

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

KAROLINA FERNANDES SCARPATI DE SOUZA

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE VÍRUS ENTÉRICOS EM MEXILHÃO (*Mytella guyanensis* e *Mytella charruana*) E OSTRA (*Crassostrea rhizophorae*) EM ÁREA DE MANGUEZAL DA BAÍA DE VITÓRIA (ES) COM A UTILIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

VITÓRIA
2012

KAROLINA FERNANDES SCARPATI DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE
VÍRUS ENTÉRICOS EM MEXILHÃO (*Mytella guyanensis* e *Mytella charruana*) E
OSTRA (*Crassostrea rhizophorae*) EM ÁREA DE MANGUEZAL DA BAÍA DE
VITÓRIA (ES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Ambiental na área de Saneamento.

Orientador: Prof^a Dr^a Regina de Pinho Keller

VITÓRIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES,
Brasil)

Souza, Karolina Fernandes Scarpati de, 1988-
S729a Avaliação quantitativa de vírus entéricos em mexilhão
(*Mytella guyanensis* e *Mytella charruana*) e ostra (*Crassostrea
rhizophorae*) em área de manguezal da Baía de Vitória (ES) com
a utilização da PCR em tempo real / Karolina Fernandes
Scarpati de Souza. – 2012.
143 f. : il.

Orientadora: Regina de Pinho Keller.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Águas residuais. 2. Esgotos. 3. Manguezais. 4. Bivalve
(Molusco) - Vitória, Baía de (ES). 5. Bactérias. 6. Vírus. 7. Água
poluída por vírus. I. Keller, Regina de Pinho. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. III. Título.

CDU: 628

KAROLINA FERNANDES SCARPATI DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE
VÍRUS ENTÉRICOS EM MEXILHÃO (*Mytella guyanensis* e *Mytella charruana*) E
OSTRA (*Crassostrea rhizophorae*) EM ÁREA DE MANGUEZAL DA BAÍA DE
VITÓRIA (ES).**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental na área de Saneamento.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Regina de Pinho Keller
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Sérgio Túlio A. Cassini
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Profa. Dr^a. Maria Inês Zanoli Sato
Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Examinador Externo

À minha família

AGRADECIMENTOS

Depois de 24 meses de dedicação exclusiva a este projeto, concluo com um grande senso de realização e gratidão a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a desenvolver esse trabalho!

Agradeço de forma especial e muito carinhosa a minha Orientadora Dra. Regina de Pinho Keller pelo treinamento, dedicação, paciência e cuidados que em muitos momentos foram bem além de sua atribuição como orientadora.

Agradeço ao Prof.^o Dr. Sérgio Túlio pelo apoio e contribuições em diversos momentos para este trabalho.

Agradeço a Professora Dra. Mariza Miagostovich colaboradora deste trabalho e à equipe do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Túlio Fumian, Adriana Correa, Carmen Baur, José Paulo Leite e Eduardo Volotão pela gentil recepção, treinamento e disposição em contribuir para o andamento das análises.

Agradeço a todos os funcionários do Labsan, especialmente a Paulo, Márcia, e a secretária do PPGEA Rose pela prontidão em ajudar e paciência demonstrada comigo em muitos momentos.

Agradeço aos meus queridos comparsas Susanne Mariane, Rodrigo Pratte e Sara Angeline por esses dois anos de trabalho 'ombro a ombro', por dividirem comigo todas as tensões, preocupações, e principalmente cada pequena realização ao longo do projeto.

Agradeço a todos os colegas do Labsan que estiveram comigo durante esta caminhada: Andrea, Bruna, Paulo Wagner, Moisés, Ademir, Lorena, Karoline, Waldiléia, Cris, Rodrigo... "foi um prazer miserável"!!

Agradeço ao barqueiro Renné e sua família por serem sempre tão prestativos e proporcionarem coletas tão divertidas durante todos os meses.

Agradeço a minha família, meus pais Madalena e Antônio, meu irmão Kássio pelo apoio completo e incondicional. Tudo que me ensinaram contribuiu para que eu chegasse até aqui e eu espero poder retribuir pelo menos em parte tudo que vocês sempre fizeram por mim!!

Agradeço aos meus familiares que pelo apoio prático e palavras de encorajamento me ajudaram a recuperar o ânimo em muitos momentos: tia Sônia, tia Ailza, tio Faustini; primos Matheus, Cláudia, Fernanda e Clara.

Agradeço a todos os meus queridos melhores amigos: Mery Kethlen, Bianca, Annelise, Cláudio, Silvia, Nathália, Igor, Rogério, Luciano, Daniel, César, Kámala e Fabíola. 'Verdadeiros amigos são a família que nos permitiram escolher'.

Agradeço a Eliene e Érico Machado pelos anos de cuidado e companhia. "Tem gente que vem pra ficar...".

Agradeço a Cíntian Rodrigues, pelo período de boa convivência e amizade. 'Existem amigos que se apega mais que a um irmão'.

Agradeço a todos os meus queridos irmãos na fé. Por todo apoio, cuidado e edificação.

Agradeço sem dúvida ao nosso bom Deus, Jeová, o 'dador de toda boa dádiva'!

Muito obrigada!!!!

“Muitas pessoas vêm o que é, e nunca o que pode ser”.
(Albert Einstein)

RESUMO

A região da Ilha das Caieiras, na cidade de Vitória (ES) está localizada no entorno do estuário da Baía de Vitória e próxima a uma extensa área de manguezal urbano. É habitada por uma população que diariamente extrai diversos frutos do mar dessa área para consumo próprio e comercialização. Estudos preliminares realizados recentemente na região já mostraram a contaminação da água e de moluscos bivalves por microrganismos patogênicos provenientes de contaminação fecal. O presente trabalho teve por objetivo ampliar o conhecimento da qualidade microbiológica dos bivalves (sururu de mangue: *Mytella guyanensis*, sururu de coroa: *Mytella charruana* e ostra: *Crassostrea rhizophorae*) procedentes de dois pontos do estuário desta área de manguezal, ao longo de 13 meses de monitoramento (Janeiro/2011 - Janeiro/2012). Foram avaliadas um total de 31 amostras para presença de coliformes termotolerantes (CT) e vírus entéricos (adenovírus – AdV; rotavírus – RV; e norovírus – NoV GII), utilizando-se a nested-PCR e PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Também foram avaliados parâmetros físico-químicos da água próxima ao ponto de coleta dos bivalves. Os resultados das análises microbiológicas do sururu de coroa (n=13), sururu de mangue (n=5) e ostra de mangue (n=13) demonstraram alta prevalência de CT, com médias geométricas de $1,47 \times 10^5$, $1,47 \times 10^5$ e $4,24 \times 10^4$ UFC/100g de tecido, respectivamente. Nas amostras de água a concentração de CT apresentou-se em conformidade com o padrão exigido para águas recreacionais. Vírus entéricos foram detectados pela nested e qPCR nos mesmos bivalves com frequências variando entre 31 – 54% para AdV, 54 – 70% para RV e 54 – 85% para NoV GII. A presença de AdV e RV esteve correlacionada positivamente à turbidez e aos sólidos dissolvidos totais (SDT). Nas amostras de água do estuário, os valores máximos quantificados foram $3,0 \times 10^2$, $3,2 \times 10^4$ e $1,6 \times 10^1$ CG/100 mL para AdV, RV e NoV, respectivamente. A elevada contaminação viral e bacteriológica das amostras indica que esta área continua sob impacto antropogênico resultante do despejo de esgoto sanitário na região, e que o consumo de diferentes espécies de bivalves procedentes do manguezal da Ilha das Caieiras apresenta um potencial risco de causar doenças gastrointestinais aos consumidores, especialmente se ingeridos crus.

Palavras chave: Manguezal, Moluscos Bivalves, Vírus Entéricos, Coliformes termotolerantes, qPCR.

ABSTRACT

Ilha das Caieiras is a region located at the estuary of Vitoria Bay (Vitoria ES, Brazil) surrounded by a large area of urban mangrove. Great part of the population is involved on shellfish harvesting as economic as well as a subsistence activity in this region. Previous studies have already demonstrated water as well as shellfish contamination by pathogenic microorganisms from fecal contamination. The objective of this work was to improve the knowledge of microbiological quality of mussels (*Mytella guyanensis* and *Mytella charruana*) and oysters (*Crassostrea rhizophore*) collected from two points of the estuary mangrove area over 13 months of monitoring (January/2011 - January/2012). A total of 31 samples were evaluated for the presence of *E. coli* and enteric viruses (adenovirus - AdV; rotavirus - RV, and norovirus - NoV GII), using the nested-PCR and real-time quantitative PCR (qPCR). Physico-chemical parameters of the water near the point of collection of shellfish were also evaluated. The results of microbiological analyses of mussels: *Mytella guyanensis* (n=5), *Mytella charruana* (n=13) and oysters (n=13) showed a high prevalence of *E. coli*, with geometric mean of 1.47×10^5 , 1.47×10^5 and 4.24×10^4 FCU /100g of tissue, respectively. In water samples the concentration of *E. coli* was in accordance with the Brazilian Standard for Recreational Waters. Enteric viruses were detected by nested and qPCR at frequencies ranging from 31-54% for AdV, 54-70% for RV and 54-85% for NoV GII. Adenoviruses and rotaviruses were positively correlated with turbidity and total dissolved solids (TDS). In water samples the maximum values obtained were 3.0×10^2 , 3.2×10^4 and 1.6×10^1 CG/100ml for AdV, NoV and RV, respectively. In conclusion, the high bacteriological and viral contamination of bivalves indicates that the region remains under anthropogenic impact, resulted of the discharge of sewage in the region, and that the consumption of different types of shellfish from Ilha das Caieiras presents a potential risk of gastrointestinal diseases to consumers, especially if ingested raw.

Keywords: Mangrove, Bivalve Mollusks, Enteric Viruses, *E. coli*, qPCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Região de estudo no entorno da Ilha de Vitória (ES).....	26
Figura 2: Rotas de transmissão de vírus entéricos.....	38
Figura 3: Estrutura genômica e tridimensional do virion RV	40
Figura 4: Proteínas e estrutura de AdV.	44
Figura 5: Organização do genoma de norovírus e produtos protéicos.....	47
Figura 6: Estratégia de replicação dos norovírus.....	48
Figura 7: Etapas da amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	52
Figura 8: Amplificação exponencial da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	52
Figura 9: PCR em tempo real com sonda TaqMan.....	53
Figura 10: Mapa do sistema estuarino da Baía de Vitória com os pontos de extração de ostras e sururus.....	61
Figura 11: Fluxograma das principais etapas realizadas na detecção e quantificação de bactérias (coliformes termotolerantes) nas amostras de água do estuário e bivalves.....	63
Figura 12: Fluxograma das principais etapas realizadas na detecção e quantificação de vírus entéricos nas amostras de água do estuário e bivalves.....	64
Figura 13: Monitoramento da turbidez no dia de coleta nos dois pontos do estuário, de Janeiro/2011 a Janeiro/2012.....	75
Figura 14: Monitoramento dos sólidos totais dissolvidos no dia de coleta nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.....	76
Figura 15: Monitoramento da condutividade no dia de coleta nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.....	76
Figura 16: Monitoramento da salinidade no dia de coleta nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.....	77
Figura 17: Monitoramento da temperatura no dia de coleta, nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.....	77
Figura 18: Monitoramento do pH no dia de coleta, nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.....	78
Figura 19: Monitoramento do oxigênio dissolvido no dia de coleta, nos dois pontos do estuário de junho/2011 a janeiro/2012.....	78

Figura 20: Resultados da média mensal do monitoramento de coliformes tertolerantes pelo método da membrana filtrante das amostras de água do estuário, sururus e ostras.....	81
Figura 21: Monitoramento do número de partículas virais de AdV no dia de coleta e valores de SDT no dia de coleta, de janeiro/11 a janeiro/2012.....	92
Figura 22: Monitoramento do número de partículas virais de RV no dia de coleta e valores de SDT no dia de coleta, de janeiro/2011 a janeiro/2012.....	93
Figura 23: Monitoramento do número de partículas virais de NoV GII no dia de coleta e valores de SDT no dia de coleta, de janeiro/2011 a janeiro/2012.....	93
Figura 24: Manilhas podem ser observadas nas saídas dos bairros da região da Ilhas das Caireiras beirando as margens do estuário.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação de contaminação ambiental na Baía de Vitória realizada por diferentes autores.....	28
Tabela 2: Microrganismos causadores de doenças veiculadas pelo consumo de moluscos bivalves.....	31
Tabela 3: Agentes biológicos envolvidos em doenças ocasionadas pelo consumo de moluscos bivalves contaminados.....	32
Tabela 4: Resumo dos vírus entéricos avaliados no estudo de Justino (2009) e no atual trabalho.....	37
Tabela 5: Classificação Europeia de áreas de crescimento de bivalves de acordo com a presença de <i>Escherichia coli</i>	55
Tabela 6: Pontos de amostragem.....	60
Tabela 7: Concentrações finais dos reagentes da PCR convencional em cada reação.....	68
Tabela 8: Programa para reações de PCR de AdV, RV e NoV.....	69
Tabela 9: Programa para reações de nested-PCR de AdV, RV e NoV.....	69
Tabela 10: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR e nested PCR.....	70
Tabela 11: Concentrações finais dos primers e sondas da qPCR em cada reação..	71
Tabela 12: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sonda da qPCR.....	72
Tabela 13: Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos analisados durante os 13 meses de monitoramento.....	80
Tabela 14: Resultados de estatística descritiva da concentração de coliformes termotolerantes nas amostras pesquisadas pelo método da membrana filtrante.....	82
Tabela 15: Ocorrência de vírus detectados durante o período de monitoramento para amostras de água, sururus e ostras por análise de PCR qualitativa e qPCR.....	84
Tabela 16 – Frequência de genoma de AdV, RV e NoV por nested-PCR e qPCR em água, sururus e ostras durante 13 meses de monitoramento.....	85
Tabela 17: Comparação dos métodos moleculares da nested-PCR x qPCR para detecção de AdV em moluscos no período de monitoramento de dezembro/10 a Janeiro/12.....	87

Tabela 18: Comparação dos métodos moleculares da nested-PCR x qPCR para detecção de AdV em moluscos no período de monitoramento de dezembro/10 a Janeiro/12.....	88
Tabela 19: Comparação dos métodos moleculares da nested-PCR x qPCR para detecção de AdV em moluscos no período de monitoramento de dezembro/10 a Janeiro/12.....	89
Tabela 20: Quantificação de AdV em amostras de água (nº copias genômicas/100mL) e mariscos (nº copias genômicas/g) por PCR em Tempo Real.....	90
Tabela 21: Quantificação de RV em amostras de água (nº copias genômicas/100mL) e mariscos (nº copias genômicas/g) por PCR em Tempo Real.....	91
Tabela 22: Quantificação de NoV GII em amostras de água (nº copias genômicas/100mL) e mariscos (nº copias genômicas/g) por PCR em Tempo Real.....	91
Tabela 23: Locais associados a ocorrência de DTA no Brasil de 1999 a 2010.....	96
Tabela 24: Detecção de vírus entéricos em amostras de água e moluscos bivalves observada por diferentes autores.....	105
Tabela 25: Quantificação de vírus entéricos em amostras ambientais, clínicas e de moluscos bivalves observada por diferentes autores.....	110

LISTA DE SIGLAS

AdV - Adenovírus
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As – Arsênio
BNDO - Banco Nacional de Dados Oceanográficos
Cd – Cádmiio
cDNA – DNA complementar
CE – Conselho Europeu
CESAN - Companhia Espírito Santense de Saneamento
CG – Cópias Genômicas
cm – centímetro
CNCMB - Comitê Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cr - Cromo
DEA – Departamento de Engenharia Ambiental
DLP - Partículas de duplo capsídeo
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic Acid)
DNTP - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos
ES - Espírito Santo
EU SQAP - *The European Union Shellfish Quality Assurance Programme*
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FDA – *Food and Drug Administration*
Fe - Ferro
GPS – Sistema de Posicionamento Global
Ha - Hectare
Hg – Mercúrio
°C – grau Celsius
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, assistência técnica e extensão Rural.
INCQS - Segundo o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
kb – quilobase

L - Litro
LABSAN - Laboratório de Saneamento
M – Molar
mg - miligrama
mL - mililitro
mM - milimolar
Mn – Manganês
MS – Ministério da Saúde
mS/cm - milisiemens por centímetro
 μ L – microlitro
 μ m – micrometro
 μ M - micromolar
 μ g– micrograma
n - número de amostras
Ni – Níquel
nm - nanômetro
NMP - Numero Mais Provável
NSP - Non Structural Protein
NoV - Norovírus
OMS - Organização Mundial da Saúde
ORF - *Open Reading Frame*
P1 – Ponto 1
P2 – Ponto 2
Pb - Chumbo
pb – par de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PEG - Polietilenoglicol
pH - Potencial Hidrogeniônico
PMV – Prefeitura Municipal de Vitória
PNSB - Pesquisa Nacional de Saneamento
p/v - peso/volume
RER – Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA - *Ribonucleic Acid*
RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RV - Rotavírus

s - segundo

SDT - Sólidos Dissolvidos Totais

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

t - Tonelada

TE – Tris/EDTA

TBE – Tris/Borato/EDTA

U - Unidade

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFP - Unidade Formadora de Placa

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

USEPA - *United States Environmental Protection Agency*

UV – Ultravioleta

V - Volt

VP - *Viral Protein*

WHO - *World Health Organization*

Zn - Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1 Aspectos gerais o saneamento básico no Brasil e impactos de seu déficit sobre a zona costeira.....	23
3.2 O sistema estuarino e manguezal da Baía de Vitória.....	25
3.3 Distribuição e importância de Moluscos Bivalves.....	28
3.3.1 Como alimento	28
3.3.2 Moluscos bivalves como indicadores ambientais.....	30
3.3.3 Moluscos bivalves como um veículo de doenças transmitidas por alimentos (DTAs).....	31
3.4 Microrganismos Indicadores de contaminação fecal: Coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i>	35
3.5 Vírus Entéricos.....	37
3.5.1 Características Gerais.....	37
3.5.1.1 Rotavírus.....	39
3.5.1.1.1 Estrutura e Classificação.....	39
3.5.1.1.2 Replicação.....	41
3.5.1.1.3 Patogênese.....	41
3.5.1.2 Adenovírus Humanos.....	43
3.5.1.2.1 Estrutura e Classificação.....	43
3.5.1.2.2. Replicação.....	44
3.5.1.2.3 Patogênese.....	44
3.5.1.3 Norovírus.....	46
3.5.1.3.1 Estrutura e Classificação.....	46
3.5.1.3.2. Replicação.....	47
3.5.1.3.3. Patogênese.....	48
3.6 Métodos usados para detecção de vírus entéricos humanos.....	49

3.7 Legislação referente à qualidade de moluscos bivalves.....	54
3.7.1 Europa e EUA.....	54
3.7.2 No Brasil.....	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.1 Descrição da Área de Estudo.....	59
4.2 Coleta das amostras.....	59
4.3 Análises Laboratoriais.....	62
4.3.1 Análises Físico-Químicas das amostras de água.....	62
4.3.2 Análises Microbiológicas das amostras de água e bivalves.....	62
4.3.2.1 Análises Bacteriológicas.....	65
4.3.2.2 Análises Virais.....	65
4.3.2.2.1 Processamento e concentração das amostras de água.....	65
4.3.2.2.2 Processamento e concentração nas amostras de bivalves.....	66
4.3.2.2.3 Extração dos ácidos nucleicos.....	67
4.3.2.2.4 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	67
4.3.3 Análises moleculares.....	68
4.3.3.1 Amplificação do DNA pela PCR convencional.....	68
4.3.3.2 Visualização dos produtos de PCR convencional em gel de agarose.....	70
4.3.3.3 Quantificação do DNA viral pela PCR em tempo real.....	70
4.3.3.3.1 Adenovírus.....	70
4.3.3.3.2 Rotavírus.....	71
4.3.3.3.3 Norovírus.....	71
4.3.3.4 Cálculo para conversão em número de partículas virais/g.....	72
4.3.4 Controle de qualidade.....	73
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
5. RESULTADOS	75
5.1 Análises Físico-Químicas da água.....	75
5.2 Análises Bacteriológicas.....	81
5.3 Detecção viral.....	83
6. DISCUSSÃO.....	94
6.1 Contaminação do Manguezal da Baía de Vitória.....	94

6.2 Influência de fatores físico-químicos sobre a presença de microrganismos em água e moluscos bivalves	97
6.3 Detecção de coliformes termotolerantes nas amostras de água e moluscos bivalves.....	100
6.4 Detecção viral nas amostras de água do estuário, e moluscos bivalves.....	104
6.5 A PCR em tempo real como ferramenta na detecção e quantificação de microrganismos em amostras ambientais.....	109
7. CONCLUSÕES.....	114
8. PERSPECTIVAS.....	116
9. REFERÊNCIAS.....	117
ANEXO 1.....	140
ANEXO 2.....	142

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 1/3 da população brasileira habita na zona costeira e quase metade reside a menos de 200 quilômetros da costa. A ocupação desordenada, contudo, resulta em impactos diretos aos ambientes litorâneos. O crescimento populacional pressiona o ambiente marinho e costeiro, gerando esgotos domésticos como um produto inevitável dos assentamentos humanos.

A população que vive no entorno de áreas contaminadas é especialmente afetada, já que muitos utilizam este ambiente como sua fonte de subsistência e lazer. Outra consequência é a contaminação de alimentos marinhos, especialmente os filtradores, tais como moluscos bivalves (ostras, mexilhões e vieiras), os quais podem acumular e concentrar contaminantes presentes na água, incluindo bactérias e vírus patogênicos, que acarretam em risco à saúde quando consumidos *in natura* ou mal cozidos.

A região da Ilha das Caieiras, na cidade de Vitória (ES) está localizada no entorno do estuário da Baía de Vitória e encontra-se próxima a uma extensa área de manguezal. É habitada por uma população em sua maioria de baixa renda, que se vale da venda de diversos frutos do mar para consumo próprio e comercialização.

Estudos preliminares já demonstraram que algumas espécies de alimentos marinhos dessa região, como o sururu do mangue e carangueijo-uçá estão contaminados por *Escherichia coli*, vírus entéricos (adenovírus e rotavírus) e metais pesados, colocando em risco a saúde da população e dos turistas que usufruem dessa atração culinária.

Técnicas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas com o fim de detectar microrganismos em amostras alimentares e ambientais. Neste contexto, este trabalho visou avaliar a qualidade microbiológica de mexilhões (sururu do mangue – *Mytella guyanensis* e sururu de coroa – *Mytella charruana*) e ostras (*Crassostrea Rhizophorae*) em área de manguezal do sistema estuarino da Baía de Vitória, ao longo de 13 meses de monitoramento (Janeiro/2011–Janeiro/12) por análise de bactérias indicadoras de contaminação fecal pela técnica da membrana filtrante e de vírus entéricos (adenovírus, norovírus e rotavírus) pelas técnicas moleculares de nested-PCR e qPCR.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a qualidade microbiológica dos bivalves (sururu de mangue: *Mytella guyanensis*, sururu de coroa: *Mytella charruana* e ostra: *Crassostrea rhizophorae*) procedentes de área de manguezal do sistema estuarino da Baía de Vitória (ES).

2.2 Objetivos Específicos:

- Detectar indicadores de poluição fecal (coliformes termotolerantes) na água e nos bivalves (sururu de mangue: *Mytella guyanensis*; sururu de coroa: *Mytella charruana* e ostra *Crassostrea rhizophorae*) utilizando o método da membrana filtrante.
- Detectar e quantificar vírus entéricos (adenovírus, rotavírus e norovírus) nas amostras de água e nos bivalves (sururu de mangue: *Mytella guyanensis*; sururu de coroa: *Mytella charruana* e ostra *Crassostrea rhizophorae*) pelos métodos da PCR convencional e PCR em tempo real.
- Correlacionar os parâmetros físico-químicos da água (pH, condutividade, turbidez, sólidos dissolvidos, oxigênio dissolvido, salinidade, temperatura e pluviosidade) com a presença de vírus entéricos e coliformes termotolerantes nos bivalves.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais do saneamento básico no Brasil e impactos de seu déficit sobre a zona costeira

O Saneamento Básico tem sido definido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) como “conjunto de ações com o objetivo de alcançar níveis crescentes de salubridade ambiental, nas condições que maximizem a promoção e a melhoria das condições de vida dos meios urbano e rural, compreendendo o abastecimento de água, o esgotamento sanitário, o manejo de águas pluviais e o manejo de resíduos sólidos”. A oferta de saneamento básico é fundamental em termos de qualidade de vida, pois sua ausência acarreta poluição dos recursos hídricos, trazendo prejuízo à saúde da população, principalmente o aumento da mortalidade infantil em decorrência do aumento de doenças, como a diarreia (IBGE, 2010).

Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento (PNSB) realizada pelo IBGE (2010) em 2008, pouco mais da metade dos municípios brasileiros (55,2%) tinham serviço de esgotamento sanitário por rede coletora, e apenas 28,5% dos municípios brasileiros fizeram tratamento de seu esgoto. Mesmo na Região Sudeste, onde 95,1% dos municípios possuíam coleta de esgoto, menos da metade desses (48,4%) o trataram.

O crescimento populacional urbano das últimas décadas certamente apresenta uma forte correlação com este déficit de saneamento nos municípios brasileiros. A partir da década de 50, com o processo de industrialização no Brasil, as inovações econômicas, ampliação dos meios de transporte associados ao êxodo rural, resultou em maior crescimento das cidades, dando início a um processo de metropolização. Em 1970, a população urbana já era mais da metade (55,92%) da população do País. Esse cenário propiciou na década de 90, na maioria das grandes cidades, inclusive do Sudeste e do Sul do Brasil, o aumento da formação de favelas e de estruturas desorganizadas de moradias (OLIVEIRA, 2008).

Essa ocupação desordenada tem resultado em impactos diretos e indiretos sobre os ambientes litorâneos, especialmente por terem se tornado o principal local de lazer, turismo ou moradia de grandes massas de populações urbanas (GEO BRASIL, 2002). Só no Brasil, essa preferência pode ser observada pela concentração de cerca de 1/3 da população brasileira habitando na região costeira e quase metade a menos de 200 quilômetros da costa (MMA, 2007).

O desmatamento e aterro de regiões costeiras para dar lugar a portos, estradas, agricultura, carcinocultura estuarina, invasões urbanas e industriais, tem comprometido essas áreas por ocasionar o derramamento de petróleo, o lançamento de esgotos, de lixo, de poluentes industriais, de agrotóxicos, assim como a pesca predatória (GEO BRASIL, 2002).

É importante ressaltar que os corpos hídricos receptores apresentam a capacidade de autodepuração. No entanto, o crescimento populacional aumentou tão vertiginosamente a quantidade de esgotos e outros poluentes lançados na Zona Costeira, próxima aos centros urbanos que sua capacidade foi superada pela carga poluidora dos efluentes (GEO BRASIL, 2002).

Além do problema da poluição, as estimativas mostram que 80% das doenças e mais de 1/3 da taxa de mortalidade em todo o mundo decorrem da má qualidade da água utilizada pela população ou falta de esgotamento sanitário adequado (BARROSO, 2002).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, no Brasil, os gastos com doenças relacionadas com água contaminada e falta de esgotamento sanitário chegam à casa dos US\$ 2,5 bilhões por ano (LAZZARINI, 2002), enquanto inúmeras doenças poderiam ser evitadas com a simples presença de um sistema de saneamento básico mais abrangente.

3.2 O sistema estuarino e manguezal da Baía de Vitória

Os ecossistemas da Zona Costeira de maior relevância são os estuários, manguezais e lagoas costeiras, em função do elevado grau de interferência com a gestão de recursos hídricos.

O manguezal é um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, fato que o classifica como ambiente complexo, diversificado e de extrema importância para a sustentação da vida no mar, principalmente por fornecer as excepcionais condições de abrigo e suporte à reprodução e à alimentação inicial da maioria das espécies que habitam os oceanos (SHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1995).

O Brasil possui de 10.000 a 25.000 km² de manguezais, dependendo da fonte consultada (YOKOYA, 1995). Desde o Amapá até Santa Catarina são encontrados ao longo de todo o litoral, margeando estuários, baías, lagoas e enseadas.

Em geral, os manguezais são afetados por várias condições interligadas, como correntes de água, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido, etc, e principalmente por influência antrópica, como lançamento de efluentes, invasões e aterros, disposição de lixo urbano, e exploração predatória de seus recursos naturais (SHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1995).

Os manguezais ao norte da Baía de Vitória têm sua distribuição apresentada na Figura 1, ocupando uma área em torno de 2.000 ha, distribuindo-se a leste pelo município de Vitória, ao norte pelo município da Serra e a oeste pelo município de Cariacica. Os principais rios que deságuam nesta região são o Santa Maria da Vitória, o Bubu, o Marinho e o Aribiri (RIGO, 2004).

As espécies vegetais presentes no manguezal, comumente denominadas de mangue, são halófitas. *Rhizophora* (mangue vermelho) é dos gêneros menos tolerantes à presença de sal, desenvolvendo-se melhor em regiões onde a água intersticial apresenta concentrações menores que 50‰; *Avicennia* (mangue preto, siribeira, siriúba) é dos gêneros mais tolerantes, sobrevivendo em locais aonde a água intersticial chega de 65 a 90‰ de sal na água; o gênero *Laguncularia* (mangue

tinteira) apresenta tolerância intermediária quando comparado aos anteriores (FERNANDES & PERIA, 1995).

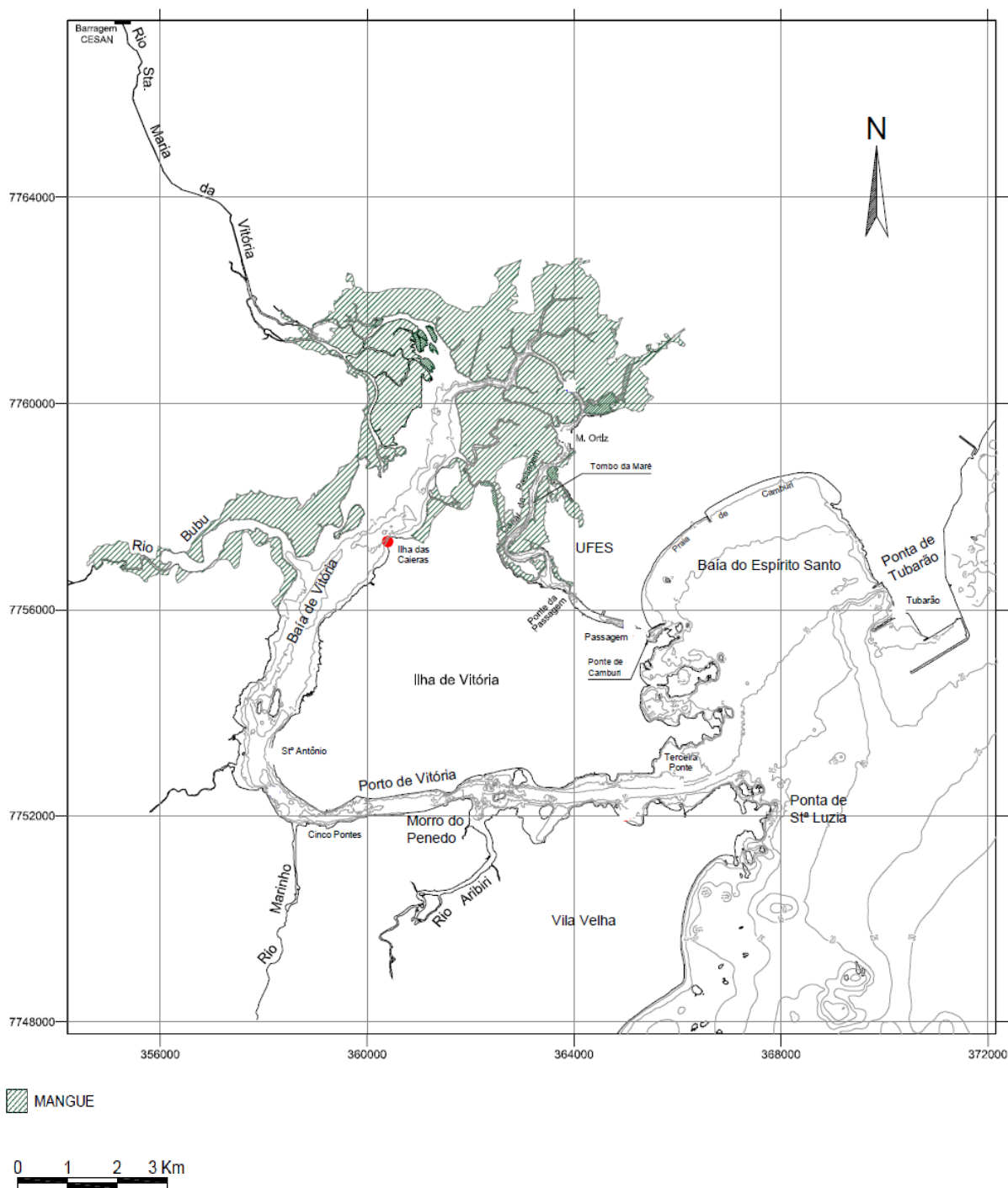


Figura 1: Região de estudo no entorno da Ilha de Vitória (ES) (Fonte: RIGO, 2004).

Em relação às espécies animais, é difícil identificar uma fauna exclusiva do manguezal, pois os animais presentes também ocorrem em outros ambientes costeiros como baías, estuários e lagunas. KJERFVE & LACERDA (1993) indicam levantamentos da fauna dos manguezais brasileiros que encontraram 86 espécies de pássaros, 51 de crustáceos, 33 de moluscos e 185 de peixes, além de mais de 10 espécies de mamíferos. Estes levantamentos incluem espécies residentes, transientes e migratórias.

Entre essa fauna, encontram-se espécies de valor econômico, destacando-se os moluscos bivalves, como as ostras (*Crassostrea brasiliiana*), crustáceos, como os caranguejos e siris (*Callinectes danae*), além de um elevado número de peixes quando considerados os resultados das capturas em regiões estuarinas e costeiras (SHAEFFER-NOVELLI, 1987).

Apesar de sua grande importância socioambiental, os manguezais distribuídos ao longo do litoral brasileiro e no mundo vêm sofrendo inúmeros impactos. Toneladas de lixo, esgoto doméstico e industrial, aliadas a especulação imobiliária e a pesca predatória, fazem com que diversas comunidades tradicionais, sejam obrigadas a abandonar suas atividades buscando outras fontes de subsistência (NUNES, 1998).

Além disso, é importante ressaltar que anteriormente a principal causa de impacto ambiental na região da Baía de Vitória era representada pelos aterros, conforme CARMO (1987), FERREIRA (1989) e CARMO *et al.* (1994). Entretanto, ao longo dos anos os aterros próximos a regiões de manguezais têm sido coibidos pelos órgãos de controle ambiental e deixaram de ser uma ameaça importante. Os despejos de esgotos (principalmente domésticos) sem tratamento configuram-se como a grande ameaça atual a esse ecossistema.

A tabela 1 resume alguns estudos que mostram a contaminação do manguezal da Baía de Vitória, tanto por esgotos domésticos, quanto por outros efluentes. Estes estudos demonstram a contaminação de algumas espécies de bivalves, como os mexilhões, popularmente denominados “sururus”. Estes bivalves podem acumular e concentrar contaminantes presentes na água (LEES, 2000; MUNIAN-MUJIKI *et al.*,

2000), afetando a saúde das pessoas devido ao seu amplo consumo e comercialização na região.

Tabela 1: Avaliação de contaminação ambiental na Baía de Vitória realizada por diferentes autores.

Área de estudo	Amostra/ Poluente	Autor/ano
Baía de Vitória	Estuário/ Esgoto sanitário, agrotóxico e pesticida	Carmo, 1987
Canal da Passagem	Estuário/ Coliformes termotolerantes, <i>E. coli</i> e enterococos	Ribeiro, 2002
Manguezal dos rios Aribiri, Santa Maria da Vitória e Bubu	Ostras e Sururus/ metais pesados: Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	Souza, 2002
Rio Santa Maria da Vitória	Estuário/ Lançamento de esgoto não tratado	Correia Junior, 2003
Baía de Vitória	Ostras/ metais pesados: Zn; água: Zn, As, Pb e coliformes	Jesus, 2006

3.3 Distribuição e importância de Moluscos Bivalves

3.3.1 Como alimento

A classe Bivalvia, pertence ao Filo Mollusca, um grupo muito diversificado do reino animal, só não ultrapassando em número as espécies dos insetos e nematódeos. Apresentam grande diversidade de hábitos de vida e habitats. São encontrados tanto em desertos quanto em zonas polares. No entanto é em lagoas costeiras e regiões litorâneas que alcançam sua máxima diversidade. O número estimado de espécies do filo varia segundo o autor. Contudo, chega-se a estimar cerca de 110 mil espécies (BAQUEIRO-CÁRDENAS *et al.*, 2007).

Densos bancos de moluscos bivalves ocorrem em estuários costeiros com uma produtividade primária elevada e têm sido uma fonte importante de alimentos desde a pré-história (LEES, 2000).

Estes animais são parte importante de uma dieta saudável, pois contêm alta qualidade de proteína e outros nutrientes. Além disso, são de fácil digestão, sem aditivos e minimamente processados (MURCHIE *et al.*, 2005). Uma dieta bem equilibrada contendo estes componentes alimentares pode contribuir para a saúde do coração e ajuda no crescimento e desenvolvimento adequado de crianças (FDA 2011). Isto é particularmente relevante em países em desenvolvimento onde os produtos aquáticos são frequentemente a única fonte de proteína animal (FAUCONNEAU, 2002).

A extração destes alimentos marinhos seja de áreas de cultivo, ou áreas de crescimento natural, é uma atividade que forma uma cadeia produtiva geradora de trabalho, renda, emprego e impostos que é, para alguns municípios, a principal em importância econômica. Isso tem possibilitado a integração entre cultivo, turismo e gastronomia que revitalizou algumas localidades (FERREIRA & OLIVEIRA-NETO, 2007). Em âmbito mundial, essa prática tem sofrido aumento exponencial e tornado-se uma das indústrias de mais rápido crescimento entre as indústrias de alimentos, especialmente na Ásia (SAPKOTA *et al.*, 2008), onde a China lidera a produção destes moluscos, com 9,5 milhões de toneladas só em 2005. Isso representa 70% da produção total de bivalves e 80,2% da produção mundial de produtos da aquicultura (FAO, 2008).

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

Assim, ao se determinar as concentrações de contaminantes na carne de bivalves marinhos, pode-se avaliar de forma direta o risco do consumo destes alimentos, além de informar quanto à distribuição de diferentes contaminantes no ambiente.

3.3.2 Moluscos Bivalves como indicadores ambientais

Moluscos bivalves apresentam o hábito alimentar baseado na filtração. Um mexilhão chega a filtrar 5 L de água por hora. Outras espécies de bivalves, como as ostras podem filtrar um volume ainda maior, como 10 a 24 L de água por hora (LEES, 2000).

Essa característica fisiológica faz com que a espécie possa assimilar não apenas o fitoplâncton que compõe o seu principal alimento, mas também contaminantes químicos, como pesticidas, metais pesados, biotoxinas, elementos radioativos e microrganismos patogênicos, como bactérias, protozoários, helmintos e vírus, presentes na água circundante. (CROCI *et al.*, 2000; POMMEPUY *et al.*, 2006; BØRRETZEN & SALBU, 2009). Assim, a presença de microrganismos na carne dos moluscos bivalves está diretamente relacionada com a qualidade do ambiente em que estes se originam e pode ser utilizada como bioindicadora da qualidade da água em que vivem (SAPKOTA *et al.*, 2008).

Algumas características fazem dos moluscos bivalves marinhos animais especialmente interessantes para avaliar as concentrações ambientais dos contaminantes: ocorrem em estuários e zonas costeiras; são sésseis, o que não lhes permite escapar da poluição se deslocando para outras áreas; possuem tempo de vida relativamente longo, o que permite estudos de longo prazo; ampla distribuição geográfica, facilitando a intercomparação dos dados obtidos de regiões diferentes; aparecem freqüentemente em alta densidade e são de fácil coleta; acumulam concentrações de contaminantes em seus tecidos acima do encontrado na fonte de contaminação, etc. (CUNNINGHAM, 1979 apud GALVÃO *et al.*, 2009).

Seu uso como bioindicadores é baseado em um princípio simples: submetidos a condições adversas, os organismos se adaptam ou morrem. Portanto, os organismos que vivem em um dado ecossistema estão adaptados às suas condições ambientais e por isso devem refletir o nível de preservação de condições naturais ou as alterações provocadas pelo despejo de contaminantes ambientais (CALLISTO *et al.*, 2005).

Todavia, enquanto vivos e tolerantes frente às diversas alterações ambientais, constituem-se potenciais vetores de doenças, uma vez que podem acumular substâncias ou microrganismos potencialmente patogênicos que estiverem associados ao material particulado suspenso na coluna d'água e transferi-los aos consumidores humanos. Para agravar, essa concentração de contaminantes pode chegar a níveis tão elevados quanto 1.000 a 10.000 vezes superior às verificadas na fonte de exposição (UNEP, 2004), podendo gerar impactos significativos à saúde pública.

3.3.2 Moluscos Bivalves como um veículo de doenças transmitidas por alimentos (DTA)

DTA é um termo genérico, aplicado a uma síndrome, geralmente, constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia. As DTA são atribuídas à ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, prions, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados (SVS, 2005).

Além dos sintomas digestivos, podem ocorrer afecções extra-intestinais em diferentes órgãos e sistemas, como: meninges; rins; fígado; sistema nervoso central; terminações nervosas periféricas; e outros, de acordo com o agente etiológico envolvido. O quadro clínico das DTA depende, portanto, do agente etiológico envolvido e varia desde leve desconforto intestinal até quadros extremamente sérios, com desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda (síndrome hemolítica urêmica) e insuficiência respiratória (botulismo) (SVS, 2005).

Reconhecidamente, pescados e frutos do mar, incluindo moluscos bivalves são também causadores de DTAs. Em todo mundo, estima-se que representem 10% das DTAs e 19% de todos os surtos de origem alimentar notificados (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As Tabelas 2 e 3 resumem alguns dos agentes biológicos encontrados em moluscos que podem causar DTAs.

Tabela 2: Microrganismos causadores de doenças veiculadas pelo consumo de moluscos bivalves (Fonte: FAO, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Microrganismo	Etiologia	Período de Incubação	Duração da patologia	Doenças, sinais e sintomas
Bactérias	<i>Salmonella typhi</i>	3 semanas	Até 4 semanas	Mal-estar, cefaléia, febre, tosse, náuseas, vômitos, constipação, dor abdominal, manchas vermelhas, sangue nas fezes
	<i>Campylobacter sp.</i>	2 a 7 dias	3–6 dias	Diarréia, dor abdominal intensa, febre, mal-estar, cefaléia, vômitos
	<i>Shigella sp.</i>	24 a 72 horas	5–7 dias	Dor abdominal, diarréia, sangue e fezes mucosas, febre
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2 a 48 horas	2–14 dias	Dor abdominal, diarreia, náuseas, vômitos, febre, calafrios, dor de cabeça
	<i>Vibrio vulnificus</i>	<24 horas	2–3 dias	Mal-estar, calafrios, febre, lesões cutâneas
	<i>Vibrio cholerae</i>	1–5 dias	2–5 dias	Diarréia aquosa, vômitos, desidratação
	<i>E. coli enteropatogênica</i>	1-3 dias	3-7 dias	Diarréia aquosa, dor abdominal, febre, vômitos
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 a 6 h	24 a 48 h	Náusea, vômito, dor abdominal, febre
	<i>Listeria monocytogenes</i>	9 a 48 h 2 a 6 semanas	Variável	Listeriose, septicemia, infecções SNC (meningites), gastroenterites, endocardites, artrites, encefalites, osteomielites, infecções pulmonares. Febre, dor muscular, náusea, diarréia, forte dor de cabeça e convulsões.
Vírus	Norovirus	1–3 dias	20 a 72 h	Diarréia, náuseas, vômitos, dor abdominal
	Hepatite A	10 a 50 dias	10 a 30 dias	Febre, mal estar, náuseas, dor abdominal, icterícia
	Astrovirus	1 a 2 dias	48 a 72 horas	Diarréia, acompanhada por sinais ou sintomas entéricos
	Enteroviruses	10 a 70 h	2 a 9 dias	Náusea, vômito, dor abdominal, mal-estar, dor de cabeça e febre.
Protozoários parasitas	<i>Cryptosporidium spp.</i>	2 a 28 dias	Dias a semanas	Cólicas, dor abdominal, diarréia aquosa, febre, vômito.
	<i>Giardia lamblia</i>	1 a 4 semanas	Semanas	Diarréia crônica ou aguda, flautulência, inchaço.
	<i>Toxoplasma gondii</i>	6 a 10 dias	Meses	Assintomático

Tabela 3: Agentes biológicos envolvidos em doenças ocasionadas pelo consumo de moluscos bivalves contaminados (Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Intoxicação	Etiologia	Período de Incubação	Duração da patologia	Doenças, sinais e sintomas
	Várias espécies do gênero dinoflagelados <i>Alexandrium spp. and the freshwater cyanophyte</i> <i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	30 min a 3 h	Horas a 3 dias	Paralisia por intoxicação de marisco (PSP). Diarréia, tonturas, náusea levando a paralisia da boca, lábios, fraqueza, disfasia, disfonia, paralisia respiratória.
	Dinoflagelados <i>Dinophysis spp.</i> e <i>Prorocentrum spp.</i>	30 min a 2 h		Diarréia por intoxicação de mariscos (DSP). Náusea, vômitos, diarréia, dor abdominal, calafrios, dor de cabeça e febre.
Biotoxinas	Dinoflagelados <i>Gymnodinium breve</i> (também chamado <i>Ptychodiscus breve</i> , desde 2000 chamado <i>Karenia brevis</i>)	30 min a 3 h		Neurointoxicação por mariscos (NSP). Formigamento e entorpecimento dos lábios, língua, esôfago, tontura, diarréia, vômito, náusea, calafrios, inversão de temperatura, hipotensão, arritmias, cólicas, broncoconstrição, paralisia e coma.
	Principalmente a Diatomácia <i>Pseudo-nitzschia pungens f.</i> e <i>Pseudo-nitzschia species</i>	24 a 48 h		Aminésia por intoxicação de mariscos (ASP). Vômito, diarréia, dor abdominal, problemas neurológicos como confusão, perda de memória, desorientação, coma.
	Dinoflagelado <i>Proto-peridinium crassipes</i>	30 min a 24 h		Intoxicação por azaspirácidos (AZP). Náusea, vômito, diarréia severa, e cólica estomacal.

O risco de intoxicações humanas está ligado à ingestão de bivalves contaminados com produtos químicos e de biotoxinas, provenientes de efluentes industriais e resíduos agrícolas, além de áreas com super crescimento de microalgas. Por outro lado, o risco de infecções humanas está relacionado com a ingestão de bivalves contaminados por parasitas protozoários, vírus e bactérias, que podem ter sua origem em descargas de esgotos domésticos e vazamentos de tanques sépticos, entre outras (HERNROTH *et al.*, 2002).

É importante ressaltar, contudo, que quando as DTAs ou surtos alimentares estão associados a moluscos bivalves, os vírus são os agentes causadores mais freqüentes (LEES 2000, OLIVEIRA *et al.*, 2011). Por outro lado, as internações e mortes são geralmente relacionadas com bactérias (BUTT *et al.*, 2004).

O resultado do consumo é a reciclagem destes agentes biológicos para a comunidade humana (HERNROTH *et al.*, 2002), sendo o sintoma clínico mais frequentemente observado a gastroenterite. A gastroenterite é uma importante causa de morbidade e mortalidade infantil no mundo. Mais de 2 milhões de crianças e jovens morrem de doenças relacionadas com a gastroenterite ou complicações cada ano, com 85% destas mortes ocorrendo em crianças de países de baixa renda. Apesar de pelo menos 25 bactérias e protozoários diferentes constituírem potenciais causas de diarreia infantil, mais de 75% dos casos são causados por vírus. Rotavírus, calicivírus humanos (HuCV), adenovírus e astrovírus são reconhecidos como etiologias comuns de gastroenterites agudas (YU JIN *et al.*, 2009).

O primeiro surto de gastroenterite viral relacionada ao consumo de moluscos bivalves, foi reportado no inverno de 1976/1977 no Reino Unido, com 800 pessoas afetadas (APPLETON & PEREIRA, 1977 apud UMESHA *et al.*, 2008). Desde então, vários incidentes de gastroenterite viral associadas a bivalves tem sido reportadas (LEES, 2000).

Boxman *et al.* (2010), por exemplo, reuniram os dados de moluscos bivalves contaminados em toda a Europa. Entre os vírus pesquisados, foram detectados diferentes grupos de vírus, como dos RNA fita simples, incluindo enterovírus (EV), vírus da hepatite A (HAV), astrovírus (AV), Aichivírus (Aichi) e norovírus (NoV); os RNA dupla-fita, rotavirus (RV); e os DNA dupla-fita, adenovirus (AdV). A maioria dos

dados mostrou a prevalência de HAV, NoV e EV em mexilhões e ostras. Essa análise concluiu que a ocorrência dos vírus entéricos em bivalves pode ser detectada tanto em moluscos provenientes de áreas poluídas, quanto em moluscos depurados, destinado ao consumo humano, pois não apresentaram relação com *E. coli* que é usada para classificação de áreas próprias ou impróprios de cultivo de bivalves.

