. Esses acontecimentos podem, além disso, levar a uma diminuição da salinidade da água, uma vez que uma maior quantidade de água doce pode ser levada até o oceano. Esse fato favorece principalmente às bactérias que são primeiramente afetadas, quando a salinidade é mais alta (ORTEGA et al., 2009).

Houve uma relação direta entre maiores temperaturas da água e mortalidade de ostras: coleta T2 com 24°C e 8 animais mortos e na coleta T5 com 16°C e mortalidade zero (figura 15). A correlação de Pearson comprovou a forte relação entre esses dados, mostrando que a mortalidade das ostras aumenta em relação ao aumento da temperatura da água ($r = 0,8555$, $P < 0,02$).

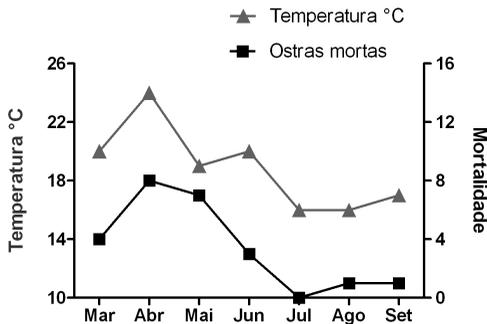


Figura 15. Relação entre a temperatura da água do mar e a mortalidade das ostras.

Apesar de não ter se encontrado relação entre a presença viral e a temperatura da água do mar, sabe-se que este é um importante fator para determinar a integridade viral em amostras ambientais. À medida que a temperatura aumenta, processos metabólicos de bactérias e protozoários se aceleram, aumentando a predação, além de poder aumentar a presença de enzimas degradativas produzidas por plantas, fungos e bactérias, podendo provocar a degradação do capsídeo viral, danificando os ácidos nucleicos, DNA ou RNA, virais (OLSON; AXLER; HICKS, 2004).

Assim como as ostras podem bioacumular rapidamente em seus tecidos patógenos presentes no ambiente (BOSCH et al. 2005), estes podem não ser eliminados rapidamente, podendo ser detectados nos tecidos destes moluscos, estando indetectáveis nas águas de cultivo. Pensava-se que as ostras agiam como meros “filtros”, concentrando passivamente partículas como bactérias e vírus, porém, hoje se sabe que vírus entéricos podem persistir nos tecidos dos moluscos por um longo período de tempo (MAALOUF; POMMEPUY; LE GUYADER, 2010).

Foi demonstrado que HAV pode persistir por várias semanas após bioacumulação, sendo possível a detecção de vírus viáveis após três semanas e o RNA viral, após seis semanas (KINGSLEY et al., 2003), já HAdV infecciosos puderam ser detectados em ostras após seis semanas (HERNROTH; ALLARD, 2007). Logo, mesmo que a contaminação na água do mar se disperse, os vírus podem ainda persistir no tecido das ostras e serem detectados em ensaios moleculares e de viabilidade.

Para se testar a viabilidade dos HAdV presentes nas amostras de tecidos de ostras e água, foi realizado o ensaio de placa de lise padronizado no laboratório durante o desenvolvimento desse trabalho. Todas as amostras positivas no qPCR foram submetidas ao ensaio. Apenas uma amostra, de água do mar do mês de maio, apresentou placas de lise, totalizando 36,8 UFP/mL. Esse resultado mostra que os genomas virais totais detectados no qPCR podem ter sido provenientes de vírus defectivos e/ou genomas virais livres. Entretanto, esse resultado pode também ter sido subestimado, uma vez que os ensaios de placa de lise foram realizados mais de 10 semanas após a realização dos qPCR sendo que as amostras ficaram estocadas a - 80 °C durante esse período. Os ensaios da estabilidade viral realizados no presente trabalho mostraram um declínio de 1 log (90%) na infecciosidade de HAdV-2 após a estocagem por 10 semanas a - 80°C. Ou seja, pode ter sido detectado um número menor de amostras com vírus infecciosos do que realmente existia. Devemos também considerar que os adenovírus entéricos (sorotipos 40 e 41) não são adaptados à infecção de células cultivadas *in vitro* e não está descartada a presença desses sorotipos nas amostras analisadas, uma vez que os iniciadores do qPCR foram idealizados para flanquear uma região conservada entre os diversos sorotipos de HAdV (HERNROTH et al., 2002).