Outros autores verificaram a presença de vírus associados a gastroenterites em países da Ásia (China, Índia e Japão) e da América do Sul (Brasil e Chile) (UEKI *et al.*, 2005; SINCERO *et al.*, 2006; HERNROTH, 2007; KOU *et al.*, 2008; UMESHA *et al.*, 2008; SOLER *et al.*, 2009; SERRACA, 2010; YILMAZ *et al.*, 2010), tanto em ostras, quanto em mexilhões, seja em ambientes de cultivo, ou em ambientes naturais.

Pelo fato de as gastroenterites serem atribuídas a um amplo grupo de microrganismos, sejam bacterianos, virais ou protozoários (OLIVEIRA *et al.*, 2011), a segurança alimentar de moluscos bivalves é estabelecida com um exame microbiológico de seu tecido. Visto que essa é também uma doença de veiculação hídrica, o exame microbiológico de corpos d'água deve ser estabelecido através da identificação de microrganismos indicadores de contaminação (ORTEGA *et al.*, 2009).

3.4 Microrganismos Indicadores de contaminação fecal: Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

A enumeração de bactérias indicadoras de contaminação fecal é utilizada para avaliar a qualidade sanitária dos alimentos, sedimentos e águas destinadas ao consumo humano, agricultura, aquicultura, indústria e recreação (PITTA, 2002; LANDGRAF, 2005).

Tradicionalmente, bactérias coliformes, como coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e *Enterococcus* têm sido usados como indicadores da qualidade microbiológica dos moluscos e das águas de cultivo (MENA & GERBA, 2009). Esses microrganismos fazem parte da flora intestinal do trato digestivo do homem e dos

animais de sangue quente e são excretados em suas fezes, e por este fato, a presença desses no ambiente indica contaminação de origem fecal e risco de aparecimento de microrganismos patogênicos (PITTA, 2002).

O grupo dos coliformes indica a ocorrência de uma microflora variada que pode ser encontrada em animais de sangue quente, solos, vegetais ou quaisquer efluentes contendo matéria orgânica. O grupo dos coliformes totais inclui todas as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35-37°C. O subgrupo dos coliformes termotolerantes se caracteriza por ser capaz de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C, com produção de gás e anteriormente era chamado de coliformes fecais. *E. coli* é a única deste grupo que apresenta como hábitat exclusivo o trato intestinal de animais homeotérmicos (PITTA, 2002).

Trata-se de uma bactéria amplamente aceita como um indicador de contaminação fecal, pois não é patogênica, é facilmente detectável e cultivável, além de ser encontrada em concentrações mais altas que microrganismos patogênicos em águas superficiais (JAY, 2005).

No entanto, tem sido claramente demonstrado que um controle sanitário baseado em parâmetros bacterianos nem sempre indicam a presença de vírus em moluscos (BOXMAN, 2008; SERRACA *et al.*, 2010). Por isso, a detecção de vírus em moluscos bivalves, a fim de avaliar sua qualidade microbiológica, é recomendada, pois as bactérias indicadoras, normalmente utilizadas para esta finalidade, nem sempre podem ser relacionadas com a presença dos vírus, que também são mais persistentes e estáveis do que bactérias (PINA *et al.*, 1998; LEES, 2000).

O estudo realizado por Justino (2009) na localidade da Ilha das Caieiras, situada na Baía de Vitória verificou altos índices de contaminação por coliformes termotolerantes e *E. coli* em diferentes pontos do estuário e na espécie do mexilhão (*Mytella guyanensis*). Entretanto, alguns pontos de coleta do estuário apresentaram a concentração de *E. coli* dentro dos padrões legais de balneabilidade (CONAMA 274/2000), mas ainda assim a presença de três diferentes vírus entéricos:

adenovírus, rotavírus e norovírus. A tabela 4 faz uma breve descrição destes patógenos.

Tabela 4: Resumo dos vírus entéricos avaliados no estudo de Justino (2009) e no atual trabalho.

Parâmetros	Espécie viral		
	AdV	RV	NoV
Tamanho da partícula	80-110 nm	90 nm	30-38 nm
Genoma	DNA dupla fita	RNA dupla fita	RNA fita simples
Envelope	Não envelopados	Não envelopados	Não envelopados

3.5 Vírus Entéricos

3.5.1 Características Gerais

O termo “vírus entérico” compreende todos os grupos de vírus que estão presentes no trato gastrointestinal humano e que, após transmissão por via fecal-oral, podem causar infecções ou enfermidades em indivíduos susceptíveis (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001).

Anteriormente, os vírus entéricos eram divididos em dois grupos de acordo com o crescimento em culturas celulares. O primeiro grupo incluía os enterovírus, como poliovírus, coxsackievírus e echovírus, que têm bom crescimento e caracterização em culturas de células de primatas e que, normalmente, não causam doenças gastrointestinais. O segundo grupo incluía rotavírus, astrovírus, adenovírus 40/41, calicivírus (norovírus e saporovírus) e vírus das hepatites A e E, os quais são agentes causais de gastroenterites ou hepatites e dificilmente crescem em culturas celulares (WYN-JONES & SELLWOOD, 2001). Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, a partir da década de 80 (SAIKI *et al.*, 1988), uma variedade crescente de vírus entéricos, incluindo os não cultiváveis, tem sido identificada no ambiente. Isso levou a uma nova divisão classificatória: (1) não enteropatogênicos ou que causam doenças não relacionadas ao epitélio intestinal: poliovírus, coxsackievírus a e b, echovírus, e vírus das hepatites A e E; (2) responsáveis pelas gastroenterites

agudas em humanos: rotavirus, adenovirus entéricos, astrovirus e calicivirus e (3) enteropatógenos sem relação causal comprovada: coronavírus, enterovirus, torovirus, parvovirus e reovirus (KOOPMANS *et al.*, 2004)

Os vírus entéricos são comumente introduzidos no ambiente através de atividades humanas, tais como lançamento de esgoto em diferentes corpos d'água. Esses vírus podem ser transportados no ambiente através de águas subterrâneas, estuarinas, recreacionais, lacustres, água potável insuficientemente tratada, poços privados que recebem direta ou indiretamente águas residuais tratadas ou não, aerossóis emitidos por estações de tratamento de esgoto, alimentos, como moluscos bivalves, crustáceos, frutas e vegetais, além de solos e fômites (figura 2) (FONG & LIPP; 2005; METCALF, *et al.*;1995).

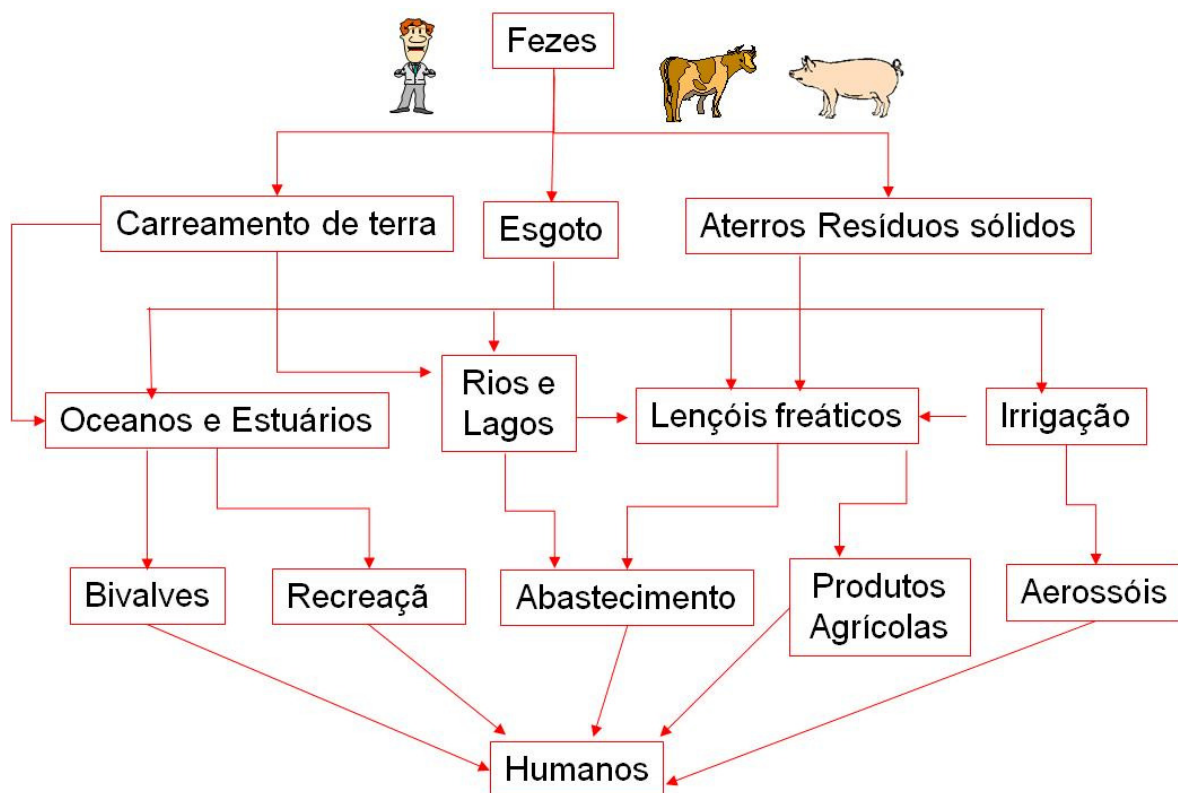


Figura 2: Rotas de transmissão de vírus entéricos. A contaminação de corpos hídricos por pessoas infectadas com os vírus ocasionam a contaminação de mariscos, vegetais, frutos e água potável causando enfermidades a indivíduos susceptíveis (Fonte: METCALF, *et al.*;1995).

Apresentam como característica comum a ausência de envelope viral, o que lhes confere grande vantagem para a infectividade e persistência no ambiente, possibilitando que sejam transmitidos por diferentes rotas, incluindo a rota zoonótica, o contato pessoa para pessoa, ou transmissão por algum objeto (KOOPMANS *et al.*, 2002; BOSCH *et al.*, 2008).

São excretados em altas concentrações ($10^5 - 10^{13}$ /g fezes) por indivíduos infectados (FONG & LIPP, 2005; BOSCH *et al.*, 2008) e uma vez presentes no ambiente, são altamente resistentes, podendo persistir por meses ou anos, mesmo em condições adversas. Eles podem ser identificados durante todas as estações do ano e as atuais práticas de tratamento de água e esgoto são incapazes de prover efluentes tratados livres de vírus, introduzindo-os rotineiramente em águas marinhas e de estuários. Além disso, não apresentam nenhuma correlação em termos qualitativos e quantitativos com os atuais indicadores bacterianos de contaminação de águas. (BOSCH, 1998).

Vírus potencialmente patogênicos em esgotos urbanos incluem adenovírus e poliomavírus, os mais abundantes e comumente encontrados, e enterovírus, norovírus, rotavírus e astrovírus (GIRONES; 2006). Entre os vírus entéricos mais importantes, transmitidos pela água, moluscos bivalves e outros alimentos ao homem, estão os norovírus, rotavírus, adenovírus, astrovírus enterovírus e os vírus da hepatite A e E (LEES, 2000). A seguir, será realizada uma descrição mais detalhada dos três vírus estudados nesta pesquisa.

3.5.1.1 Rotavírus

3.5.1.1.1 Estrutura e Classificação

Os Rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. Apresentam partícula viral esférica, com aproximadamente 75 nm de diâmetro, sem envelope lipídico, com capsídeo de simetria icosaédrica e genoma dividido em 11 segmentos de RNA dupla fita. Cada um destes segmentos codifica uma proteína, com exceção do segmento 11, que codifica duas. Entre as 12 proteínas formadas, 6 possuem

função estrutural (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e 6 não possuem funções estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) (ESTES & KAPIKIAN; 2007).

As partículas de RV são formadas por um capsídeo externo, capsídeo intermediário e capsídeo interno. O capsídeo interno é constituído pelas proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, associadas ao RNA dupla fita do RV. O capsídeo intermediário é formado pela VP6 e o capsídeo externo pelas VP7 e VP4 (figura 3) (JAYARAM *et al.*, 2004).

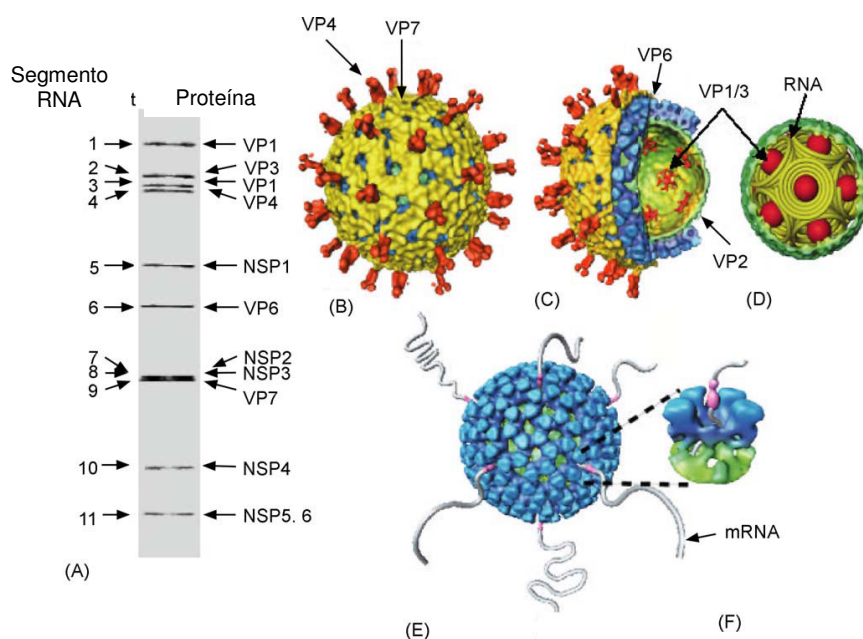


Figura 3: Estrutura genômica e tridimensional do virion RV. (A) O gel PAGE mostra os 11 segmentos de RNA dupla fita do genoma de rotavírus. (B), (C), (D), (E), (F) Constituição protéica dos capsídeos externo, intermediário e interno (Fonte: JAYARAM *et al.*, 2004).

A VP6 é a proteína viral mais abundante dos RV (constituem mais de 50 % da partícula viral) e suas características antigênicas permitem a classificação dos RV em 7 diferentes grupos (A-G) e subgrupos de RV-A (I,II, I+II, não I e não II) de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Virus (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2011). Os grupos A, B e C são encontrados em humanos e animais, enquanto os grupos D, E, F e G apenas em animais (LUNDGREN & SVENSSON, 2001). Os RV-A possuem maior importância para saúde pública, pois são a causa majoritária de diarreia aguda em crianças de todo mundo (ARNOLD & PATTON, 2009). A classificação dos RV-A em genótipos/sorotipos consiste em um sistema binário

baseado na especificidade das proteínas VP7 e VP4. Para VP7 foram estabelecidos sorotipos/genótipos G (glicoproteína) e para VP4 sorotipos/genótipos P (sensível à protease). Até o momento foram descritos 27 genótipos G e 35 genótipos P (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2011), contudo em decorrência da grande variação genética e dos muitos estudos com rotavírus, novos genótipos são encontrados a cada ano e novas formas de classificação propostas.

3.5.1.1.2 Replicação

A replicação do RV ocorre no citoplasma dos enterócitos maduros, que revestem as microvilosidades do intestino delgado (LUNDGREN & SVENSSON, 2001). A penetração do RV pode ocorrer por dois mecanismos: (1) diretamente através da membrana plasmática após a clivagem de VP4 em VP5 e VP8 e (2) através do processo de endocitose, sem a clivagem de VP4 (CONNER & RAMIG, 1997). Após a entrada e liberação do RNA dupla fita no citoplasma, iniciam-se as etapas de transcrição, tradução, replicação e maturação viral. A etapa de transcrição envolve a formação de partículas de duplo capsídeo (DLPs). Na célula infectada, as DLPs são transcricionalmente ativas e responsáveis pela síntese dos 11 mRNAs virais, que serão traduzidos em proteínas estruturais e não estruturais. O mRNA também é utilizado pela RNA polimerase dependente de RNA como molde para síntese do RNA dupla fita genômico. Após esta etapa de tradução e replicação, as DLPs migram para o retículo endoplasmático rugoso (RER) onde as partículas virais poderão adquirir o capsídeo externo composto pelas proteínas VP7 e VP4, indutoras da resposta imunológica no hospedeiro infectado (ARNOLD & PATTON, 2009).

3.5.1.1.3 Patogênese

Ao infectar os enterócitos maduros nas vilosidades do intestino delgado, RV causam inflamação de leve a aguda, podendo levar a apoptose e subsequente perda da integridade do epitélio, má absorção no intestino delgado, vazamento de fluidos e eletrólitos para o lúmen. Estes efeitos contribuem para a diarreia aquosa severa e vômitos, que são característicos da doença de RV, que em suas manifestações mais extremas pode levar à morte devido à desidratação (LUNDGREN & SVENSSON, 2001; ARNOLD & PATTON, 2009).

A faixa etária mais afetada está entre crianças menores de 5 anos (LUNDGREN & SVENSSON, 2001), mas surtos em adultos também são relatados (GONZÁLEZ-LOSA, 2001). Outro aspecto da rotavirose é seu agravamento em indivíduos desnutridos, constituindo, portanto, maior taxa de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento (LEES, 2000).

Sua transmissão é feita através de alimentos e água contaminados e também pelo contato direto com pessoas infectadas. A dose infecciosa é tão baixa quanto 10-100 partículas e o período de incubação da doença dura cerca de 4 a 7 dias, mas as pessoas infectadas podem continuar a excretar o vírus nas fezes por até 20 dias. Durante este período, estes indivíduos podem excretar concentrações de até 10^9 partículas por grama de fezes (CARTER, 2005).

Desde sua descoberta, em 1973, os rotavírus têm sido responsabilizados por 20 a 70% das hospitalizações e 20% dos óbitos por diarreia (ALONSO, M., 2001). No Brasil, somente em 2004, ocorreram 121.521 hospitalizações e 2.321 óbitos por diarreia entre crianças menores de cinco anos. Nesta faixa etária, admite-se que, respectivamente, 34% e 40% dessas situações podem estar associadas aos rotavírus. Logo, estima-se que, naquele ano, 41.317 hospitalizações e 928 óbitos em menores de cinco anos foram causados por esses agentes (MS, 2006).

Em 2006, o Ministério da Saúde Brasileiro implementou ao Programa Nacional de Imunização a vacina Rotarix em todos os seus 27 estados e no Distrito Federal. Esta iniciativa visa acelerar o quarto Objetivo do Desenvolvimento do Milênio, a redução da mortalidade infantil. (DO CARMO *et al.*, 2011)

Em Julho de 2009, a Organização Mundial da Saúde (WHO) recomendou a introdução de vacinas de rotavírus no programa nacional de imunização em todos os países ao redor do mundo. A introdução da vacina em alguns países da América Latina, América do Norte, Europa e Austrália reduziu significativamente o número de casos de diarreia e de morte nestes países.

3.5.1.2 Adenovírus Humanos

3.5.1.2.1 Estrutura e Classificação

Os adenovírus humanos pertencem à família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*. Apresentam diâmetro de aproximadamente 70 a 90 nm, sem envelope, de simetria icosaédrica, contendo DNA dupla fita. Compreendem 52 sorotipos que estão classificados em 7 grupos, representados pelas letras de A a G (WOLD & HORWITZ, 2007) de acordo com a homologia de sequência e oncogenicidade quando injetado em ratos. Cada grupo apresenta um sítio preferencial de infecção, levando a doença nesses sítios principalmente quando em indivíduos imunocomprometidos (CARTER, 2005).

São constituídos por 11 proteínas, denominadas polipeptídeos II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X e TP. Destas 11 proteínas, 7 estão presentes no capsídeo viral (II, III, IV, IIIa, VIII e IX) e 4 associadas a molécula de DNA, dupla fita, no core viral (V, VII, X, TP). (Figura 4). O capsídeo é constituído de 252 capsômeros, sendo 240 do tipo *hexon* (polipeptídeo II) que formam as 20 faces triangulares do icosaedro e 12 do tipo *penton* (polipeptídeo III) que formam os vértices do icosaedro (STEWART *et al.*, 1993). Da base de cada penton projeta-se uma estrutura protéica denominada fibra (polipeptídeo IV), a qual possui comprimento variável conforme o sorotipo. Na extremidade de cada fibra, existe uma protuberância que possui propriedade imunogênica tendo ainda como função a adsorção do vírus à célula hospedeira (FIELDS, 2007).

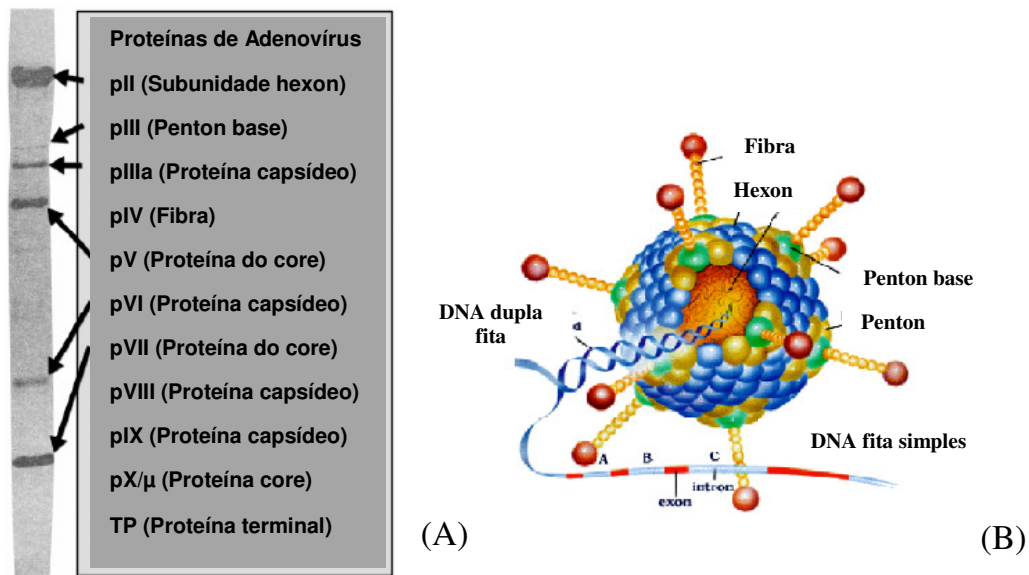


Figura 4: Proteínas e estrutura de AdV. (A) O gel PAGE mostra as 11 proteínas de AdV. (B) Estrutura tridimensional do virion AdV. (Fonte: WADELL *et al.* 1980 apud SIQUEIRA-SILVA 2008).

O genoma possui diferentes unidades (regiões) de transcrição. Essas são referidas como regiões iniciais (E1, E2, E3 e E4), regiões iniciais tardias ou intermediárias (IX e IVa2) e região tardia (MLP-promotor maior tardio). As regiões E1 e E2 são subdivididas em E1A, E1B e E2A e E2B, e a região tardia é processada para gerar cinco famílias de mRNAs tardios (L1 a L5), todos transcritos pela RNA polimerase II. Os mRNAs tardios (L1 a L5), gerados pelo processamento do MLP, são responsáveis pela produção e montagem dos componentes do capsídeo. L1 produz duas proteínas (52/55k e IIIa); L2 quatro proteínas (pIII, VII, V e X); L3 três proteínas (VI, hexon e protease); L4 quatro proteínas (100K, 22K, 33K e pVIII); e L5 produz a proteína formadora da fibra (IV) (SHENK, 2001).

3.5.1.2.2. Replicação

Os estudos sobre a replicação de adenovírus humanos se concentram em modelos de crescimento em células de cultura dos sorotipos Ad2 e Ad5. Esses sorotipos têm sido favorecidos porque são facilmente cultivados em laboratório. Quando outros sorotipos humanos têm sido estudados, suas estratégias de crescimento normalmente têm-se revelado semelhante ao padrão estabelecido para estes protótipos (FIELDS, 2007).

O ciclo de replicação dos adenovírus é dividido em duas fases: a primeira inicia com a interação da partícula viral, por meio da proteína fibra, com a célula hospedeira, seguida das etapas de adsorção, penetração, movimentação de partículas do vírus parcialmente revestido para o complexo do poro nuclear (NPC), transporte de DNA viral através do NPC para o núcleo, e expressão do conjunto inicial de genes. E1A é quem inicia essa fase precoce da infecção. A segunda fase inicia quando esse conjunto inicial de genes passa a mediar a expressão de outros genes, da região intermediária (IX e IVa2), que levarão a replicação do DNA viral, progressão do ciclo celular, apoptose, e antagonismo a uma variedade de medidas antivirais do hospedeiro. Os últimos genes virais (MPLs) são expressos e ocorre a montagem de vírions. No final do ciclo, cerca de 10^4 partículas virais foram produzidos por célula, juntamente com a síntese de um excesso substancial de proteínas e DNA que não são montados em vírions (FIELDS, 2007).

3.5.1.2.3 Patogênese

Os adenovírus são capazes de infectar uma variedade de tecidos, sendo identificados como agentes etiológicos de diversas patologias, como por exemplo: síndromes respiratórias, ceratoconjuntivites, infecções entéricas e renais. Entretanto, todas as cepas de crescimento no trato respiratório também foram encontradas nas fezes do indivíduo infectado. Apenas os tipos 40 e 41 da Espécie F de adenovírus humanos são capazes de induzir gastroenterites (CARTER, 2005).

Adenovírus humanos são o segundo patógeno viral mais importante causador de gastroenterites em crianças depois de rotavírus, correspondendo no Brasil a 15% dos casos de morte por gastroenterite (MEHNERT *et al.*, 1999). A transmissão inclui a rota fecal-oral e contato direto por meio da inalação de aerossóis. As partículas virais podem ser expelidas por longos períodos pelas fezes, urina e secreções respiratórias de pessoas infectadas (FONG & LIPP; 2005). Pessoas infectadas chegam a excretar 10^{11} partículas virais por grama de fezes. Para adenovírus humanos ainda não há consenso sobre a dose infecciosa.

Ocorre mais freqüentemente em crianças com menos de 4 anos, caracterizando-se como uma doença branda com diarreia e vômito. Em regiões de clima temperado, a

prevalência de adenovírus entéricos é maior. No entanto, em países de clima tropical, como o Brasil, adenovírus veiculados pela água têm sido detectados durante todos os meses do ano, pois apresentam maior estabilidade na água do que outros vírus entéricos (HORWITZ, 1996; MEHNERT *et al.*, 1999).

3.5.1.3 Norovírus

3.5.1.3.1 Estrutura e Classificação

Em 1972, foi descoberta uma partícula viral de 27 nm em amostras fecais humanas em um surto de gastroenterite na cidade de Norwalk, Ohio. Este protótipo foi denominado *Norwalk like vírus*, atualmente conhecido como norovírus (ATMAR, 2010).

Os Norovírus (NoV) pertencem a família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*. São considerados vírus pequenos de aproximadamente 27-40 nm de diâmetro, não envelopados, esféricos de simetria icosaédrica. Seu genoma apresenta em torno de 7.5–7.7 kb de RNA linear, fita simples, de polaridade positiva (ATMAR, 2010). Os genomas com essas características servem como mRNA.

O genoma de NoV está organizado em 3 ORFs (ORF 1-3). A ORF 1 codifica um longa poliproteína que após a tradução é clivada em 6 proteínas não estruturais (NS1-NS7), incluindo uma NTPase (NS3), uma protease (NS6), e uma RNA polimerase dependente de RNA (NS7). NoV também codificam uma VPg (NSP5), presumidamente ligada de forma covalente na extremidade 5' do genoma viral. A ORF 2 codifica para a proteína estrutural mais abundante do capsídeo VP1, e a ORF 3 codifica uma proteína estrutural menos abundante, VP2. Na sua extremidade 3' são poliadenilados (Figura 5) (KARST, 2010).

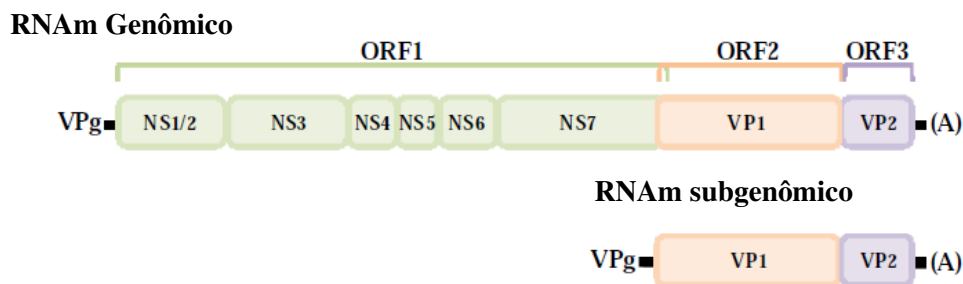


Figura 5: Organização do genoma de norovírus e produtos proteicos. O genoma de Norovírus compreendem um fita simples de RNA positiva, contendo 3 ORFs. A ORF 1 (coloração verde), a ORF 2 (coloração laranja) e a ORF3 (coloração lilás). O RNAm subgenômico é produzido durante a replicação viral (Fonte: KARST, 2010).

Estão classificados em 5 genogrupos (GI-GV), baseados na diversidade da sequência dos aminoácidos da VP1, que constitui a proteína estrutural mais abundante do capsídeo. Estes genogrupos já foram identificados em diversos hospedeiros, entre eles suínos (GII), bovinos (GIII), murinos (GV), caninos e felinos (GIV). Em humanos, apenas os genogrupos GI, GII e GIV foram identificados como capazes de causar infecção. Os genogrupos estão subdivididos em 35 grupos distintos ou genótipos (8 GI, 21 GII, 3 GIII, 2 GIV, e 1 GV) (CDC, 2011).

3.5.1.3.2. Replicação

A proteína VP1 do capsídeo de NoV é adsorvida aos antígenos presentes nas glicoproteínas ou glicolipídeos de eritrócitos e células epiteliais das mucosas do intestino (TAN & JIANG, 2005). O RNA genômico viral de polaridade positiva funciona como molde para a síntese dos RNAs genômico e subgenômico intermediários de polaridade negativa. A proteína VPg, presente na extremidade 5' do genoma é uridilada e age como iniciador para a replicação destes RNAs de polaridade negativa que estão poliadenilados. A RpRd é a enzima responsável por esta síntese (ROHAYEM *et al.*, 2006). O início da tradução do RNA viral acontece quando os fatores de iniciação da tradução celular se unem à proteína viral VPg e recrutam o ribossomo iniciando desta forma o processo da tradução das proteínas virais (CHAUDHRY *et al.*, 2006). A ORF1 é codificada e a protease viral processa as clivagens da poliproteína produzida originando as proteínas não estruturais funcionalmente ativas. O RNA subgenômico é responsável por traduzir às ORFs 2 e

3, levando a síntese das proteínas estruturais VP1 e VP2 (figura 6) (ATMAR, 2010). Finalmente, o RNA genômico é empacotado formando as partículas virais infecciosas (ASANAKA *et al.*, 2005)

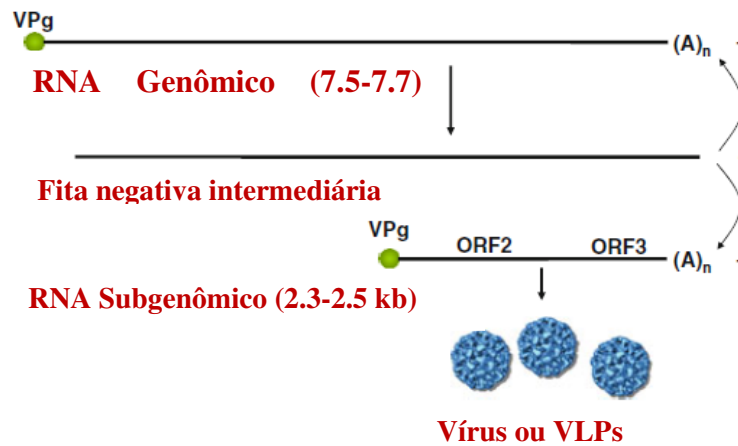


Figura 6: Estratégia de replicação dos norovírus. NoV são vírus RNA de fita positiva, com 3 ORFs. A replicação ocorre com a síntese de uma fita RNA negativa intermediária. O RNA genômico e subgenômico são codificados gerando proteínas estruturais e não estruturais funcionais (Fonte: ATMAR, 2010).

3.5.1.3.3. Patogênese

A infecção por NV ocorre no intestino delgado, provocando lesões na mucosa que resultam no surgimento da diarreia (TROEGER *et al.*, 2009). Após um período de incubação que varia entre 24 a 48 horas, outras manifestações clínicas, além da diarreia aquosa são observadas, como o início súbito de vômitos, dores abdominais, mal-estar, febre e mialgia. A infecção por NV pode acometer indivíduos de todas as faixas etárias, mas a gastroenterite causada por NV geralmente é auto-limitada e os sintomas são resolvidos em quatro a seis dias. Complicações só costumam ocorrer em crianças menores de 5 anos, idosos maiores de 65 anos e pacientes imunodeprimidos (MATTNER *et al.*, 2006; HARRIS *et al.*, 2008).

Norovírus são altamente transmissíveis e podem se espalhar através de exposição a fontes de água ou alimentos contaminados, contato pessoa-pessoa, aerossol de partículas de vômito e fômites (CDC, 2011). Pessoas infectadas podem eliminar os vírus nas fezes após o período sintomático por mais de 20 dias originando uma fonte

de contaminação para possíveis novos casos de gastroenterite (ROCKX *et al.*, 2002). A transmissão dos NV é muito eficiente devido à alta infecciosidade deste vírus; doses tão baixas quanto 18 partículas virais são descritas como suficientes para causar infecção (TEUNIS *et al.*, 2008). Teunis *et al.* (2008) ainda demonstrou que a probabilidade média de desenvolver uma infecção por uma única partícula viral é de 50%. Adicionalmente, os NV são eliminados nas fezes das pessoas infectadas em concentrações tão elevadas que podem chegar até $1,6 \times 10^{12}$ cópias de genoma/g de fezes (ATMAR *et al.*, 2008), além de serem altamente resistentes no ambiente.

Por estas características, os NV causam surtos de gastroenterite principalmente em ambientes de uso coletivo tais como hospitais, clínicas geriátricas, escolas, cruzeiros e restaurantes, afetando indivíduos de todos os grupos etários (ROCKX *et al.*, 2002; WIDDOWSON *et al.*, 2005). Estima-se que os patógenos humanos pertencentes ao gênero Norovírus são responsáveis por causar até 95% dos surtos de gastroenterite não bacterianas, e 50% de todos os surtos de gastroenterites no mundo inteiro anualmente. São a causa de mais de 1 milhão de hospitalizações e 200.000 mortes de crianças em países em desenvolvimento (KARST, 2010). No Brasil, diferentes estudos têm detectado NV em casos de gastroenterite aguda em crianças e adultos. Só na cidade de Vitória, Espírito Santo, Ribeiro *et al.* (2008) relatou a ocorrência destas infecções em até 40% dos casos estudados.

3.6. MÉTODOS USADOS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS HUMANOS

Mais de 100 espécies de vírus de origem fecal são lançadas no ambiente, contaminando água e alimentos de regiões próximas ao lançamento de esgoto (TEUNIS *et al.*, 2008). Nos últimos 60 anos, progressos nos métodos de detecção de vírus com o desenvolvimento das técnicas de imuno-afinidade, de cultura de células e baseados na detecção de ácidos nucléicos têm permitido diagnosticar a presença de vírus em diferentes matrizes. Além disso, a utilização destes métodos ampliou o conhecimento das estruturas virais e suas funções a nível molecular (METCALF *et al.*, 1995).

Todavia, a detecção de vírus entéricos, seja em amostras ambientais ou alimentares requer indispensavelmente uma etapa precedente de preparação da amostra. A escolha do procedimento varia de acordo com a matriz estudada e visa separar as partículas virais de interesse das matrizes as quais estão associadas (eluição), concentrando-os em pequenos volumes, passíveis de serem processados para identificação viral (LE GUYADER, 2000).

Em amostras de moluscos bivalves, a principal dificuldade para análise de vírus é a sua característica intrínseca de reter contaminantes em seu tecido pancreático, também chamado de divertícula digestiva (BOSCH *et al.*, 2010). Os mecanismos propostos como responsáveis por essa retenção têm sido ligação iônica, fixação mecânica e interação com anticorpos específicos ao tecido destes animais (BOSCH *et al.*, 2010). Os métodos que têm sido descritos como mais eficazes para liberar as partículas virais retidas nos tecidos e concentrá-las, são a precipitação com Polietilenoglicol (PEG), ultracentrifugação, e ultrafiltração (MATTISON & BIDAWID, 2008; BOSCH *et al.*, 2010).

Após a etapa de preparação da amostras, diferentes metodologias podem ser utilizadas para detecção viral, sendo principais as técnicas imunológicas, de cultura de células e moleculares.

Os métodos imunológicos (sorológicos) tais como radio-imunoensaio imunofluorescência, imuno-microscopia eletrônica ou ensaio imunoenzimático (ELISA) baseiam-se na interação entre um antígeno viral e um anticorpo; o anticorpo de captura liga-se ao antígeno viral e o complexo formado é detectado através de moléculas cromogênicas ou fluorogênicas. O limite de detecção varia de acordo com a variabilidade do genoma viral e a afinidade da interação antígeno-anticorpo. Os métodos imunológicos requerem aparelhos sofisticados e formação especializada, e geralmente não têm o grau de sensibilidade necessária para detectar as baixas quantidades de vírus esperados em amostras ambientais (YUN YEH *et al.*, 2008).

Os métodos de cultura de células permitem a propagação de vírus cultiváveis em gerações de células hospedeiras até alcançarem um número suficiente para sua detecção. O método de cultura de células constitui o padrão ouro para o diagnóstico

de vírus, porque é único método disponível para detecção de partículas virais infecciosas e pode alcançar uma detecção tão baixa quanto 1 unidade formadora de placa (UFP) por volume. No entanto, alguns vírus de grande significado clínico, tais como astrovírus ou norovírus são fastidiosos, ou seja, não podem ser cultivados ou apresentam crescimento deficiente em cultura de células. Para o estudo destes e outros vírus não cultiváveis, técnicas alternativas têm sido usadas, como as técnicas moleculares de detecção de ácidos nucleicos.

As técnicas moleculares requerem uma etapa preliminar de extração de ácidos nucleicos. Essa etapa pode oferecer a oportunidade adicional de se concentrar e purificar o material testado, por remover compostos inibidores presentes tanto em amostras ambientais, quanto de alimentos (MATTISON & BIDAVID, 2008). O processo de lise da partícula viral é realizada com o auxílio de algum produto químico, normalmente o tiocianato de guanidina, e a maioria dos protocolos utilizados para este fim são baseados no método de Boom *et al* que apresenta como princípio a ligação dos ácidos nucleicos às esferas de sílica (BOOM *et al.*, 1990).

Após extração de ácidos nucleicos, diferentes métodos podem ser utilizados para detectá-los, sendo os mais comuns a Reação em cadeia da polimerase (PCR), Transcrição reversa PCR (RT-PCR), e PCR em Tempo Real ou Transcrição reversa em Tempo Real (RT PCR).

A PCR consiste em um método *in vitro* de amplificação enzimática de seqüências específicas de DNA (ALBERTS *et al.*, 1997). Essa amplificação ocorre em 3 etapas: desnaturação do DNA, anelamento dos primers (iniciadores), e polimerização (figura 7). Assim, poucas cópias de DNA ligados aos primers podem ser amplificadas a um nível detectável (figura 8).

A detecção do produto amplificado é realizada por eletroforese em gel de agarose, com visualização em luz ultravioleta. Este método apresenta alta sensibilidade e especificidade, mas as múltiplas etapas necessárias para sua realização fazem com que além de excessivamente laborioso, ele seja passível de contaminação com o próprio produto de amplificação gerando resultados falsos positivos.

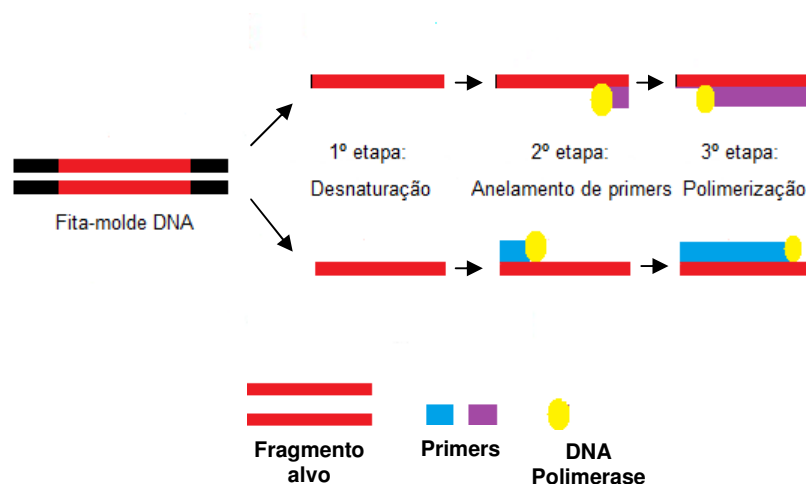


Figura 7: Etapas da amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Fonte: SCARPATI, 2012).

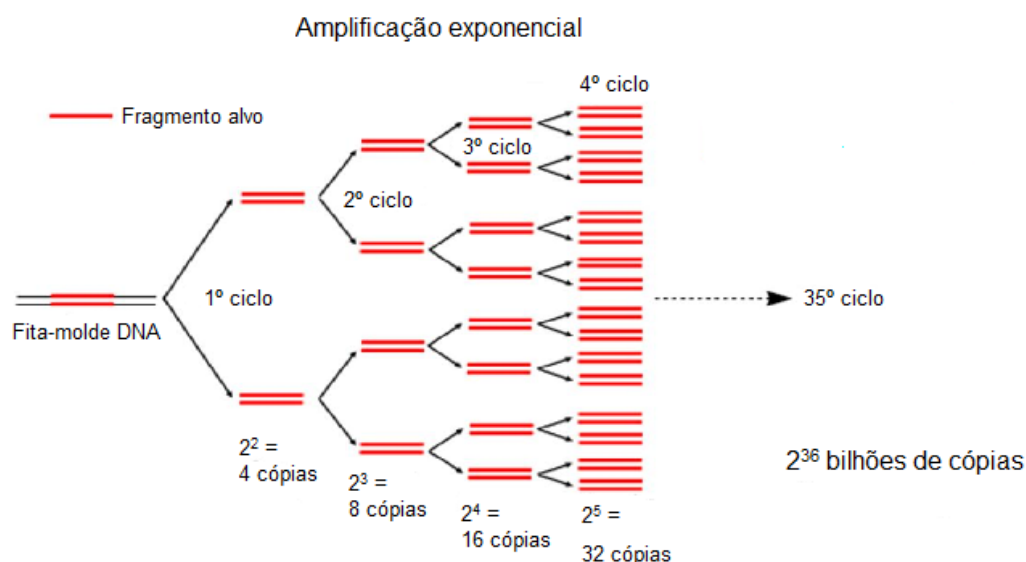


Figura 8: Amplificação exponencial da reação em cadeia da polimerase (PCR). (Fonte: VIERSTRAETE, 1999)

Por essas razões a PCR convencional e RT-PCR têm sido substituídas em sua maior parte por PCR em Tempo Real e RT-PCR em Tempo Real. Os ensaios em Tempo Real combinam a amplificação primária com a detecção do produto amplificado em uma única reação. Isso é feito utilizando marcadores fluorescentes e métodos sensíveis de mensuração da fluorescência emitida.

Os marcadores fluorescentes, também chamados fluoróforos ou sondas, utilizados na reação são moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico. Esses marcadores são desenhados com base na sequência do fragmento alvo a ser amplificado. A PCR em tempo real apresenta três diferentes tipos principais de sondas: SYBR® Green, Molecular Beacons e a utilizada neste trabalho, a TaqMan.

O sistema TaqMan contém um corante fluorescente ligado ao seu terminal 5' (*repórter*) e um inibidor de fluorescência (*quencher*) ligado ao seu terminal 3'. Durante o processo de amplificação a sonda TaqMan é degradada devido a atividade exonuclease 5'→3' da TaqDNA polimerase separando o *quencher* do *repórter* na fase de extensão (polimerização). Essa separação resulta na emissão de fluorescência pelo *repórter*, que é diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo presente na amostra e é aumentado exponencialmente (figura 9) (WANG; 2002).

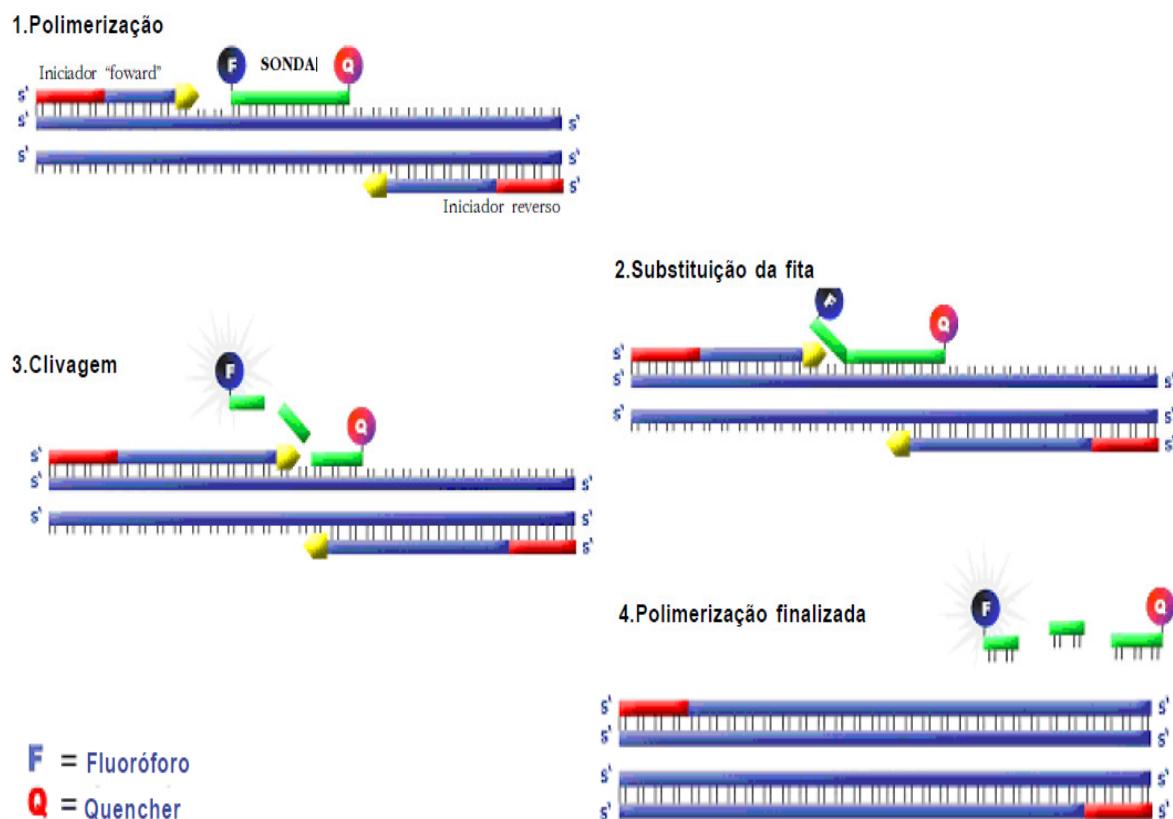


Figura 9: PCR em tempo real com sonda TaqMan (Fonte: NOVAIS & ALVES, 2004).

As principais vantagens deste sistema são a redução do tempo necessário para a realização de teste e baixo risco de contaminação com o produto amplificado. Além disso, este método permite a quantificação da carga viral por meio de comparação com uma curva padrão (NIESTERS, 2002).

Assim, a busca e escolha de métodos mais rápidos e sensíveis para verificar a qualidade microbiológica de bivalves podem contribuir para certificação da obtenção de alimentos mais seguros, que estejam em conformidade com a legislação específica.

3.7 Legislação referente à qualidade de Moluscos Bivalves

O risco de doenças infecciosas associadas ao consumo de moluscos bivalves tem sido reconhecido por muitos anos. As medidas de proteção adequadas podem ser úteis em reduzir a probabilidade de contaminação de mariscos por microrganismos patogênicos e ainda na proteção da saúde pública. Conseqüentemente, a maioria dos países tem promulgado controles sanitários para a produção destes mariscos.

3.7.1 Europa e EUA

Na Europa, todos os países seguem os padrões recomendados pela The European Union Shellfish Quality Assurance Programme (EU SQAP), que classifica os moluscos bivalves em três classes: A, B e C, de acordo com a quantidade encontrada de *Escherichia coli* por 100g o produto. Os níveis de *E. coli* estabelecidos nos Regulamentos (CE) n.º 854/2004 e 853/2004 (anexo III, seção VII) do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004 podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5: Classificação Européia de áreas de crescimento de bivalves de acordo com a presença de *Escherichia coli*.