Entretanto, o número de UFP encontrada na amostra de maio está dentro do esperado. Ao transformar a unidade para litro, temos na amostra um valor de $3,68 \times 10^4$ UFP/ L. Nesse mesmo mês, tivemos um valor de cópias genômicas de $1,3 \times 10^7$ cg/ L. Ou seja, uma diferença de 3 logs entre a detecção de vírus infecciosos e de cópias genômicas. Essa é a diferença que comumente se espera ao se comparar titulações virais por qPCR e por cultura celular.

A detecção de vírus no ambiente por PCR também possui limitações importantes: não se tem certeza da infecciosidade dos vírus detectados e, em alguns casos, substâncias inerentes a cada tipo de amostra podem funcionar como inibidoras das reações enzimáticas, produzindo um resultado falso-negativo frente ao qPCR. Além disso, controles de qualidade precisam ser empregados, a fim de se evitar

resultados falsos-negativos ou falsos-positivos. Entretanto, as reações enzimáticas são capazes de fornecer resultados mais específicos, sensíveis e rápidos quando comparado com o isolamento do vírus em cultura celular (PINA et al., 1998; CALGUA et al., 2011).

5. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- A avaliação da contaminação microbiológica nas ostras por um período de 8 meses, demonstrou que esses animais não acumulam progressivamente os patógenos presentes na água, mas são capazes de se auto-depurar.
- Não se encontrou nenhuma amostra positiva para JCPyV e HuNoV (GI e GII). Com relação ao HAdV, 62,5% das amostras de água do mar e 50% das amostras de tecidos de ostras foram positivas. Apenas uma amostra de água do mar e duas amostras teciduais foram positivas para HAV.
- Não houve correlação entre contaminações virais e bacterianas.
- Os meses que se detectou a maior diversidade de patógenos foram aqueles com chuvas nos dias anteriores à coleta.
- Houve uma forte relação entre o aumento da temperatura da água do mar com o aumento da mortalidade das ostras.
- Uma única amostra de água do mar apresentou uma concentração de HAdV infecciosos de 36,8 UFP/mL.
- Amostras concentradas de água do mar congeladas a -80oC por um período de 10 semanas possuem um comportamento diferenciado quando compara-se a detecção de cópias genômicas com vírus infecciosos. Não se observou decaimento na quantidade de cópias genômicas na amostra, enquanto o número de partículas virais viáveis decaiu 1 log.

6. CONCLUSÕES

A hipótese inicial que poderia haver uma contaminação cumulativa das ostras mantidas durante 8 meses num sítio altamente impactado pela poluição não foi confirmada. Isso comprova a grande capacidade de autodepuração desses animais, mostrando que o grau de contaminação dos mesmos é um fator pontual e varia de acordo com as condições sanitárias do local, que também é variável.

Esse trabalho revelou o impacto antropogênico na Baía da Grande Florianópolis, o que acarreta maiores riscos de contaminação nos locais de cultivos de moluscos, devido à proximidade entre esses sítios. A presença de *E. coli* no ambiente revelou uma contaminação recente e contínua.

A estocagem de amostras ambientais a - 80°C não afeta a recuperação de genomas virais, porém há uma perda significativa de viabilidade viral ao longo das 10 semanas de congelamento.

7. REFERÊNCIAS

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

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.498-505, 2001.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001. **Ministério da Saúde**, Governo Federal, Brasil. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>, Brasília, DF. Acesso em 15 de novembro de 2011.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Portaria n° 518, de 25 de março de 2004. **Ministério da Saúde**, Governo Federal, Brasil. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>, Brasília, DF. Acesso em 15 de novembro de 2011.

ATMAR, R.L.; METCALF, T.G.; NEILL, F.H.; ESTES, M.K. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.631-635, 1993.

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

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

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

- BÁNYAI, K.; MARTELLA, V.; MELG, E.; KISFALI, P.; PÉTERFI, Z.; BENKŐ, M.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary. **New Microbiologica**, v.32, p.185-188, 2009.
- BERK, A.J. Adenoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds). **Fields Virology**. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, p. 2356-2394, 2007.
- BOFFIL-MAS, S.; FORMIGA-CRUZ, M.; CLEMENTE-CASARES, P.; CALAFELL, F.; GIRONES, R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. **Journal of Virology**, v.75, p.10290-10299, 2001.
- BOFILL-MAS, S.; CLEMENTE-CASARES, P.; ALBIÑANA-GIMÉNEZ, N.; DE MOTES, C.M.; HUNDESA, A.; GIRONES, R. Effects on health of water and food contamination by emergent human viruses. **Revista Espanola de Salud Publica**, v.79, p. 253-269, 2005.
- BOFFIL-MAS, S.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CARRATALÁ, A.; GIRONES, R. Newly described human polyomaviruses Merkel Cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. **Virology Journal**, v.7, p.2-5, 2010.
- BOOTHPUR, R.; BRENNAN, D.C. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. **Journal of Clinical Virology**, v.47, p.306-312, 2010.
- BOSCH, A.; XAVIER ABAD, F.; PINTÓ, R.M. Human pathogenic viruses in the marine environment. In: Belkin; Colwell (Eds). **Ocean and health: Human pathogenic viruses in the marine environment**. New York: Springer, p.109-131, 2005.
- BOSCH, A.; LE GUYADER, F. Viruses in Shellfish. **Food Environmental Virology**, v.2, p.115-116, 2010.
- BUTT, A.A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDERS, C. V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v.4, p.201-212, 2004.

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

CALGUA, B.; BARARDI, C.R.M.; BOFILL-MAS, S.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; GIRONES, R. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. **Journal of Virological Methods**, v.171, p.1-7, 2011.

CASAN (Companhia Catarinense de Águas e Saneamento). História do Saneamento Básico de Florianópolis, 2010. Governo de Santa Catarina. Disponível em < <http://www.casan.com.br/index.php?sys=241> > Acesso em 16 de novembro de 2011.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Ministério do Meio Ambiente**, Governo Federal, Brasil, 2005.

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

CROCI, L.; SUFFRENDINI, E. Microbiological risk associated with seafood consumption. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v.39, n.1, p.35-45. 2003.

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

CUTHBERT, J.A. Hepatitis A: old and new. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.38-58, 2001.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). Produção de Moluscos, 2009. Disponível em: <

<http://www.epagri.rct-sc.br/epagri/index.jsp>>, Florianópolis, SC. Acesso em 10 de novembro de 2011.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). Síntese Informativa da Produção de Moluscos, 2010.

Disponível em <

http://cedap.epagri.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&Itemid=173 >, Florianópolis, SC. Acesso em 11 de novembro de 2011.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008, Fisheries Technical Paper. Disponível em:

http://www.fao.org/icatalog/search/result.asp?subcat_id=36. Acesso em 15 de novembro de 2011.

FERREIRA, J.F.; SILVA, F.C.; GOMES, C.H.A.M.; FERREIRA, F.M. Produção programada e rastreabilidade de larvas e sementes de moluscos em Santa Catarina. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.192-197, 2011.

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

FORMIGA-CRUZ, M.; HUNDESA, A.; CLEMENTE-CASARES, P.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; ALLARD, A.; GIRONES, R. Nested multiplex PCR assay for detection of human enteric viruses in shellfish and sewage. **Journal of Virological Methods**, v.125, p.111-118, 2005.

GENTRY, J.; VINJÉ, J.; LIPP, E.K. A rapid and efficient method for quantification of genogroups I and II norovirus from oysters and application on other complex environmental samples. **Journal of Virological Methods**, v.156, p.59-65, 2009.

GERBA, C.P. Survival of viruses in the marine environment. In: Belkin; Colwell (Eds). **Oceans and health: Pathogens in the marine environment**. New York: Springer, p.133-141, 2005.

GRIFFIN, D.W.; DONALDSON, K.A.; PAUL, J.H.; ROSE, J.B. Pathogenic human viruses in coastal waters. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.129-143, 2003.

GUILLOIS-BÉCEL, Y.; COUTURIER, E.; LE SAUX, J.C.; ROQUE-AFONSO, A.M.; LE GUYADER, F.S.; LE GOAS, A.; PERNÈS, J.; LE BECHEC, S.; BRIAND, A.; ROBERT, C.; DUSSAIX, E.; POMMEPUY, M.; VAILLANT, V. An oyster-associated hepatitis A outbreak in France in 2007. **Euro Surveillance**, v.14, 2009.

HARAMOTO, E.; KATAYAMA, H.; OGUMA, K.; OHGAKI, S. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2153-2159, 2007.

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

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

HOLLINGER, F.B.; EMERSON, S.U. Hepatitis A Virus. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds). **Fields Virology**. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.912-947, 2007.

HUNDESA, A.; MALUQUER DE MOTES, C.; BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; GIRONES, R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.7886-7893, 2006.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 08 de novembro 2010, p.1-219, 2010.

IMPERIALE, M.J.; MAJOR, E.O. Polyomaviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Eds). **Fields Virology**. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2264-2298.

IWAMOTO, M.; AYERS, T.; MAHON, B.E.; SWERDLOW, D.L. Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v.23, p.399-411, 2010.

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

KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F.B.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-Like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1548-1557, 2003.