Categoria	NMP <i>E. coli</i> por 100g de tecido de molusco bivalve	Tratamento requerido
A	≥ 230	Consumo humano direto
B	[230; 4600]	Depuração ou transferência para atender Categoria A
C	[4600; 46000]	Transferência prolongada para atender Categoria A Transferência para atender Categoria B e depuração

As Diretrizes Europeias nº 113/2006 e 41/2004 do Conselho Europeu (CE) são guias, baseados nos níveis de indicadores microbiológicos de bivalves. Essa classificação determina se os bivalves podem ser consumo direto ou se precisam ser previamente tratados antes de sua comercialização. Moluscos que não estejam em conformidade com estes critérios (acima de 46000 NMP de *E. coli*/100g de tecido, “Categoria D”) não podem ser coletados e comercializados (área de cultivo proibido).

Enquanto a União Européia estabeleceu um sistema de classificação das áreas de cultivo baseado na análise dos moluscos, a legislação dos Estados Unidos se baseia em padrões estabelecidos para as águas provenientes das áreas de cultivo dos moluscos.

Nos Estados Unidos, a FDA (*Food and Drug Administration*) possui um Programa Sanitário Nacional para moluscos (*National Shellfish Sanitation Program*), um guia para o controle do crescimento, processamento e transporte de moluscos. Os critérios utilizados para o controle de áreas de extração/cultivo/depuração de moluscos bivalves, baseado em densidade bacteriológica, são divididos em categorias: aprovado, condicionalmente aprovado, condicionalmente restrito, restrito e proibido.

A Categoria “aprovado” define as áreas limpas de crescimento de mariscos, de onde os bivalves podem ser colhidos. Bivalves em áreas de cultivo que não cumprem com os critérios de satisfação, ou sem classificação devido à falta de levantamentos

sanitários não podem ser colhidos para consumo humano e são definidos como "restrito". Restrição de colheita também pode ser empregada por curtos períodos de tempo como resultado da previsível ou esporádica poluição. Tais áreas são classificadas como "condicionalmente aprovada" ou "condicionalmente restrita".

Outros aspectos importantes também são considerados a fim de reduzir a contaminação e minimizar os riscos inerentes do consumo de moluscos. A legislação estabelece requisitos desde o momento em que os moluscos bivalves são coletados até o seu consumo (coleta de amostras, armazenamento, depuração, processamento, metodologias laboratoriais de análise e distribuição). Essas Normas de higiene alimentar são estabelecidas no Regulamento N ° 852 de 2004 da União Européia. Outros regulamentos impõem os limites microbiológicos aceitáveis para diferentes alimentos incluindo bivalves, como o Regulamento nº 2073 de 2005.

Ambas as classificações, européia e americana, determinam se os moluscos podem ser enviados para consumo direto ou devem ser tratados previamente para a comercialização (LEES, 2000). O tratamento prévio envolve diferentes métodos de depuração dos moluscos bivalves, até que se enquadrem nos padrões de qualidade sanitária estabelecidos.

Entretanto, a eficiência destas práticas de purificação é questionável, uma vez que tem por base apenas o padrão de bactérias indicadoras para garantir a segurança dos moluscos. Sabe-se que há uma falta de correlação já bem estabelecida entre a presença de indicadores bacterianos e agentes patogênicos virais, seja em amostras de moluscos bivalves ou de água (BOSH, 1998; LEES, 2000). Adicionalmente, vários trabalhos mostram que existem diferenças nas taxas de eliminação de bactérias indicadoras em relação aos vírus durante o processo de depuração (MARINO *et al.*, 2005, MURCHIE *et al.*, 2005, ROMALDE *et al.*, 2002). Isso é significativo, pois a ocorrência de bactérias patogênicas em alguns moluscos geralmente não representa um risco para a saúde pública porque os níveis necessários para causar a doença excedem em muito os presentes. Em contraste, os vírus infecciosos, mesmo em números muito baixos, podem causar doença, o que torna a depuração total de vírus essencial para garantir a segurança pública

(LEES, 2000). Assim, os indicadores mais representativos e precisos são procurados a fim de melhorar o controle microbiano de marisco (FORMIGA-CRUZ *et al.*, 2003).

3.7.2 No Brasil

No Brasil, o Comitê Nacional de Controle Higiênico Sanitário de Moluscos Bivalves - CNCMB, instituído pelo Decreto n° 5.564 de 19/10/2005 e coordenado pelo Ministério da Aqüicultura e Pesca se constitui em um colegiado técnico-consultivo interinstitucional responsável pela elaboração, coordenação e avaliação do Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves-PNCMB (SEAP, 2007). O Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves-PNCMB regulamenta o controle higiênico-sanitário de toda a cadeia produtiva de moluscos bivalves, desde a produção até a comercialização.

Em relação à carne de moluscos bivalves, o Ministério da Saúde através da Resolução RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a qual aprova o regulamento técnico e princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, estabelece para moluscos bivalves *in natura* e crustáceos limites máximos permitidos de *Estafilococos* coagulase positivo de até 10^3 UFC/g e ausência de *Salmonella spp* em 25g. O limite para Coliformes a 45°C é estabelecido para moluscos bivalves, carnes de siri e similares cozidos, temperados ou não, industrializados, resfriados ou congelados, sendo este limite de 5×10 NMP/g.

Cabe salientar que os limites de microrganismos tolerados pela RDC n° 12 (2001), para moluscos bivalves temperados ou não, industrializados, resfriados ou congelados, não se referem ao molusco consumido *in natura*. Adicionalmente, a legislação brasileira não prevê a prática de depuração para o enquadramento de moluscos bivalves nos padrões sanitários estabelecidos.

A resolução CONAMA 357/05 define os parâmetros necessários para águas de cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana. Essa resolução impõe o limite de 43 coliformes termotolerantes/100mL, levando em conta a média geométrica de amostras coletadas no mesmo local, ou o percentil de 90 % não

devendo ultrapassar 88 coliformes termotolerantes/100mL para água salinas (salinidade superior a 3,5%). Esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras. Para os demais usos da água não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos amostras coletadas durante o período de um ano, com periodicidade bimestral.

Até a presente data, os vírus não estão enquadrados em quaisquer destas legislações aplicáveis a moluscos bivalves ou águas para cultivo de moluscos. No entanto, a Portaria Federal do Ministério da Saúde nº 2914 de 12/12/2011 que substituiu a Portaria Federal do Ministério da Saúde nº 518 de 2004, ao dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, manteve a recomendação no Art. 29º da inclusão do monitoramento de vírus entéricos no(s) ponto(s) de captação de água proveniente(s) de manancial(is) superficial(is) de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico. A mesma Portaria também instruiu no Artigo 11, § 7 a realização em situações de surto de doença diarreica aguda ou outro agravo de transmissão fecal-oral, os procedimentos de análise da água para pesquisa de vírus quando as amostras clínicas forem confirmadas para esses agentes e os dados epidemiológicos apontarem a água como via de transmissão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Descrição da área de estudo

O estudo foi realizado no estuário adjacente à Ilha das Caieiras a noroeste da Baía de Vitória, bairro pertencente à região da grande São Pedro em Vitória – ES. Essa região ocupa uma área aproximada de 3.600.782 m² (PREFEITURA DE VITÓRIA, 2009) com uma população de aproximadamente 33.746 habitantes (IBGE 2010).

A Ilha das Caieiras está cercada por um manguezal urbano, com área de 891,83 hectares (PMV, 2009), o maior do estado. Vizinhas a esta região, encontram-se as desembocaduras de importantes rios da Baía de Vitória: Rio Bubu, Rio Santa Maria da Vitória e Canal dos Escravos. Toda a região recebe aporte de efluentes de forma *in natura*. Somente o Canal dos Escravos recebe esgoto tratado proveniente da estação de tratamento de esgoto (ETE) de Camburi. Segundo a Companhia Espírito Santense de Saneamento - CESAN (PMV 2008), apenas 58 % da região apresenta ligações de esgoto.

4.2 Coleta das amostras

As coletas das amostras foram realizadas em dois pontos do manguezal (tabela 6). O ponto 1 (P1), corresponde a uma área de manguezal próxima a foz do rio Santa Maria da Vitória. O segundo ponto (P2) localiza-se em uma área considerada mais protegida, uma pequena ilha distante cerca de 1 km das desembocaduras dos rios mais próximos, o Rio Santa Maria da Vitória ao norte, e o Rio Bubu ao sul.

Em cada ponto de coleta (P1 e P2) foram coletadas amostras de água do estuário e algumas espécies de moluscos bivalves. As amostras de água do estuário dos pontos próximos a área lodosa onde foram retirados os moluscos, foram coletadas em fracos de vidro estéreis (cerca de 1,5 L de cada ponto) para as análises físico-químicas, bacteriológicas e virais.

Entre as espécies de moluscos bivalves, o sururu de coroa (*Mytella charruana*) foi coletado no P1, onde formam grandes bancos às margens do estuário. O sururu de mangue (*Mytella guyanensis*) que se encontra aderido a substratos no interior do

bosque do manguezal e a ostra do mangue (*Crassostrea rhizophore*) que cresce presa às raízes e troncos das espécies vegetais típicas foram coletados no P2 (figura 10).

Tabela 6: Pontos de amostragem

Amostras	Ponto de coleta
Sururu de coroa (P1)	S 20°15'641 W 40°19'960
Sururu de mangue e ostra de mangue (P2)	S 20°16'262 W40°20'632

As coletas foram realizadas mensalmente por um período de 13 meses entre os meses de Janeiro/11 - Janeiro/12. Cada coleta foi feita em período matutino, com a maré de aproximadamente 0,8 m enchente, previamente calculada pela consulta na tábua de maré obtida no Banco Nacional de Dados Oceanográficos (BNDO). Essa altura era suficiente para permitir a visibilidade e a coleta das espécies de bivalves, que em maré mais alta eram cobertos pelas águas do estuário. A partir do mês de outubro de 2011 até janeiro de 2012, a maré adotada foi de 0,3 m enchente para permitir que um estudo em paralelo envolvendo a coleta de sedimento nos mesmos pontos fosse realizado.

O sururu de mangue, foi coletado somente pelo período de 5 meses (Dezembro/2010-Maio/2011), devido a diminuição de sua população ao longo do período de estudo. Um total de 31 amostras de moluscos bivalves foi avaliado (13 amostras de ostras de mangue, 13 amostras de sururus de coroa e 5 amostras de sururus de mangue).

O acesso aos locais de coleta destes moluscos foi realizado utilizando-se um barco a motor, georreferenciados utilizando GPS MAP 76 e a extração dos moluscos bivalves contou com o auxílio de um pescador da região. Os sururus foram coletados de forma manual e as ostras dos troncos das árvores do manguezal com

uma espátula. Em seguida, cada amostra foi transferida para sacos plásticos estéreis.



Figura 10: Mapa do sistema estuarino da Baía de Vitória com os pontos de extração de mexilhões - *Mytella charruana* (“Sururu de coroa” - P1), *M. guyanensis* (“Sururu de mangue” - P2) e ostras - *Crassostrea rhizophore* (“Ostras do mangue” -P2).

Todas as amostras (água e moluscos) foram armazenadas em caixa térmica sob refrigeração logo após sua coleta, e transportadas para o Laboratório de Saneamento da UFES para análises subsequentes.

4.3 Análises Laboratoriais

As análises foram realizadas no Laboratório de Saneamento (LABSAN), Departamento de Engenharia Ambiental (DEA), na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

4.3.1 Análises Físico-Químicas das amostras de água

As análises físico-químicas realizadas na água coletada próxima ao local de coleta dos moluscos foram às seguintes: pH, temperatura, condutividade, salinidade, turbidez, sólidos dissolvidos e oxigênio dissolvido.

As medições de pH foram realizadas pelo método eletrométrico utilizando o pHmetro de bancada (DM-22, eletrodo Digmed), as medições de condutividade elétrica foram realizadas pelo método potenciométrico utilizando Condutivímetro (Jenco eletronic, 1671), as análises de turbidez foram realizadas pelo método nefelométrico com turbidímetro microprocessado (Alfakit) e as análises de salinidade foram realizadas com um Salinômetro (Bioprix). Todas essas medições, incluindo as dos Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) foram realizadas de acordo com as recomendações do Standard Methods for Water and Wastewater (APHA; AWA; WEF, 2005).

As medições da concentração de oxigênio dissolvido foram realizadas segundo Winkler (1888) e as de temperatura foram realizadas ainda em campo com o auxílio de um termômetro.

4.3.2 Análises microbiológicas das amostras de água e bivalves

A parte externa dos sururus e ostras foi lavada em água corrente. Posteriormente, as valvas dos sururus e ostras foram abertas com auxílio de faca estéril, e a porção gastrointestinal de todos removida (divertículo digestivo). Esse tecido foi escolhido, pois indica contaminação prolongada (exposição crônica) em relação às brânquias que refletem contaminações mais recentes (exposição aguda) (HAMZA-CHAFFAI *et al.*, 2000), sendo assim a parte mais recomendável para a análise de contaminação ambiental. As etapas seguintes para ambas as análises (bacteriológicas e virais) das

amostras de água do estuário e bivalves podem ser observadas nos fluxogramas a seguir (figura 11 e 12).

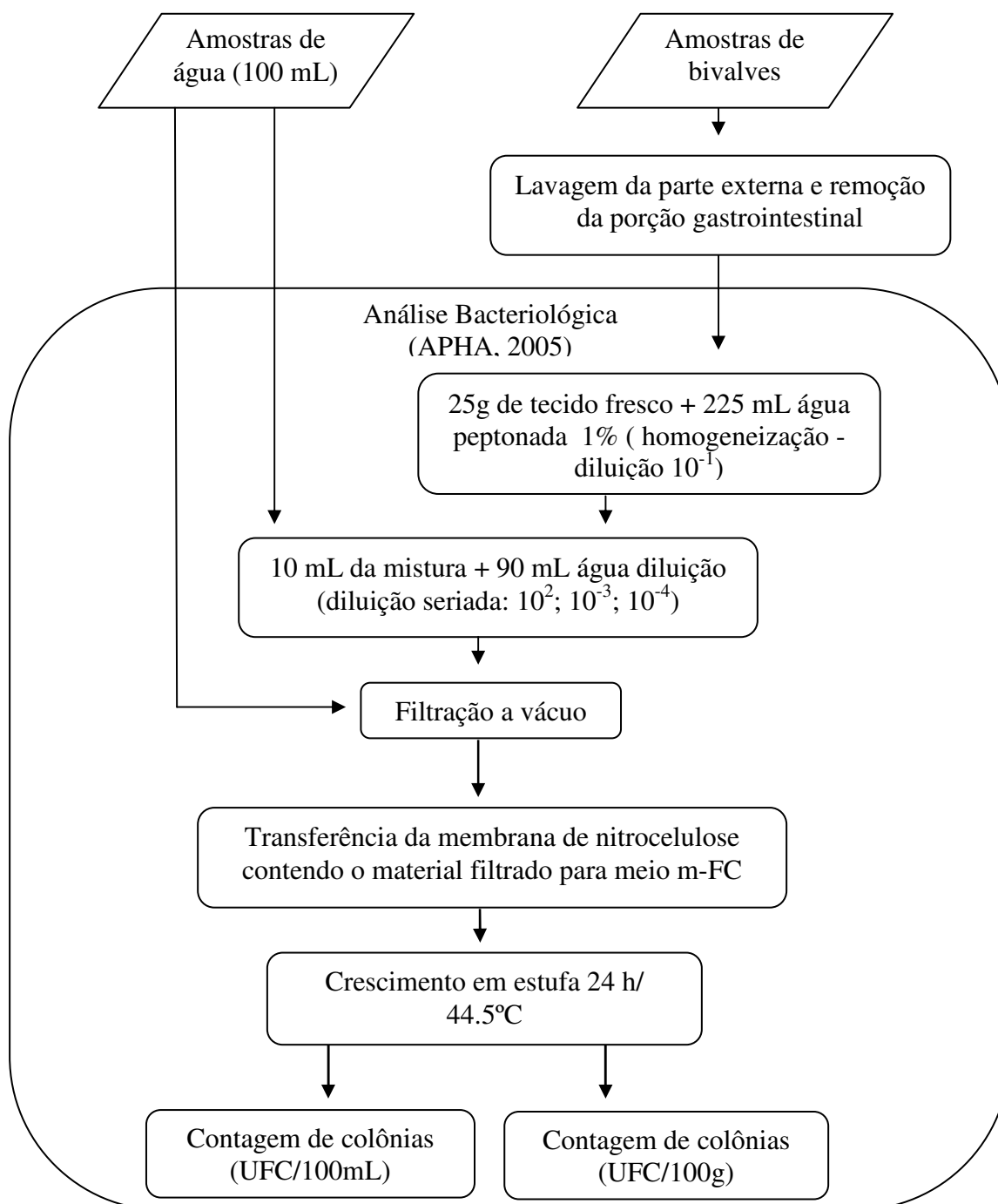


Figura 11: Fluxograma das principais etapas realizadas na detecção e quantificação de bactérias (coliformes termotolerantes) nas amostras de água do estuário e bivalves.

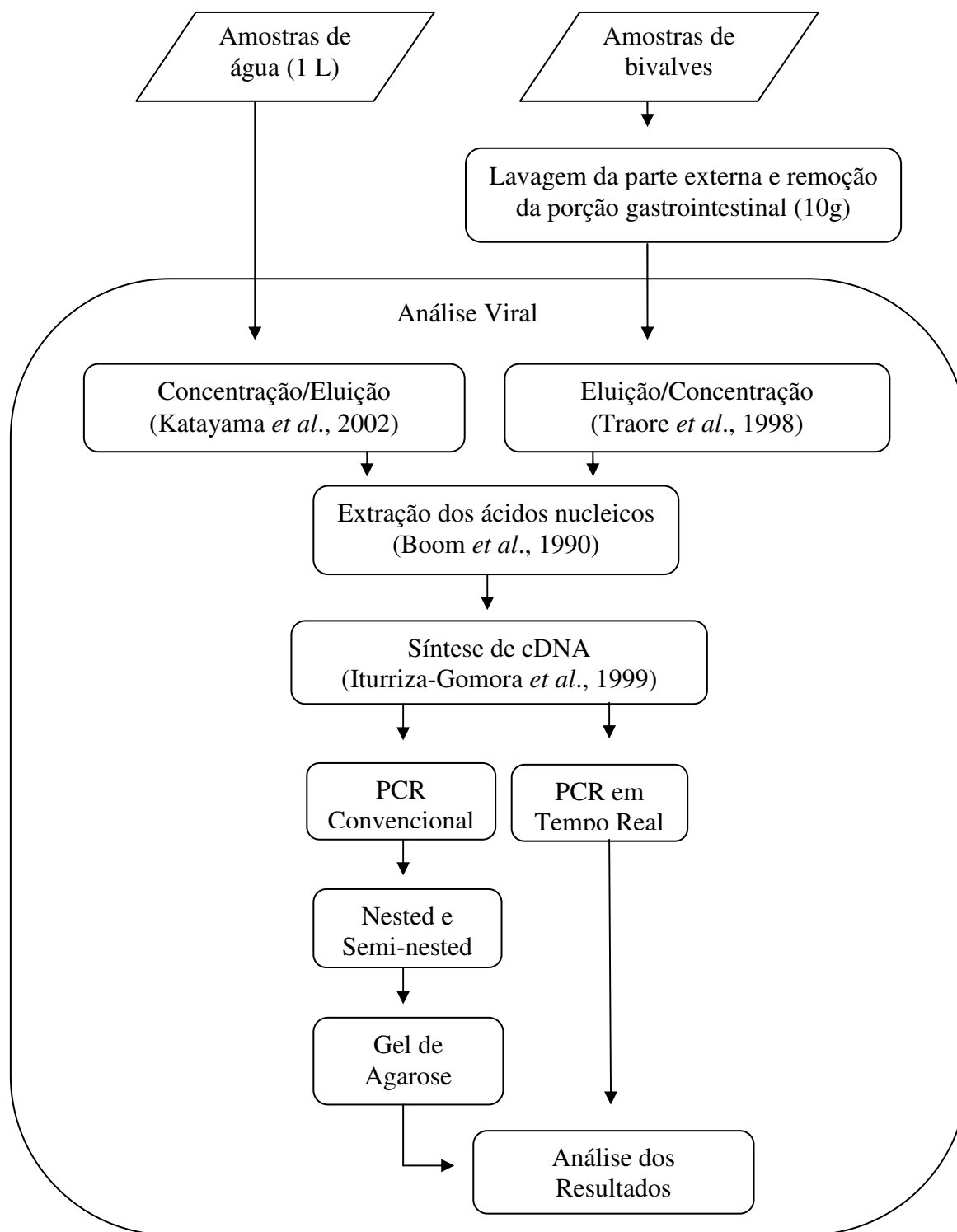


Figura 12: Fluxograma das principais etapas realizadas na detecção e quantificação de vírus entéricos nas amostras de água do estuário e bivalves.

4.3.2.1 Análises Bacteriológicas

Os testes para detecção e quantificação de coliformes termotolerantes foram realizados através da metodologia da membrana filtrante conforme estabelecido pelo APHA (2005) para análise em águas e alimentos.

Vinte e cinco gramas da porção gastrointestinal de sururus e ostras foram separadamente homogeneizados com o auxílio de um mixer (Walita) em 225mL de água peptonada 1% (diluição 10^{-1}). Após essa primeira diluição, foi feita uma diluição seriada (10^{-2} ; 10^{-3} e 10^{-4}) utilizando 10 mL das amostras diluídas em 90 mL de água de diluição (ISO 16140, 2003). Apenas as diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram utilizadas para filtração.

As amostras de água foram analisadas partindo de um volume de 100 mL de água do estuário dos pontos 1 e 2. Esses volumes iniciais também foram diluídos em série (10^{-1} ; 10^{-2} e 10^{-3}) utilizando 10 mL das amostras diluídas em 90 mL de água de diluição para detecção de coliformes termotolerantes.

Cada ensaio com volume final de cem mililitros da amostra foi homogeneizado e filtrado com o uso de uma bomba a vácuo. A filtração foi realizada com uma membrana de nitrocelulose, quadriculada, diâmetro 47nm e porosidade de 0,45 μm (marca Unifil). Após a filtração, a membrana contendo a amostra foi transferida para placas de cultura (49x13 mm) contendo meio m-FC. As placas foram incubadas a 44,5 °C por 24h. Os resultados foram considerados positivos para coliformes termotolerantes quando houve o crescimento de colônias azuis sobre as membranas após este período de incubação. O resultado foi expresso em Unidade Formadora de Colônia por 100 mL de volume filtrado para amostras de água, ou por 100g de tecido de bivalve (UFC/100mL ou UFC/100g).

4.3.2.2 Análises Virais

4.3.2.2.1 Processamento e concentração das amostras de água

A detecção de vírus entéricos nas amostras de água consistiu de 4 etapas: (1) Concentração e ultrafiltração, (2) extração de ácidos nucleicos, (3) síntese de DNA

complementar (cDNA) e (4) detecção/quantificação do material genético por PCR convencional e em tempo real, respectivamente.

A concentração das amostras de água foi realizada utilizando a técnica de adsorção-eluição em membrana carregada negativamente, conforme metodologia proposta por Katayama, Shimasaki e Ohgaki (2002), com modificações. Em 1L da amostra de água foi adicionado 1L do tampão Tris/Ca⁺² (0,01M), pH=7,2. Após homogeneização, a solução foi filtrada em membrana de éster de celulose de poro 1,2µm (Millipore), para remoção de partículas maiores, utilizando recipiente de pressão para dispensação (Millipore). O filtrado teve o pH ajustado para 3,5 e foi novamente filtrado em membrana de éster de celulose carregada negativamente, com 0,45µm de poro (Millipore). A membrana foi eluída com 10 mL de NaOH 10mM e o eluato resultante foi neutralizado com H₂SO₄ 50mM e TE 100X.

O eluato foi transferido para tubos Amicon Ultra-15 (Millipore), e em seguida submetido à ultrafiltração que consiste em uma centrifugação a 6700xg a 4°C até que o volume da amostra alcançasse cerca de 800µL. A amostra assim concentrada permaneceu em freezer a -80°C até a extração de ácidos nucleicos.

4.3.2.2 Processamento e concentração das amostras de bivalves

A detecção de vírus entéricos nas amostras de bivalves consistiu de 4 etapas: (1) Eluição e concentração, (2) extração de ácidos nucleicos, (3) síntese de DNA complementar (cDNA) e (4) detecção/quantificação do material genético por PCR convencional e em tempo real, respectivamente. A partir da extração de ácidos nucleicos (etapa 2) as amostras de bivalves apresentaram um procedimento similar às amostras de água.