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

KO, G.; JOTHIKUMAR, N.; HILL, V.R.; SOBSEY, M.D. Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.127, n.2, p.148-53. 2005.

KOZLOWSKI, A. G.; MOTTA-CASTRO, A.R.C.; NASCIMENTO, L.B.; SILVA, A.M.C.; TELES, S.A.; VILLAR, L.M; GASPAR, A.M.C.; MARTINS, R.M.B. Prevalence of hepatitis A virus infection in Afro-Brazilian isolated communities in Central Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.121-123, 2007.

KUO, D.H.-W.; SIMMONS, F.J.; BLAIR, S.; HART, E.; ROSE, J.B.; XAGORARAKI, I. Assessment of human adenovirus removal in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. **Water Research**, v.44, p.1520-1530, 2010.

LAMBERTINI, E.; SPENCER, S.K.; BERTZ, P.D.; LOGE, F.J.; KIEKE, B.A.; BORCHARDT, M.A. Concentration of enteroviruses, adenoviruses and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.2990-2996, 2008.

LA ROSA, G.; POURSHABAN, M.; IACONELLI, M. e MUSCILLO, M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. **Annali Dell Istituto Superiore Di Sanita**, v.46, n.3, p.266-273. 2010.

LAWS, E.A. Aquatic Pollution: an introductory text, 2nd edition. **John Wiley and Sons, Inc.**, New York, p.611, 1993.

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

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

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

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

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, p.371-409, 2002.

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

- MAALOUF, H.; POMMEPUY, M.; LE GUYADER, F.S.
Environmental Conditions Leading to Shellfish Contamination and Related Outbreaks. **Food and Environmental Virology**, v.2, p.136-145, 2010.
- MCLEOD, C.; HAY, B.; GRANT, C.; GREENING, G.; DAY, D.
Inactivation and elimination of human enteric viruses by Pacific oysters. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.1809–1818, 2009.
- MCNEES, A.L.; WHITE, Z.S.; ZANWAR, P.; VILCHEZ, R.A.; BUTEL, J.S. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. **Journal of Clinical Virology**, v.34, p.52-62, 2005.
- MENA, K.D.; GERBA, C.P. Waterborne Adenovirus. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.198, p.133-167, 2008.
- MORESCO, V.; VIANCELLI, A.; NASCIMENTO, M.A.; SOUZA, D.S.M.; RAMOS, A.P.D.; GARCIA, L.A.T.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, in press doi:10.1016/j.marpolbul.2011.10.026, 2011.
- MORGA, J.H.; LEON-FELIX, J.; PERAZA-GARAY, F.; GIL-SALAS, B.G.; CHAIDEZ, C. Detection and characterization of hepatitis A virus and norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration-RT-PCR integrated methods. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.1579-1590, 2009.
- MORSE, D.; GUZEWICH, J.; HANRAHAN, J. Widespread outbreaks of clam- and oyster-associated gastroenteritis: the role of Norwalk virus. **The New England Journal of Medicine**, v.314, p.678–81, 1986.
- MURPHY, A.; GROHMANN, G.; CHRISTOPHER, P.; LOPEZ, W.; DAVEY G.; MILLSOM, R. An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. **The Medical Journal of Australia**, v.2, p.329–33, 1979.

- NOBLE, R.T.; LEE, I.M.; SCHIFF, K.C. Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.464-472, 2004.
- NORDGREN, J.; MATUSSEK, A.; MATTSSON, A.; SVENSSON, L.; LINDGREN, P.-E. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. **Water Research**, v.43, p.1117-1125, 2009.
- OLSON, M.R.; AXLER, R.P.; HICKS, R.E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **Journal of Virological Methods**, v.122, p.147-152, 2004.
- ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H.M.; ABDELZAHER, A.; WRIGHT, M.; DENG, Y.; STARK, L.M. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical Estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v.58, p.1374-1381, 2009.
- PAL, A.; SITORA, L.; MAUDRU, T.; PEDEN, K.; LEWIS JR, A.M. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. **Journal of Virological Methods**, v.135, p.32-42, 2006.
- PAULILO, M. I. S. Maricultura e Território em Santa Catarina. BRASIL. **Cadernos de Pesquisa**, v.31, 2002.
- PATEL, M.M.; WIDDOWSON, M.A.; GLASS, R.I.; AKAZAWA, K.; VINJÉ, J.; PARASHAR, U.D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1224-1231, 2008.
- PETRIGNANI, M.; VERHOEF, L.; VAN HUNEN, R.; SWAAN, C.; VAN STEENBERGEN, J.; BOXMAN, I.; OBER, H.J.; VENNEMA, H. KOOPMANS, M. A possible foodborne outbreak of hepatitis A in the Netherlands, January-February 2010. **Euro Surveillance**, v.15, 2010.
- PINA, S.; PUIG, M.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human Adenovirus

detection by PCR as an index of Human viruses. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3376-3382, 1998.