As partículas virais foram eluídas das amostras de sururus e ostras utilizando-se a metodologia proposta por Traore *et al* (1998), com modificações. Uma porção de dez gramas de tecido de cada espécie estudada foi eluída com 70 mL solução salina (glicina-NaCl, 0,1M/0,3M, pH=9.5). A mistura foi homogeneizada com um mixer (Walita) e centrifugada a 6700xg por 30 minutos a 4°C. O pH do sobrenadante foi ajustado para 7,5. Para a precipitação de partículas o mesmo volume de PEG-NaCl

(16%, 0,6M) foi adicionado ao sobrenadante. A mistura foi agitada por 12h a 4°C e em seguida centrifugada a 6700xg por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 3mL de tampão Na₂HPO₄ (0,15M, pH 9,0) e centrifugado novamente a 6700xg por 30 minutos a 4°C. Uma alíquota de 400µL do sobrenadante foi coletada e armazenada a -20°C até a etapa de extração de ácidos nucleicos.

4.3.2.2.3 Extração dos ácidos nucleicos

Para extração de ácidos nucleicos, foi utilizado o método de Boom *et al* (1990). O método se baseia na adsorção dos ácidos nucleicos em micropartículas de sílica seguido de lise celular utilizando-se o tiocianato de guanidina/EDTA para dissociação da ribonucleoproteína viral.

O RNA extraído foi submetido à reação de transcrição reversa para a obtenção do DNA complementar. Este procedimento foi adotado, pois dois dos três vírus pesquisados são vírus RNA (norovírus e rotavírus). Um volume de aproximadamente 30 µL foi obtido ao final de cada etapa de extração.

4.3.2.2.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O DNA complementar foi sintetizado utilizando-se o protocolo proposto por Iturriza-Gomara *et al* (1999) com modificações, conforme descrição a seguir. Uma mistura contendo 5µL de ácido nucleico e 1µL de DMSO, foi desnaturada à 97°C por sete minutos e mantida em gelo por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado uma solução contendo tampão de reação 10X, 200µM de cada DNTP, 2,5mM de MgCl₂, iniciador randômico hexanucleotídico pdN6™ (Amersham Biosciences) e 60U de enzima transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen). A mistura foi incubada à 42°C por uma hora e desnaturada a 95°C por 10 minutos. O cDNA foi armazenado em freezer a -20°C para posterior amplificação e quantificação específica dos vírus pesquisados.

4.3.3 Análises moleculares

4.3.3.1 Amplificação do DNA pela PCR convencional

Antes da etapa de amplificação, as amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro Ultrospec 100 (Amersham pharmacia biotech). O volume equivalente a 1 µg de DNA (cerca de 1,5 µL) de produto de extração foi utilizado com a mistura de reação, conforme tabela 7, cobertos por 30µL de óleo mineral para cada reação. A amplificação foi realizada utilizando um termociclador PTC-100, versão 7.0, MJ Research.

Tabela 7: Concentrações finais dos reagentes da PCR convencional em cada reação.

	Tampão 10X	DNTP	MgCl ₂	Iniciador sense ou antisense	TAQ
PCR AdV	1X	200µM	1,5 mM	0,4µM	1U
n-PCR AdV	1X	200µM	1,5mM	0,4 µM	1U
PCR RV	1X	200µM	1,5mM	0,24 µM	2U
n-PCR RV	1X	200µM	3,5mM	0,24 µM	2U
PCR NoV	1X	200µM	2,5mM	0,4 µM	1,25U
n-PCR NoV	1X	200µM	2,0mM	0,4 µM	1,25U

Nas tabelas 8 e 9, são apresentados os programas utilizados nas reações de amplificação da PCR e nested-PCR convencional para os três vírus avaliados (AdV, RV e NoV). Para cada reação de PCR, um microlitro de seu produto foi utilizado em reação de nested-PCR.

Tabela 8: Programa para reações de PCR de AdV, RV e NoV.

Etapa	Programa AdV	Programa RV	Programa NoV
Desnaturação	94°C/ 5min	94°C/ 5min	94°C/5min
Anela e extende	94°C/ 20s 60°C/ 20s 72°C/ 30s	94°C/ 20s 60°C/20s 72°C/ 30s	94°C/ 30s 50°C/1min 72°C/ 30s
	}35x	}35x	}40x
Extensão final	72°C/ 7min	72°C/ 7min	72°C/ 7min

Tabela 9: Programa para reações de nested-PCR de AdV, RV e NoV.

Etapa	Programa AdV	Programa RV	Programa NoV
Desnaturação	94°C/ 5min	94°C/ 5min	94°C/5min
Anela e extende	94°C/30s 60°C/30s 72°C/1min	94°C/30s 60°C/30s 72°C/1min	94°C/ 30s 50°C/1min 72°C/ 30s
	}35x	}35x	}40x
Extensão final	72°C/ 5min	72°C/ 5min	72°C/ 7min

Na tabela 10 encontram-se as sequências dos iniciadores utilizados para estes vírus. Os iniciadores utilizados para amplificação de AdV foram previamente descritos por Allard *et al.* (2001) e são encontrados em região conservada do gene hexon. Os iniciadores utilizados para amplificação de RV foram previamente descritos por Hafliker *et al.* (1997) e são encontrados em região conservada do gene VP7 para rotavírus do grupo A. Para NoV os genes amplificados foram os encontrados em região conservada do gene da RNA polimerase para o Genogrupo II (GII), previamente descritos por Hafliker *et al.* (1997). Devido à prevalência mundial de GII frente ao GI apenas GII foi pesquisado (LEES, 2000).

Tabela 10: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para PCR e nested PCR.

Vírus	Iniciador	Sequência(5'-3')	Amplicon(pb)
AdV (Allard <i>et al.</i> , 2001)	Hex 1	GCCSCARTGGKCW TACATGCACATC	301
	Hex 2	CAGCACSCCICGRATGTCAA	
	NeHex 3	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC	171
	NexHex 4	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA	
RV (Hafliger <i>et al.</i> , 1997)	RV 1	GTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1059
	RV 2	CTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG	346
	RV 3	TGTATGGTATTGAATATACCAC	
	RV 4	ACTGATCCTGTTGGCCAWCC	
NoV (Hafliger <i>et al.</i> , 1997)	SR II-1	CGCCATCTTCATTCAAAA	514
	SR II-2	TWCTCYTTYTATGGGTGATGATGA	203
	SR II-3	TTWCCAAACCAACCWGCTG	

4.3.3.2 Visualização dos produtos de PCR convencional em gel de agarose

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8%, em tampão TBE 1X, por 1h a 100V. Foi aplicado em gel de agarose, o padrão de peso molecular de 100pb, além das amostras contendo 5 µL de corante BET. O gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado por câmera digital (NIKON), para registro do resultado. O tamanho dos fragmentos (amplicons) esperados após a PCR pode ser visualizado na tabela 10.

4.3.3.3 Quantificação do DNA viral pela PCR em tempo real

A etapa de quantificação do genoma dos vírus presentes nas amostras utilizando a técnica da PCR quantitativa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz na cidade do Rio de Janeiro/RJ. Para esta análise foi utilizado o sistema TaqMan PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, Califórnia EUA).

4.3.3.3.1 Adenovírus

Para a amplificação e quantificação de fragmento específico para adenovírus (AdV), um volume de 5,0 µL de produto de extração foi utilizado com a mistura de reação: Master mix (Life Technologies), água DNase free, primers e sondas, nas concentrações especificadas na tabela 11. A reação foi ativada a 50°C por 2

minutos, desnaturada a 95° C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15s, anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Os iniciadores utilizados nas reações de qPCR são encontrados em região conservada do gene hexon, e foram previamente descritos por Hernroth *et. al.* (2002), conforme tabela 12.

4.3.3.3.2 Rotavírus

Para a amplificação e quantificação de fragmento específico para rotavírus (RV) um volume de 5,0 µL de cDNA foi utilizado com a mistura de reação, Master mix (Life Technologies), água DNase free, primers e sondas, nas concentrações especificadas na tabela 11. A reação foi ativada a 50°C por 2 minutos, desnaturada a 95° C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos a 95°C por 15s, anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Os iniciadores utilizados nas reações de qPCR são encontrados em região conservada do gene NSP3, que codifica para uma proteína não estrutural ligada ao RNA, e foram previamente descritos por Zeng *et. al.* (2008), conforme tabela 12.

4.3.3.3.3 Norovírus

Para a amplificação e quantificação de fragmento específico para norovírus (NoV) um volume de 5,0 µL de cDNA foi utilizado com a mistura de reação: Master mix (Life Technologies), água DNase free, primers e sondas, nas concentrações especificadas na tabela 11. A reação foi ativada a 50°C por 2 minutos, desnaturada a 95° C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos a 95°C por 15s, anelamento e extensão a 56°C por 1 minuto. Os iniciadores utilizados nas reações de qPCR, COG2 são encontrados na região altamente conservada de junção das ORF1 e ORF2 dos genogrupos GII de NoV, como previamente descritos por Kageyama *et. al.* (2003), conforme tabela 12.

Tabela 11: Concentrações finais dos primers e sondas da qPCR em cada reação.

	Iniciador sense ou antisense	Sonda
PCR AdV	22,5 µM	11,25µM
PCR RV	10µM	10 µM
PCR NoV	10µM	10µM

Tabela 12: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sonda da qPCR.

VÍRUS	PRIMERS/ SONDA	SEQUÊNCIA (5'→3')
AdV (Hernroth <i>et al.</i> 2002)	AdF	CWTACATGCACATCKCSGG
	AdR	CRCGGGCRAAYTGCACCAG
	AdP	FAM-CCGGGCTCAGGTACTIONCCGAGGCGTCCT-TAMRA
RV (Zeng <i>et al.</i> 2008).	NSP3-F	ACCATCTWCACRTRACCCTCTATGAG
	NSP3-R	GGTCACATAACGCCCTATAGC
	NSP3-P	VIC – NONE AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA – MGB
NoV GII (Kageyama <i>et al.</i> 2003)	COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG
	COG2R	TCGACGCCATCTTCATTACA
	RING2	VIC-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA

4.3.3.4 Cálculo para conversão do número de cópias genômicas por ciclo em número de partículas virais/g

Os resultados quantitativos obtidos na TaqMan PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, Califórnia EUA) são expressos em números de cópias genômicas por ciclo. Para a conversão deste valor em “número de cópias genômicas” ou seu equivalente “número de partículas virais” por grama de tecido de molusco ou por 100 ml para amostras de água foi preciso utilizar os seguintes cálculos:

Para amostras de água e moluscos:

$$N^{\circ} \text{ partículas virais} = (X * K)/10$$

Sendo: X= número de cópias genômicas obtidas na reação

K= constante, representante das diluições ao longo do processo desde a eluição/ concentração até a qPCR.

O valor das constantes é diferente entre as matrizes estudadas. Para a matriz água a constante apresenta o valor final de 60, referente à diluição de 5x na síntese de cDNA, 6x na extração de ácidos nucleicos e 2x na ultrafiltração. A divisão pelo fator 10 é para converter o valor obtido em 1 litro para a quantidade encontrada em 100 mL (mais detalhes no anexo 1). Para a matriz tecido dos moluscos a constante apresenta o valor final 262,5, referente à diluição de 5x na síntese de cDNA, 6x na extração de ácidos nucleicos e 8,75x na eluição. A divisão pelo fator de 10 é para

converter o valor obtido em 10 gramas de tecido em 1 g de tecido (mais detalhes no anexo 2).

Assim a equação para o cálculo da carga viral em água é representada pela seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ partículas virais} = (X * 60)/10$$

E a equa o para o cáculo da carga viral em mariscos   representada pela seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ partículas virais} = (X * 262,5)/10$$

4.3.4 Controle de qualidade

Foram utilizadas diferentes salas para as análises físico-químicas, processamento das amostras, procedimentos pré-PCRs e p s-PCRs. As análises bacteriológicas foram realizadas em sala de microbiologia, sempre manipulando os ensaios atrás do bico de Bunsen, com instrumentos esterilizados.

Em todas as etapas foram utilizados controles positivos e negativos. Para realiza o do controle positivo, na etapa de elui o/concentra o inicial, foram inoculadas nas amostras dos tecidos de ostras e sururus, cerca de 1g de amostras clínicas (fezes) positivas para cada um dos vírus pesquisados, a fim de garantir que a metodologia utilizada fosse capaz de identificar resultados positivos. Após inocula o, o procedimento seguiu as mesmas etapas realizadas para amostras ambientais. As amostras clínicas (fezes) obtidas de crianças com diarréia foram cedidas pela professora Dra. Liliana Cruz Spano do Núcleo de Doenças infecciosas/ UFES.

Nas etapas de extra o e PCR real time, também foram utilizados controles positivos e negativos. Os controles negativos foram realizados pela substitui o do DNA por água milli-Q.

4.4 Análise estatística

Foi realizada estatística descritiva dos resultados obtidos nas análises físico-químicas, bacteriológicas e virológicas quantitativas. Nas análises físico-químicas foram avaliados: mediana, mínimo e máximo; nas análises bacteriológicas foram avaliados: média geométrica, mediana, mínimo e máximo; e nas análises virais quantitativas, a média geométrica, mínimo e máximo.

O teste t de Student foi utilizado a fim de verificar a existência de diferença estatística entre os valores obtidos dos parâmetros físico-químicos para P1 e P2.

Para verificar a correlação entre os parâmetros físico-químicos e a pluviosidade e a presença de vírus nos moluscos foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson; para comparar as metodologias moleculares de detecção viral (Nested-PCR e qPCR) para cada tipo de vírus (AdV, RV e NoV) foi utilizado o teste Exato de Fisher com auxílio do programa estatístico BioEstat 5. Para interpretação estatística assumiu-se $\alpha = 5\%$.

5. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos nos 13 meses de monitoramento dos moluscos bivalves estudados, juntamente com os resultados das amostras de água de seus respectivos pontos de coleta do manguezal (Ponto 1: sururu de coroa e Ponto 2: sururu de mangue e ostra de mangue), quanto às análises físico-químicas, bacteriológicas e virais das amostras.

5.1 Análises Físico-químicas

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da água (turbidez, sólidos dissolvidos totais, condutividade, salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido) ao longo do monitoramento podem ser visualizados nas figuras 13 a 19. Os dados pluviométricos do volume acumulado durante cada mês foram apresentados juntamente com os dados pluviométricos do volume de chuva acumulado nos cinco dias anteriores à coleta de cada mês, seguindo o padrão adotado por He e He (2008). Os dados de precipitação pluviométrica foram obtidos pelo Instituto capixaba de pesquisa, assistência técnica e extensão rural (INCAPER) para a estação do município de Vitória/ES.

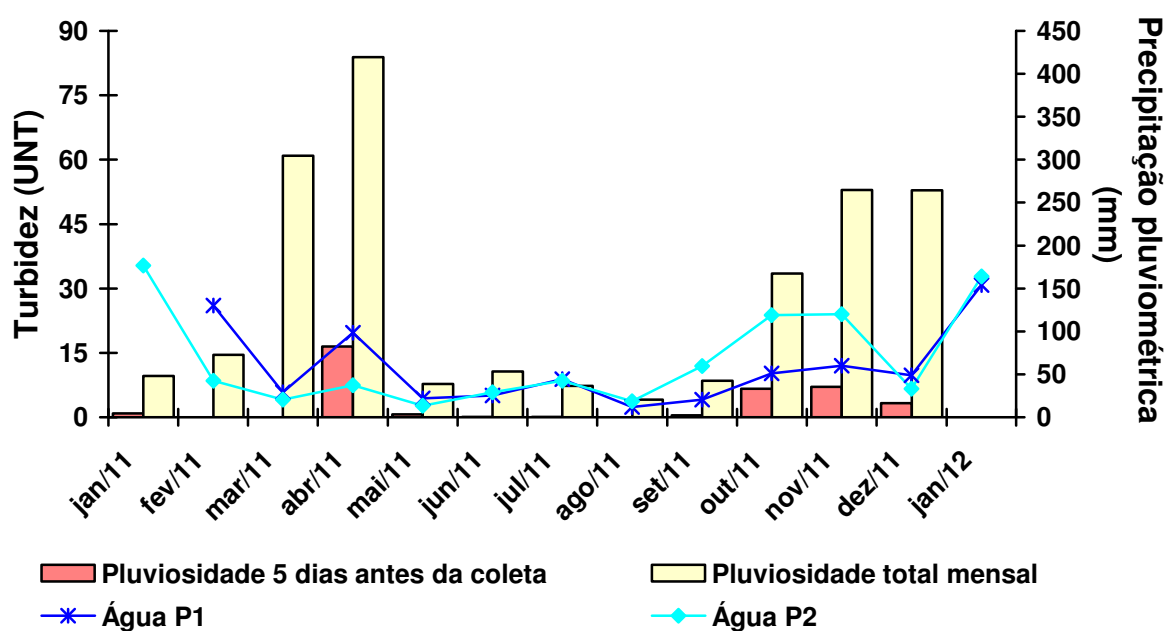


Figura 13: Monitoramento da turbidez no dia de coleta e valores acumulados de chuva mensais e para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, nos dois pontos do estuário de Janeiro/2011 a Janeiro/2012.

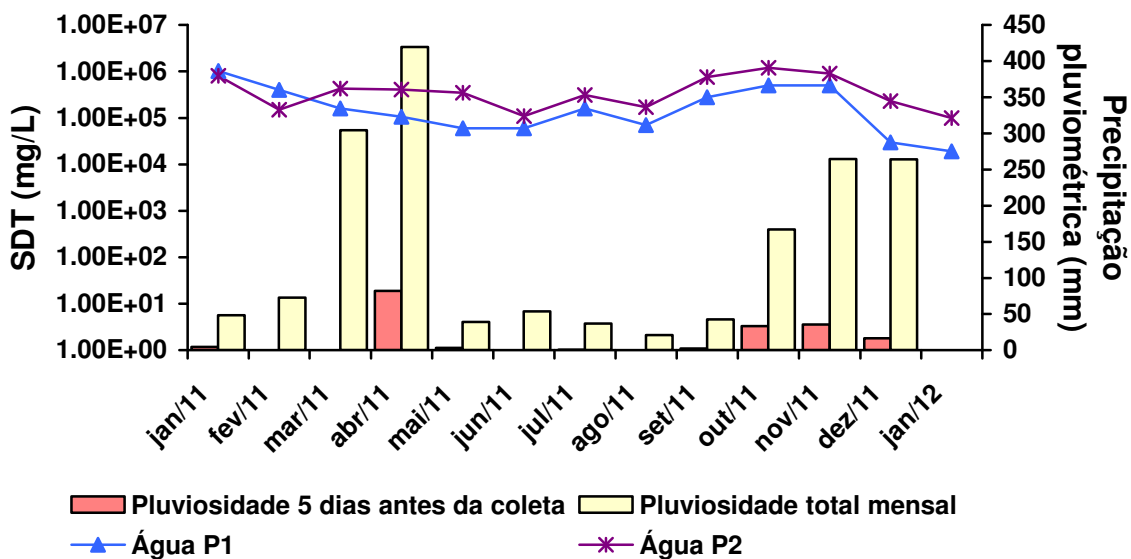


Figura 14: Monitoramento dos sólidos totais dissolvidos no dia de coleta e valores acumulados de chuva mensais e para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.

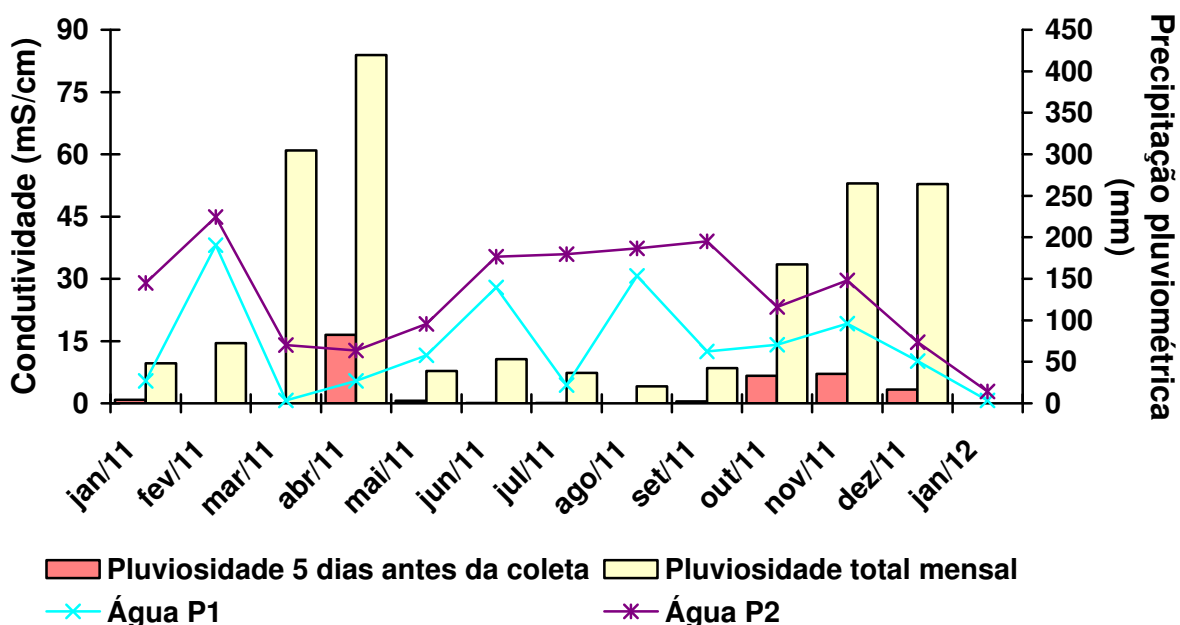


Figura 15: Monitoramento da condutividade no dia de coleta e valores acumulados de chuva mensais e para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.

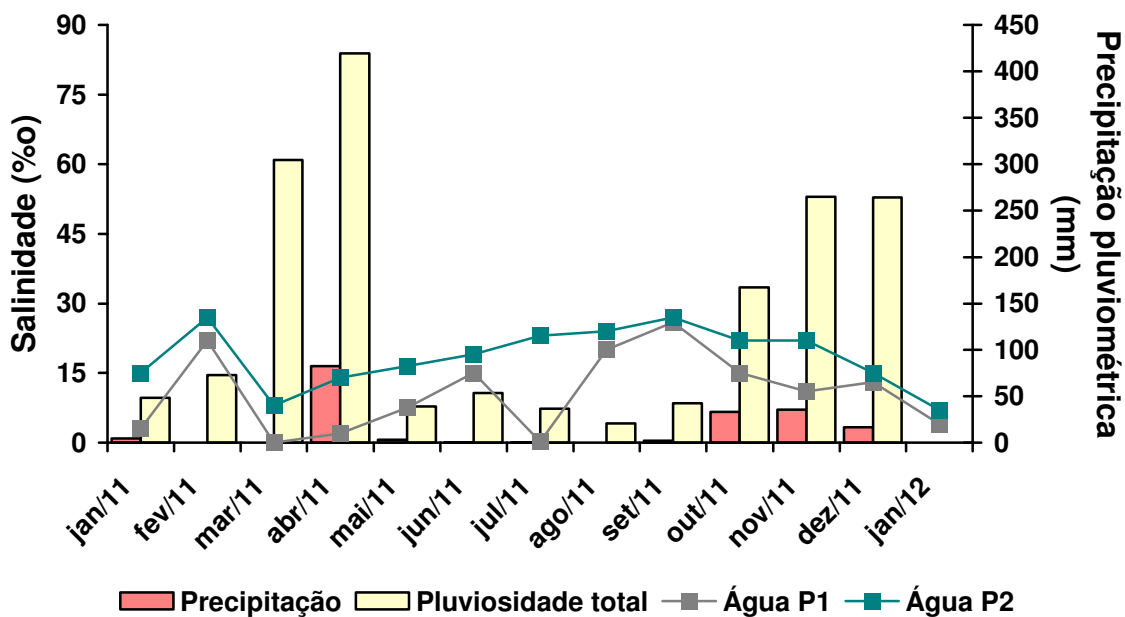


Figura 16: Monitoramento da salinidade no dia de coleta e valores acumulados de chuva mensais e para os cinco dias anteriores ao dia de coleta, nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.

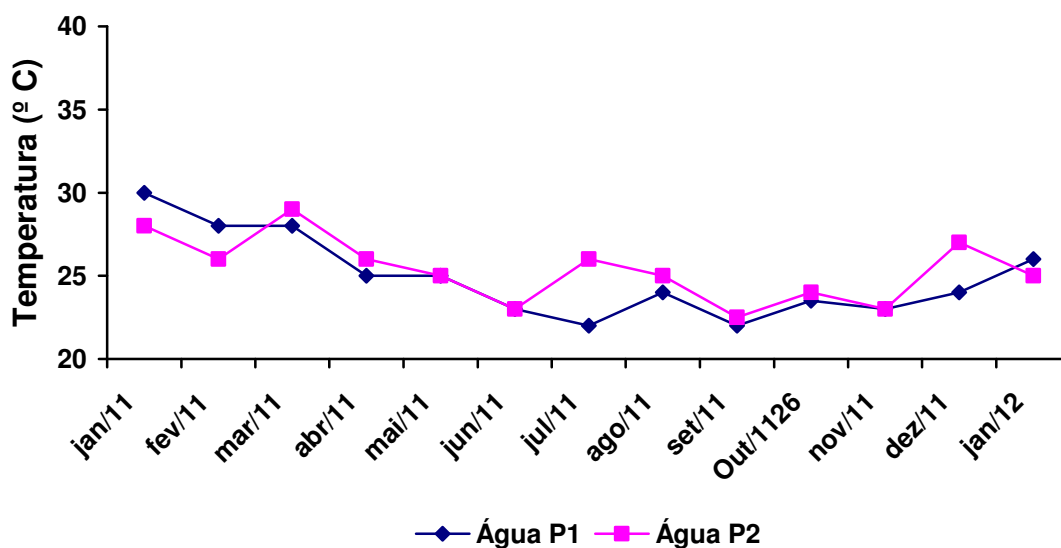


Figura 17: Monitoramento da temperatura da água do estuário no dia de coleta, nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.

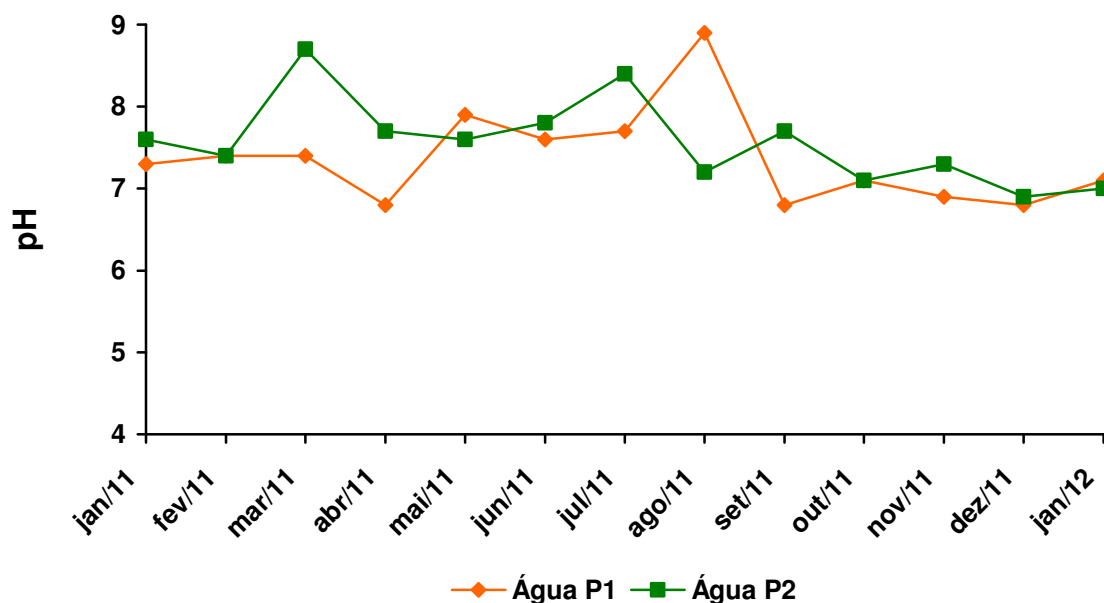


Figura 18: Monitoramento do pH da água do estuário no dia de coleta, nos dois pontos do estuário de janeiro/2011 a janeiro/2012.

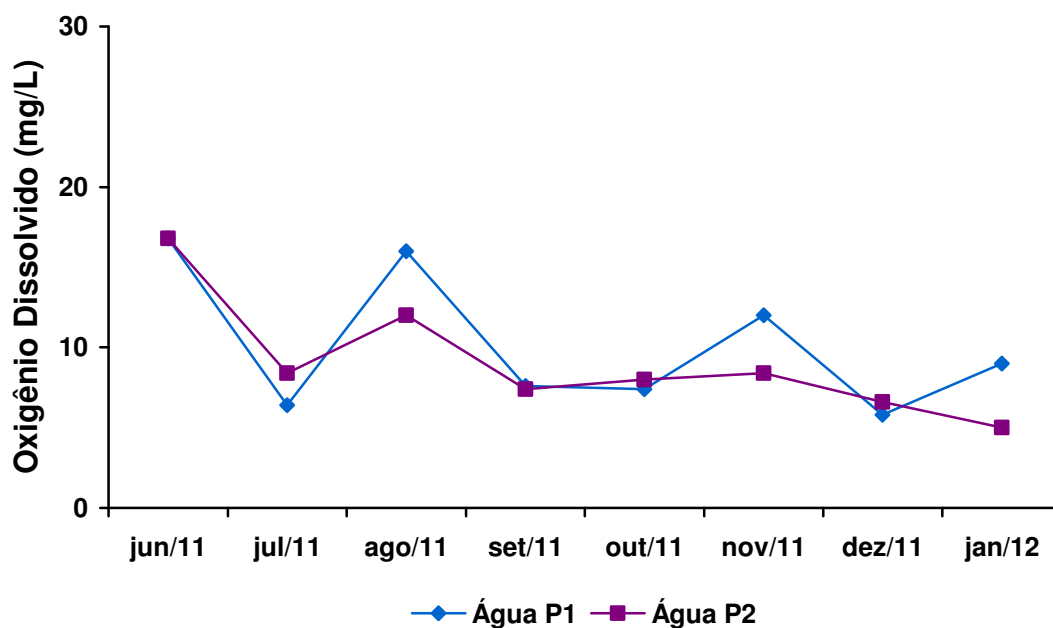


Figura 19: Monitoramento do oxigênio dissolvido na água do estuário no dia de coleta, nos dois pontos do estuário de junho/2011 a janeiro/2012.

As análises físico-químicas da turbidez, SDT, temperatura, pH, condutividade, salinidade e oxigênio dissolvido foram analisados primariamente a fim de caracterizar a água do estuário onde os bivalves foram coletados. Como exemplo, a quantidade de oxigênio dissolvido pode ser um indicativo de significativas cargas de

matéria orgânica incorporadas ao estuário, situação que normalmente ocorre com o lançamento de esgotos domésticos e efluentes industriais ricos em matéria orgânica nos corpos d' água (FIORUTTI & FILHO, 2005). Em adição, a avaliação de todos estes parâmetros foi realizada, pois podem afetar a integridade dos vírus no ambiente, a fisiologia e a capacidade de depuração de bivalves (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Os parâmetros turbidez, SDT, temperatura, pH e oxigênio dissolvido revelaram poucas variações em seus resultados ao longo do ano, independente se a estação era seca ou chuvosa. As medidas de precipitação pluviométrica do volume total mensal de chuva e o volume acumulado nos 5 dias anteriores a coleta foram utilizados a fim de verificar a existência de diferença entre os resultados demonstrando que quaisquer dos volumes de precipitação considerados não interferiram significativamente nos valores físico-químicos.

Os parâmetros condutividade elétrica e salinidade, por outro lado, variaram ao longo das estações seca e chuvosa, apresentando valores maiores em períodos secos e menores em períodos chuvosos. Esse padrão era esperado, pois em períodos chuvosos ocorre uma diluição nas águas do estuário diminuindo a quantidade de íons dissolvidos da água. É importante ressaltar que nos meses de Março e Julho das análises do ponto 1 apresentaram os menores valores de condutividade e salinidade de todo o período de monitoramento, pois por problemas técnicos, a coleta de água nestas datas foi realizada com a maré mais baixa do que o padrão adotado para os demais meses.

A avaliação de todos os parâmetros a partir do mês de outubro deve ser diferenciada, pois a partir deste mês a maré adotada foi de 0,3m enchente e não 0,8 m enchente como nos meses anteriores. Isso é significativo, pois com a maré mais baixa e em períodos chuvosos, o sedimento revolvido pelas chuvas passou a exercer um grau de interferência maior sobre os parâmetros turbidez, SDT, salinidade e condutividade, devido à mistura do material anteriormente sedimentado com a coluna d'água.

Os resultados estatísticos descritivos dos parâmetros físico-químicos da água (turbidez, sólidos dissolvidos totais, condutividade, salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido) podem ser visualizados na tabela 13.

Não foram observadas diferenças significativas entre os pontos de coleta de água do estuário (P1 e P2) quando analisados os parâmetros turbidez ($p = 0,4257$), STD ($p=0,0650$), pH ($p=0,1745$), temperatura ($p=0,4302$) e concentração de oxigênio dissolvido ($p=0,4576$). O teste t student foi utilizado a fim de verificar a existência de diferença estatística entre os valores obtidos dos parâmetros físico-químicos para P1 e P2 para a confirmação. Por outro lado, quando analisados os parâmetros condutividade elétrica e salinidade (CE: $p=0,0049$ e Sal.: $p=0,0083$), P1 apresentou valores menores. Este ponto é localizado na desembocadura do Rio Santa Maria, sofrendo, assim, maior influência da água doce e conseqüentemente, uma concentração menor de sal em relação ao ponto 2, que se encontra a quase 1 Km da saída do mesmo rio.

Tabela 13: Estatística descritiva dos parâmetros físico-químicos analisados durante os 13 meses de monitoramento ($n=13$).

Parâmetro	Ponto de coleta	Mediana	Mínimo	Máximo
Turbidez (UNT)	P1	8,84	2,38	129,88
	P2	8,5	2,72	35,36
Condutividade (mS/cm)	P1	11,55	0,67	38,1
	P2	29	2,87	44,9
Sólidos Dissolvidos Totais (mg/ L)	P1	$1,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$1,02 \times 10^6$
	P2	$4,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$
Oxigênio Dissolvido (mg/ L)	P1	16,0	6,4	16,8
	P2	12,0	8,4	16,8
Salinidade (UPS)	P1	11,0	0,0	26,0
	P2	19,0	7,0	27,0
pH	P1	7,3	6,8	8,9
	P2	7,6	6,9	8,7
Temperatura(°C)	P1	25	22	30
	P2	25	22,5	29

5.2 Análises bacteriológicas

As variações de densidade de coliformes termotolerantes ao longo dos 13 meses de monitoramento podem ser observadas na figura 20. O sururu de mangue só foi monitorado para este tipo de análise pelos primeiros 4 meses de estudo.

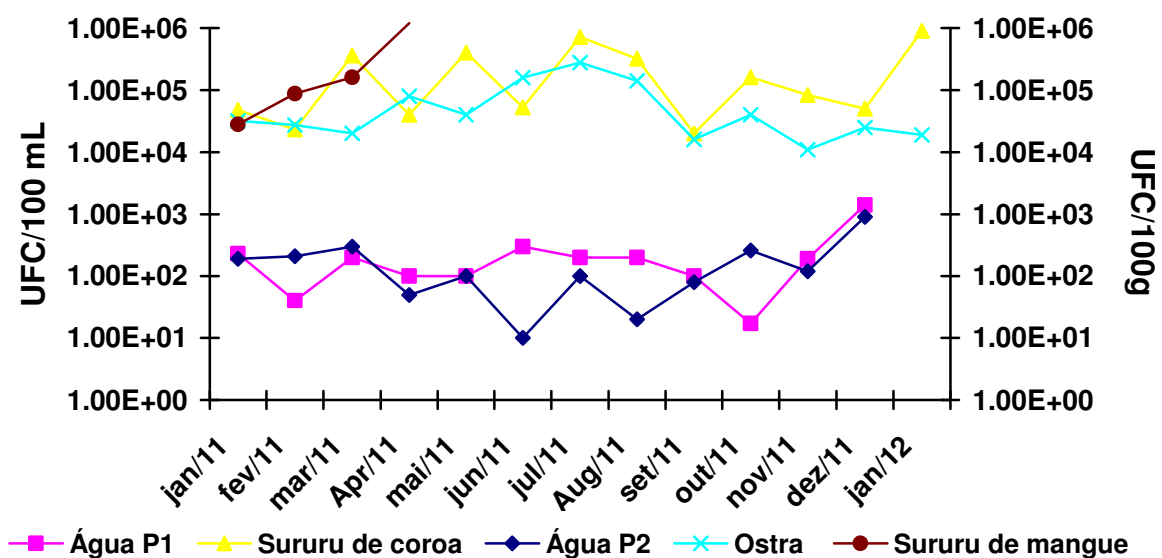


Figura 20 – Resultados da média mensal do monitoramento bacteriológico (coliformes termotolerantes) pelo método da membrana filtrante das amostras de água do estuário e bivalves.

Os valores obtidos para coliformes termotolerantes nas amostras de água do estuário variaram entre $1,7 \times 10^1$ a $1,4 \times 10^3$ UFC/100mL no P1 e $1,0 \times 10^1$ a $9,0 \times 10^2$ UFC/100mL no P2. Nas amostras de bivalves variaram entre $2, \times 10^4$ a $3,6 \times 10^6$ UFC/100g no sururu de coroa, $2,8 \times 10^4$ a $1,2 \times 10^6$ UFC/100g no sururu de mangue e $4,0 \times 10^3$ a $2,77 \times 10^5$ UFC/100g na ostra de mangue.

Conforme observado, a maior densidade de coliformes termotolerantes foi encontrada nas amostras dos moluscos bivalves quando comparada às amostras de água. O Teste t logaritimizado foi utilizado para verificar a existência de diferença significativa nas densidades de coliformes termotolerantes entre as amostras. Em geral, não foram observadas diferenças na densidade de coliformes termotolerantes para os pontos 1 e 2 de água do estuário ($p=0,3170$). Todavia, os sururus de coroa apresentaram uma densidade maior de coliformes termotolerantes do que as ostras

de mangue ($p=0,015$), indicando maior contaminação bacteriológica e conseqüente maior risco de consumo em relação as ostras. Na tabela 14 pode-se comparar os resultados descritivos obtidos nos 2 pontos de monitoramento da água do estuário, nas duas espécies de sururu e na ostra.

Tabela 14: Resultados de estatística descritiva da concentração de coliformes termotolerantes nas amostras pesquisadas pelo método da membrana filtrante.

		Água		Sururu de coroa	Sururu de mangue	Ostra de mangue
		P1	P2			
		(UFC 100 ⁻¹ mL)		(UFC 100 ⁻¹ g)		
N		13	13	13	4	13
CT	Média Geométrica	1,47x10 ²	1,09x10 ²	1,47x10 ⁵	1,47x10 ⁵	4,24x10 ⁴
	Mediana	1,95x10 ²	1,10x10 ²	1,60x10 ⁵	1,24x10 ⁵	4,00x10 ⁴
	Mínimo	1,70x10 ¹	1,00x10 ¹	2,00x10 ⁴	2,80x10 ⁴	4,00x10 ³
	Máximo	1,40x10 ³	9,00x10 ²	3,60x10 ⁶	1,20x10 ⁶	2,77x10 ⁵

“CT”: Coliformes Termotolerantes.

A densidade de coliformes termotolerantes detectada nos sururus de coroa chega a ser 1000X maior aos valores observados nas amostras de água do estuário de onde foram retirados, levando-se em consideração a média geométrica. A mesma comparação foi realizada para a ostra e o sururu de mangue coletados do ponto 2. A densidade de coliformes termotolerantes detectada nas ostras superou cerca de 400X as amostras de água, contudo o valor mais surpreendente foi o encontrado para o sururu de mangue, quase 1400X mais contaminado que a água no ponto em que foi retirado (P2).

A concentração de coliformes termotolerantes nas amostras de bivalves manteve-se elevada durante todo o ano, independente se a estação era seca ou chuvosa. Também não apresentou correlação com os parâmetros físico-químicos ou com a maré (0,3m enchente ou 0,8 m enchente). Um padrão similar da presença de coliformes termotolerantes foi observado nas amostras de água do estuário (P1 e P2).

5.3 Detecção viral

Os resultados obtidos ao longo do monitoramento dos vírus entéricos adenovírus (AdV), rotavírus (RV) e norovírus (NoV) nos pontos de coleta de água, sururus e ostras podem ser visualizados na tabela 15.

Os resultados da detecção viral ao longo dos 13 meses de monitoramento demonstraram a presença de um ou mais vírus em todos os meses estudados para pelo menos alguma das amostras testadas.

As amostras de sururus de mangue foram coletadas apenas durante um período de 5 meses (dezembro/10-Abril/11). A previsão inicial do estudo era realizar o monitoramento desta espécie de mexilhão ao longo do ano junto com as demais amostras. Todavia, devido ao aumento da contaminação da área e a intensa extração dos sururus de mangue pelos pescadores da região, estes bivalves tornaram-se escassos na área e não foi possível prosseguir com sua coleta.

Os dados de detecção viral demonstraram que não existe correlação entre a presença de vírus na água e nos moluscos bivalves estudados. A ausência de vírus na água não garante a ausência de vírus nos moluscos, como demonstrados nos meses de janeiro e maio para água P1 e sururu de coroa e maio para água P2 e ostras de mangue; por outro lado, a presença de vírus na água, também não implica necessariamente na presença de vírus nos moluscos, como observado nos meses de abril para água P1 e sururu de coroa e março para água P2 e ostra do mangue.

Adicionalmente foi observada a coinfeção viral nas amostras. Das 31 amostras de moluscos bivalves analisadas, 28 (90%) foram positivas para pelo menos algum vírus. Destas, 11 (39,3%) apresentaram infecção somente com uma espécie de vírus. 10 (35,7%) apresentaram coinfeção com dois tipos de vírus e 7 (25%) com os 3 tipos de vírus estudados.

Na tabela 16 encontram-se resumidos os resultados das frequências obtidas para todas as amostras de água, sururus e ostras.

Tabela 15: Ocorrência de vírus detectados durante o período de monitoramento para amostras de água e moluscos por análise de PCR qualitativa e qPCR.

Mês/Ano	Amostra/ Vírus														
	Água P1			Sururu de coroa			Água P2			Sururu de mangue			Ostra de mangue		
	AdV	RV	NoV	AdV	RV	NoV	AdV	RV	NoV	AdV	RV	NoV	AdV	RV	NoV
Dez/10	-	-	-	NC	NC	NC	-	+	-	-	+	+	NC	NC	NC
Jan/11	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Fev/11	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Mar/11	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Abr/11	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Mai/11	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NC	NC	NC	-	-	+
Jun/11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	NC	NC	NC	-	-	+
Jul/11	+	-	-	+	-	+	-	-	-	NC	NC	NC	-	-	-
Ago/11	+	+	-	+	+	-	+	+	+	NC	NC	NC	+	+	+
Set/11	-	+	-	+	+	+	-	+	-	NC	NC	NC	+	+	+
Out/11	+	+	-	+	+	+	+	+	-	NC	NC	NC	-	+	+
Nov/11	+	+	-	+	+	-	-	+	-	NC	NC	NC	-	-	+
Dez/11	-	+	-	-	+	+	+	+	+	NC	NC	NC	-	+	+
Jan/12	-	+	-	-	+	-	-	+	-	NC	NC	NC	-	+	+

“NC”: amostras não coletadas; “-”: Resultado negativo; “+” : Resultado positivo.

Tabela 16 – Frequência de genoma de AdV, RV e NoV por nested-PCR e qPCR em água, sururus e ostras durante 13 meses de monitoramento.

Amostra	Vírus	Nº amostras positivas/avaliadas	% de amostras positivas
Água P1	AdV	5/13	38,5%
	RV	9/13	69,2%
	NoV	2/13	15,4%
Sururu de coroa	AdV	7/13	53,8%
	RV	9/13	69,2%
	NoV	7/13	53,8%
Água P2	AdV	6/13	46,1%
	RV	9/13	69,2%
	NoV	5/13	38,5%
Sururu de mangue	AdV	2/5	40,0%
	RV	3/5	60,0%
	NoV	3/5	60,0%
Ostra	AdV	4/13	30,8%
	RV	7/13	53,8%
	NoV	11/13	84,6%

Os resultados da amplificação do genoma viral pela técnica de PCR (nested-PCR e qPCR) mostraram que os rotavírus apresentam maior prevalência entre os demais vírus estudados, adenovírus e norovírus, para todas as amostras de água do estuário, e nas amostras de sururus de coroa. Sua frequência alcançou níveis de pelo menos 53,8 % (7/13) nas amostras de ostras de mangue e chegou a uma frequência de quase 70% (9/13) dos testes para as amostras de água P1, água P2, e sururu de coroa. Adenovírus apresentam a segunda maior taxa de prevalência dentre os vírus estudados nas amostras de água do estuário. Foram detectadas a frequência mínima de 38,5% (5/13) na água P1 e a frequência máxima de 46,1% na

água P2 (6/13), enquanto que nas amostras de moluscos bivalves, foram os vírus de menor prevalência, com 30,8% (4/13) de frequência nas ostras de mangue e 40% (2/5) nos sururus de mangue. Os Norovírus GII foram detectados em menor frequência nas amostras de água. Contudo, nas amostras de moluscos chegaram a ser o mais prevalente, com 84,6% (11/13) nas ostras de mangue, a maior prevalência observada entre todos os vírus. A frequência mínima observada foi de 15,4% (2/13) na água P1, seguida de 38,5% (5/13) na água P2, 53,8% (7/13) nos sururus de coroa e 60,0% (3/5) nos sururus de mangue.

Os resultados da utilização de duas técnicas moleculares diferentes para a detecção de vírus nas amostras foram distintos, sendo que a qPCR mostrou-se mais sensível a detecção viral para os três vírus estudados do que a nested-PCR. Das 31 amostras de moluscos bivalves analisadas, AdV apresentaram uma diferença maior de detecção ($p=0,0243$), com apenas 5 amostras positivas (16,13%) para nested-PCR e 13 amostras positivas para qPCR (42,0%); quando analisados RV, 11 (35,5%) foram positivas pela nested-PCR e 16 (51,61%) pela qPCR, enquanto que a menor diferença observada foi para NoV GII, com 10 (32,26%) amostras positivas para nested-PCR e 13 (42,0%) para qPCR (tabela 17, 18 e 19). A análise estatística demonstrou que não houve diferença entre os dois métodos utilizados para detecção de RV e NoV ($p=0,1528$ e $p=0,5$, respectivamente).

É importante ressaltar que nem sempre as amostras positivas da nested-PCR coincidiram com as amostras positivas da qPCR, embora isso tenha ocorrido na maioria dos casos. Isso pode ser observado nos meses de março e junho para RV e outubro e dezembro (2011) para NoV GII nos sururus de coroa; também abril, maio, junho, setembro, novembro e dezembro (2011) para NoV GII nas ostras de mangue que apresentaram positividade quando avaliados pela técnica da nested-PCR, mas não foram detectados pela qPCR.

Tabela 17: Comparação dos métodos moleculares da nested-PCR x qPCR para detecção de AdV em moluscos no período de monitoramento de dezembro/10 a Janeiro/12.

Mês	Amostra					
	Sururu de Coroa		Sururu de Mangue		Ostra de mangue	
	N-PCR	qPCR	N-PCR	Qpcr	N-PCR	qPCR
Dez/10	NC	NC	-	-	NC	NC
Jan/11	+	+	-	+	-	+
Fev/11	-	-	-	-	-	-
Mar/11	-	-	-	+	-	-
Abr/11	-	-	-	-	-	-
Mai/11	-	-	NC	NC	-	-
Jun/11	-	+	NC	NC	-	-
Jul/11	-	+	NC	NC	-	-
Ago/11	-	+	NC	NC	-	+
Set/11	+	+	NC	NC	+	+
Out/11	+	+	NC	NC	-	+
Nov/11	+	+	NC	NC	-	-
Dez/11	-	-	NC	NC	-	-
Jan/12	-	-	NC	NC	-	-

“+” : Amostras positivas; “-” : Amostras negativas; “NC”: Amostras não coletadas.

Tabela 18: Comparação dos métodos moleculares da nested-PCR x qPCR para detecção de RV em moluscos no período de monitoramento de dezembro/10 a Janeiro/12.

Mês	Amostra					
	Sururu de Coroa		Sururu de Mangue		Ostra de mangue	
	N-PCR	qPCR	N-PCR	qPCR	N-PCR	qPCR
Dez/10	NC	NC	+	+	NC	NC
Jan/11	+	+	-	+	+	+
Fev/11	-	-	-	-	-	-
Mar/11	+	-	-	-	-	-
Abr/11	-	-	-	-	-	-
Mai/11	-	-	NC	NC	-	-
Jun/11	+	-	NC	NC	-	-
Jul/11	-	-	NC	NC	-	-
Ago/11	+	+	NC	NC	+	+
Set/11	+	+	NC	NC	+	+
Out/11	-	+	NC	NC	-	+
Nov/11	+	+	NC	NC	+	+
Dez/11	-	+	NC	NC	-	+
Jan/12	-	+	NC	NC	-	+

“+” : Amostras positivas; “-” : Amostras negativas; “NC”: Amostras não coletadas.