PINTÓ, R.M.; COSTAFREDA, M.I.; PÉREZ-RODRIGUEZ, F.J.; ANDREA, L.D.; BOSCH, A. Hepatitis A: State of the art. **Food and Environmental Virology**, v.2, p.127-135, 2010.

POMMEPUY, M.; HERVIO-HEATH, D.; CAPRAIS, M.P.; GOURMELON, M.; LE SAUX, J.C.; LE GUYADER, F. Fecal contamination in coastal areas: An engineering approach. **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**. Capítulo de livro, p.331-359, 2006.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious Outbreaks Associated with Bivalve Shellfish Consumption: A Worldwide Perspective. **Clinical Infectious Diseases**, v.35, p.921-8, 2002.

RICHARDS, G.P. Enteric Viruses contamination of foods through industrial practices: a primer on interventions strategies. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.117-125, 2001.

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

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

RIGOTTO, C.; HANLEY, K.; ROCHELLE, P.A.; DE LEON, R.; BARARDI, C.R.M.; YATES, M.V. Survival of Adenovirus Types 2 and 41 in Surface and Ground Waters Measured by a Plaque Assay. **Environmental Science and Technology**, v.45, p.4145-4150, 2011.

SCHEIFELE, W.; DE SERRERES, G.; GILCA, V.; DUVAL, B.; MILNER, R.; HO, M.; OCHNIO, J.J. A nationwide survey of past

hepatitis A infections among Canadian adults. **Vaccine**, v.28, p.5174-5178, 2010.

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

SINCERO, T.C.; LEVIN, D.B.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Detection of hepatitis A virus (HAV) in oysters (*Crassostrea gigas*). **Water Research**, v.40, p.895-902, 2006.

SIRIKANCHANA, K.; SHISLER, J.L.; MARIÑAS, B.J. Inactivation kinetics of adenovirus serotype 2 with monochloramine. **Water Research**, v.42, p.1467-1474, 2008.

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

SOUZA, R.V.; NOVAES, A.L.T.; SANTOS, A.A.; RUPP, G.S.; SILVA, F.M. Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves no Litoral de Santa Catarina. Panorama da Aquicultura. **EPAGRI**, Florianópolis, p.55-59, 2009.

SOUZA, D. S. M.; RAMOS, A. P. D.; NUNES, F. F.; MORESCO, V.; TANIGUCHI, S.; LEAL, D. A. G.; SASAKI, S. T.; BÍCEGO, M. C.; MONTONE, R. C.; DURIGAN, M.; TEIXEIRA, A. L.; PILOTTO, M. R.; DELFINO, N.; FRANCO, R. M. B.; MELO, C. M. R.; BAINY, A. C. D.; BARARDI, C. R. M. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.76, p.153-161, 2012.

VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M.M.; HEIN, A.; GRABOW, W.O.K. Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.234-242, 2005.

VICTORIA, M.; RIGOTTO, C.; MORESCO, V.; CORRÊA, A.A.; KOLESNIKOVAS, C.; LEITE, J.P.G; MIAGOSTOVICH, M.P.; BARARDI, C.R.M. Assessment of norovirus contamination in

environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil.

Journal of Applied Microbiology, v.109, p.231–238, 2010.

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

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

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Report on Infectious Diseases. Geneva: WHO; 2007. Disponível em: < www.who.int/infectious-disease-report >.

WYN-JONES, A.P.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.945-962, 2001.

WYN-JONES, A.P.; CARDUCCI, A.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; DIVIZIA, M.; FLEISCHE, J.; GANTZER, C.; GAWLER, A.; GIRONES, R.; HOLLER, C.; HUSMAN, A.M.R.; KAY, D.; KOZYRA, I.; LOPEZ-PILA, J.; MUSCILLO, M.; NASCIMENTO, M.S.J.; PAPAGEORGIOU, G.; RUTJES, S.; SELLWOOD, J.; SZEWZYK, R.; WYER, M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. **Water Research**, v.45, p.1025–1038, 2011.

XAGORARAKI, I.; KUO, D.H.-W.; WONG, K.; WONG, M.; ROSE, J.B. Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the Great Lakes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7874-7881, 2007.

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