Tabela 19: Comparação dos métodos moleculares da nested-PCR x qPCR para detecção de NoV GII em moluscos no período de monitoramento de dezembro/10 a Janeiro/12.

Mês/Ano	Amostra					
	Sururu de Coroa		Sururu de Mangue		Ostra	
	N-PCR	qPCR	N-PCR	qPCR	N-PCR	qPCR
Dez/10	NC	NC	-	+	NC	NC
Jan/11	-	+	-	-	+	+
Fev/11	-	-	-	+	+	+
Mar/11	-	-	-	+	-	-
Abr/11	-	-	-	-	+	-
Mai/11	-	+	NC	NC	+	-
Jun/11	+	+	NC	NC	+	-
Jul/11	-	+	NC	NC	-	-
Ago/11	-	-	NC	NC	-	+
Set/11	+	+	NC	NC	+	-
Out/11	+	-	NC	NC	-	+
Nov/11	-	-	NC	NC	+	-
Dez/11	+	-	NC	NC	-	+
Jan/12	-	-	NC	NC	+	-

“+” : Amostras positivas; “-” : Amostras negativas; “NC”: Amostras não coletadas.

As tabelas 20, 21 e 22 mostram a estatística descritiva para os resultados da quantificação de AdV (tabela 20), RV (tabela 21) e NoV GII (tabela 22) em amostras de água e moluscos bivalves. Os dados obtidos pela média geométrica de AdV para amostras de água e bivalves não apresentam diferença expressiva nas quantidade de partículas virais entre estas duas matrizes. O mesmo padrão é observado para RV e NoV GII. Estes resultados também mostram que RV foram detectados em quantidade maior, seguido por AdV e depois NoV GII nas duas matrizes. As médias geométricas são referentes às amostras positivas quantificadas pela qPCR.

Tabela 20 – Quantificação de AdV em amostras de água (nº copias genômicas/100mL) e bivalves (nº copias genômicas/g) por PCR em Tempo Real.

Local de coleta	Nº amostras positivas	Nº cópias genômicas (Média Geométrica de amostras positivas)	Mínimo	Máximo
Água P1 (n=13)	N=5	$8,81 \times 10^1$	$4,61 \times 10^1$	$3,04 \times 10^2$
Sururu de coroa (n=13)	N=7	$4,55 \times 10^2$	$1,27 \times 10^2$	$9,15 \times 10^3$
Água P2 (n=13)	N=4	$1,06 \times 10^2$	$3,92 \times 10^1$	$3,01 \times 10^2$
Sururu de mangue (n=5)	N=2	$5,66 \times 10^2$	$1,31 \times 10^2$	$3,1 \times 10^3$
Ostra de mangue (n=13)	N=4	$1,11 \times 10^3$	$1,85 \times 10^2$	$8,81 \times 10^3$

Tabela 21 – Quantificação de RV em amostras de água (nº cópias genômicas/100mL) e mariscos (nº cópias genômicas/g) por PCR em Tempo Real.

Local de coleta	Nº amostras positivas	Nº cópias genômicas (Média Geométrica de amostras positivas)	Mínimo	Máximo
Água P1 (n=13)	N=7	$8,81 \times 10^2$	$4,61 \times 10^2$	$3,04 \times 10^3$
Sururu de coroa (n=13)	N=7	$3,37 \times 10^3$	$9,92 \times 10^1$	$1,26 \times 10^5$
Água P2 (n=13)	N=7	$1,06 \times 10^3$	$3,92 \times 10^2$	$3,01 \times 10^3$
Sururu de mangue (n=5)	N=2	$2,59 \times 10^3$	$2,54 \times 10^2$	$2,63 \times 10^4$
Ostra de mangue (n=13)	N=7	$5,31 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$	$8,55 \times 10^4$

Tabela 22 – Quantificação de NoV GII em amostras de água (nº cópias genômicas/100mL) e mariscos (nº cópias genômicas/g) por PCR em Tempo Real.

Local de coleta	Nº amostras positivas	Nº cópias genômicas (Média Geométrica de amostras positivas)	Mínimo	Máximo
Água P1 (n=13)	N=3	4,29	2,02	7,62
Sururu de coroa (n=13)	N=5	$3,94 \times 10^1$	$1,43 \times 10^1$	$7,99 \times 10^1$
Água P2 (n=13)	N=3	5,39	3,10	$1,55 \times 10^1$
Sururu de mangue (n=5)	N=2	$5,36 \times 10^1$	$2,41 \times 10^1$	$9,53 \times 10^1$
Ostra de mangue (n=13)	N=4	$1,83 \times 10^1$	4,65	$3,36 \times 10^1$

Não foi observada uma correlação estatística entre a quantidade de chuva e a concentração de partículas virais no ambiente para nenhum dos vírus. Os resultados demonstram a presença dos três vírus em diferentes meses do ano em todas as amostras, mesmo nos períodos da estação seca. Entretanto, é digno de nota que em todos os meses de maior quantidade de chuva, pelo menos um dos três vírus estudados foi encontrado.

Embora não tenha sido observada correlação entre a precipitação e a concentração de partículas virais nos bivalves, o coeficiente de Pearson demonstrou a correlação entre a presença de vírus nos dois bivalves ($r=0,9898$ para RV e $r=0,9859$ para AdV) ao longo do monitoramento. Este dado mostra que o risco de transmissão destes agentes virais a consumidores humanos é semelhante nos dois moluscos bivalves, mesmo sendo procedentes de áreas distintas.

As figuras 21, 22 e 23 mostram a correlação entre a presença de vírus e os SDT. Para RV a correlação apresentou-se maior do que a observada para AdV. NoV GII não apresentaram correlação com os SDT.

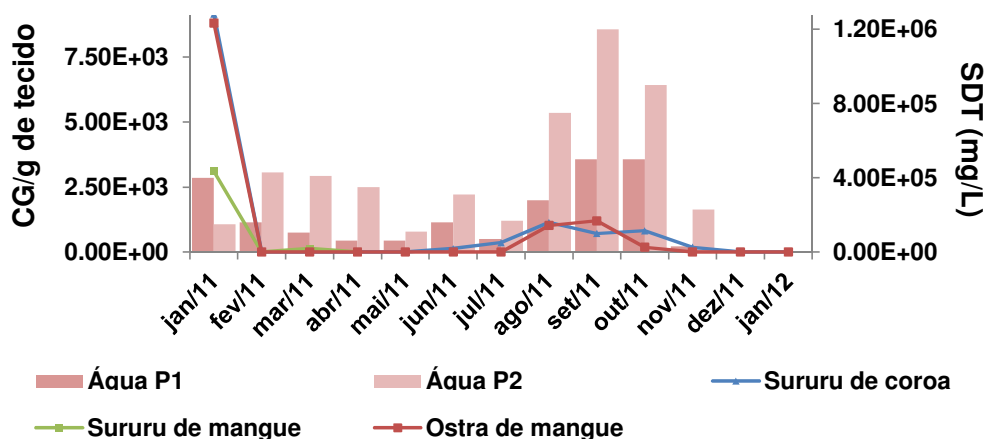


Figura 21: Monitoramento do número de partículas virais de AdV no dia de coleta e valores de SDT no dia de coleta, de janeiro/11 a janeiro/2012.

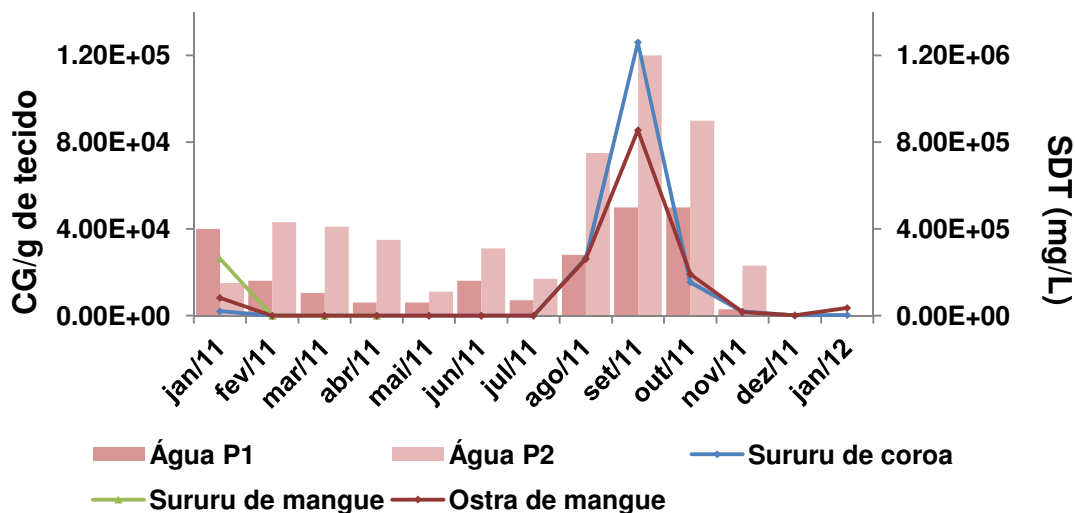


Figura 22: Monitoramento do número de partículas virais de RV no dia de coleta e valores de SDT no dia de coleta, de janeiro/2011 a janeiro/2012.

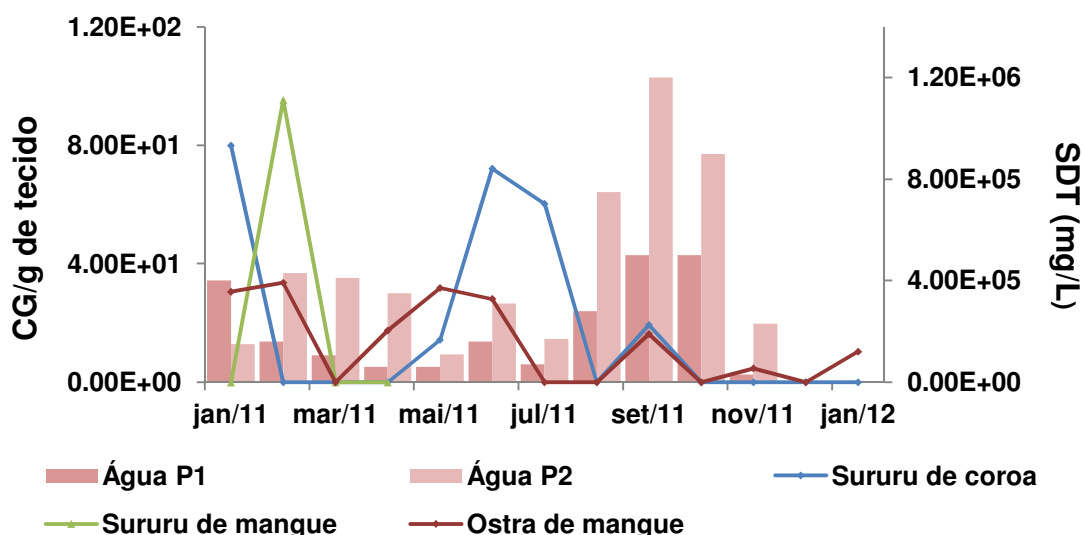


Figura 23: Monitoramento do número de partículas virais de NoV GII no dia de coleta e valores de SDT no dia de coleta, de janeiro/2011 a janeiro/2012.

Os testes de correlação entre a concentração de vírus nos moluscos e os demais parâmetros físico-químicos demonstraram correlação apenas entre a concentração de RV e SDT e entre a concentração de AdV e a turbidez e SDT. Para ambos os vírus não foi observada correlação entre os demais parâmetros físico-químicos. NoV não esteve relacionado a nenhum parâmetro.

6) DISCUSSÃO

6.1 A Contaminação do manguezal da Baía de Vitória

O manguezal representa um ecossistema de extrema importância para a sustentação da vida no mar, principalmente por fornecer as excepcionais condições de abrigo e suporte à reprodução e à alimentação inicial da maioria das espécies que habitam os oceanos (SHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1995). Enquanto fonte de alimento apresenta fundamental importância social e econômica sobre as populações humanas que vivem em seu entorno. Apesar da sua importância, ainda é um ecossistema depreciado por ser associado a locais fétidos e causadores de doenças, embora essas características reflitam os manguezais impactados por assentamentos humanos e contaminados por esgoto urbano (BARBOSA, 2004).

A localidade da Ilha das Caireiras está situada próxima à área de manguezal a noroeste da Baía de Vitória e apresenta uma estreita relação com este ecossistema, desde sua ocupação e invasão no final da década de 70 (PMV, 2009). Barbosa (2004) descreve esse processo de invasão desde a fase em que tanto a região nordeste, quanto noroeste da Baía de Vitória receberam grandes volumes de aterros. A região nordeste recebeu aterros hidráulicos e grande investimento em infraestrutura. A região noroeste, por outro lado, foi aterrada com materiais provenientes do lixão e só começou a receber investimentos na urbanização após pressão da sociedade e opinião pública devido a invasão da área por cerca de 5000 mil famílias, que sem opção de moradia, passaram a residir na região mesmo em condições subumanas e degradantes.

Esse histórico de despejo de lixo, de aterramento, de falta de investimentos e de ocupação desordenada gerou impactos negativos no manguezal da região que podem ser observados até os dias atuais. Uma área extensa foi diretamente afetada para dar espaço às moradias, e as áreas remanescentes ainda vêm sofrendo contaminação e degradação.

Um fator que tem contribuído para a continuidade deste processo de degradação é a falta de saneamento na Ilha das Caireiras, nos bairros adjacentes e em regiões

próximas ao entorno do estuário. O manguezal da Ilha das Caieiras encontra-se em uma área estuarina de desembocadura de importantes rios da Baía de Vitória: Rio Bubu, Rio Santa Maria da Vitória e Canal dos Escravos. Sabe-se que todos estes rios são fontes de contaminação, pois recebem aporte de efluentes domésticos *in natura*. No ano de 2008 a prefeitura do município de Vitória iniciou um projeto para implantação do Sistema de Esgotamento Sanitário de Santo Antônio, São Pedro e bairros adjacentes, compreendendo redes coletoras e estação de tratamento de esgoto que beneficiaria 22 bairros da região Noroeste de Vitória (Mario Cypreste, Santa Tereza, Santo Antônio, Caratoíra, Arivaldo Fassarela, Inhanguetá, Estrelinha, Bairro do Quadro, Bairro do Cabral, Bela Vista, São Pedro, Ilha das Caieiras, Condusa, Santos Reis, São José, Santo André, Redenção, Conquista, Resistência, Nova Palestina, Universitário e Grande Vitória) (PMV, 2009), entretanto, até a presente data, este projeto ainda não havia sido iniciado.

A preocupação urgente com a preservação deste ecossistema deve existir, não apenas por seu papel de 'berçário' marinho (SHAEFFER-NOVELLI *et al.*, 1995), mas também por atuar como fonte de alimento às populações humanas que vivem em seu entorno. A comunidade da Ilha das Caieiras utiliza-se da extração de diferentes espécies marinhas para consumo próprio, como peixes, caranguejos, siris, camarões e alguns bivalves, como mexilhões e ostras. Outra fração destes alimentos marinhos é destinada ao preparo de pratos típicos da cidade de Vitória. Trata-se de uma área conhecida por suas desfiadeiras de siris, pescadores e catadores de mexilhões, que atraem quantidade expressiva de turistas aos vários restaurantes da região. (PMV, 2009). Segundo o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), as residências e restaurantes foram os locais mais frequentes de ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimento (DTA) no Brasil entre 1999 a 2010 (tabela 23) e entre todos estes surtos, 78 foram ocasionados por pescados e frutos do mar.

Tabela 23: Locais associados a ocorrência de DTA no Brasil de 1999 a 2010.

Tipo de local de ocorrência	Surtos	%
Ignorado	1739	25,1%
Residência	2371	34,2%
Restaurantes/Padarias	1023	14,7%
Creche/Escola	531	7,7%
Refeitório	380	5,5%
Comemoração	280	4,0%
Outros	244	3,5%
Comunidade	131	1,9%
Hospital	102	1,5%
Instituição com Internação	62	0,9%
Evento	49	0,7%
Ambulante	27	0,4%

* Fonte: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Atualizado em outubro de 2010.

Desde a década de 80, a região da Baía de Vitória tem sido objeto de estudo de contaminação ambiental e muitas destas pesquisas têm mostrado o efeito da ocupação humana e contaminação por esgotos e efluentes sobre o manguezal da região (CARMO, 1987; RIBEIRO, 2002; SOUZA, 2002; CORREIA JUNIOR, 2003; JESUS 2004, 2006). O presente estudo faz parte de um projeto maior que tem se empenhado em verificar o efeito da contaminação do manguezal e do estuário da Baía de Vitória sobre a saúde da população que habita nas áreas adjacentes ao manguezal. Por tratar-se de uma área que deve ser preservada e por interferir na saúde das pessoas, a avaliação da qualidade ambiental de amostras de água do estuário da região e especialmente de alimentos marinhos tornam-se uma ferramenta importante para acompanhar o efeito de atividade antrópica sobre a região e o risco para população exposta.

Por outro lado, nem todos os microrganismos lançados na ambiente são capazes de causar doenças a indivíduos que entrem em contato com a água recreacional poluída ou que consuma água ou bivalves contaminados. O potencial de causar infecções está bastante relacionado à sobrevivência e estabilidade do patógeno no

ambiente (BOSCH, 1998), tornando necessários os estudos que esclareçam o papel das condições ambientais sobre os microrganismos. Assim, o presente trabalho também visou caracterizar algumas variáveis ambientais correlacionando-as com a presença de microrganismos na água do estuário e nos moluscos bivalves da região da Ilha das Caieiras.

6.2 Influência de fatores físico-químicos sobre a presença de microrganismos em água e moluscos bivalves

Condições físico-químicas circundantes podem contribuir para persistência de bactérias e vírus entéricos no ambiente e em bivalves. Nestas condições os microrganismos podem estar adsorvidos à matéria orgânica, partículas suspensas ou acumulados no sedimento (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Muitos trabalhos têm demonstrado essas correlações, como os estudos de Phanuwam *et al.* (2006) e Moresco *et al.* (2012). Phanuwam *et al.* (2006) demonstrou um aumento na concentração de *E. coli* e vírus entéricos com o aumento da turbidez e diminuição da condutividade e temperatura em diferentes amostras de água subterrânea e fluvial e Moresco *et al.* (2012) em Santa Catarina observou o aumento de *E. coli* e vírus entéricos (AdV, poliomavírus, NoV GI e GII e vírus da hepatite A) com a diminuição da salinidade e temperatura. Não foi observada nenhuma correlação entre a presença de microrganismos e o oxigênio dissolvido, porém uma correlação negativa foi observada com a salinidade para adenovírus, poliomavírus e vírus da hepatite A. Outra correlação negativa observada foi que a combinação dos altos níveis de salinidade com a elevada temperatura apresenta um possível sinergismo sobre a redução do genoma de vírus da hepatite A nas amostras de água do mar.

Os resultados obtidos para a presença de vírus neste estudo, corroboraram com os dados obtidos nos estudos de Phanuwam *et al.* (2006) e Moresco *et al.* (2012) em que a turbidez e SDT apresentaram-se positivamente correlacionadas com a presença de RV e AdV. De fato, partículas em suspensão constituem um veículo natural dominante na ajuda à sobrevivência de vírus na água, pois os vírus são

capazes de se agregar rapidamente às partículas sólidas, protegendo-se desta forma dos fatores degradantes, como luz UV (MARINO *et al.*, 2005).

Wetz *et al.* (2004) mostraram que em amostras de água do mar, altos níveis de salinidade aumentam a agregação viral e resulta em baixos títulos virais, mas os parâmetros condutividade e salinidade não se mostraram diretamente correlacionados com a presença de vírus no presente estudo. Outros fatores como a pluviosidade, se mostraram mais relacionados à presença dos vírus nas águas do estuário e nos bivalves estudados.

É importante ressaltar que devido a mudança de padrão de maré de 0,8 m enchente para 0,3 m enchente adotado a partir do mês de outubro, as correlações esperadas entre pluviosidade x salinidade e pluviosidade x condutividade, apresentaram padrão diferente do esperado. A diluição de íons que ocorre após eventos de chuva, causa uma diminuição das medidas de condutividade e salinidade, mas a partir de outubro essas medidas permaneceram elevadas. Isso ocorreu provavelmente devido a maior interferência do sedimento, que revolvido pela chuva pode ter contribuído para suspensão de íons, partículas sólidas e biológicas anteriormente sedimentadas (JENG *et al.*; 2005; HALLER *et al.*, 2009). Assim, presença de vírus, aparentemente esteve mais relacionada com a precipitação do que com valores de condutividade e salinidade menores.

No estudo de Justino (2009) foi verificada uma correlação positiva entre meses chuvosos e a presença de vírus entéricos em amostras d'água e sururus após um monitoramento de 14 meses comparando estação seca e chuvosa na cidade de Vitória (ES). O presente estudo detectou a presença de vírus em ambas as estações, seca e chuvosa. Mas é importante ressaltar que embora os vírus entéricos estudados pudessem estar ausentes em alguns meses com pouca ou nenhuma precipitação, sua presença foi detectada em todos os meses de chuva. Durante a precipitação intensa, o sedimento e as partículas em suspensão são revolvidos e liberados para diferentes alturas da coluna d'água, o que leva a dispersão e ao transporte de vírus associados às partículas. O processo de lixiviação e escoamento artificial após fortes chuvas, também são fatores contribuintes para este espalhamento (NICOSIA *et al.*, 2001). Esses dados demonstram a importância de

um monitoramento do sedimento da região de estuário da Ilha das Caieiras. Estudos como esses poderão ajudar a elucidar o papel dos sedimentos como fonte de contaminantes virais para água e bivalves.

Os parâmetros de temperatura e pH não apresentaram grandes variações ao longo do período de monitoramento e os testes estatísticos não apontaram correlação entre estes parâmetros e a presença de vírus no ambiente. Entretanto, nos meses que apresentaram temperatura mais baixa, entre Agosto e Novembro, a detecção de vírus foi observada em todas as amostras. Um resultado similar também foi observado nos estudos de Le Guyander *et al.* (2000) que demonstrou que a contaminação viral em amostras de água foi significativa durante a estação fria. Em vários estudos, vírus entéricos têm sido reportados como apresentando uma sobrevivência mais longa e frequente em temperaturas menores em ambientes naturais. Altas temperaturas podem danificar o capsídeo viral ou os ácidos nucleicos. Esses danos impedem a adsorção dos vírus ao seu hospedeiro e levam a inativação de enzimas requeridas para sua replicação (FONG & LIPP, 2005).

Nenhum parâmetro esteve correlacionado a presença de NoV no ambiente. Um resultado similar foi obtido por Moresco *et al.* (2012) já citado. Dentre os vários vírus entéricos avaliados, apenas NoV não apresentou correlação com nenhum parâmetro físico-químico. Uma possível razão para essa ausência de correlação de NoV com quaisquer parâmetros físico-químicos analisados para amostras de água, pode estar relacionada a sua característica de ser um vírus causador de surtos e não sazonal (LEES, 2000). E para amostras de bivalves, sua reconhecida característica de ligar-se quimicamente aos tecidos de bivalves (WANG *et al.*, 2008) tornando-os menos vulneráveis a variações do meio.

Além dos parâmetros temperatura, adsorção a sólidos suspensos e salinidade a persistência viral em ambientes aquáticos naturais também pode ser fortemente relacionada a predação por flagelados, proteases extracelulares, nucleases, e outras enzimas (FONG & LIPP, 2005), todavia, esses fatores interferentes não foram avaliados neste trabalho.

Na análise da microbiota de bivalves, é importante ressaltar que variações inter e intra espécie determinam a quantidade de água filtrada, que é entre vinte e cem litros de água por dia, independentemente das condições ambientais circundantes (RICHARDS, 1988; ROBERTSON, 2007). Isso significa que a fisiologia alimentar de moluscos bivalves determina a acumulação de microrganismos patogênicos filtrados da água circundante mais do que as condições ambientais aos quais estão submetidos (BURKHARDT & CALCI, 2000; HO & TAM, 2000).

No presente estudo, não foi observada nenhuma correlação entre os fatores físico-químicos, pluviosidade e altura das marés com a presença de *E. coli* nas amostras de água e bivalves. Esse resultado pode ser justificado pelas elevadas concentrações de *E. coli* encontradas durante todo o período de monitoramento, sem variações significativas entre as análises mensais para cada amostra.

6.3 Detecção de coliformes termotolerantes nas amostras de água do estuário e moluscos bivalves

A segurança de corpos d'água para fins recreacionais é estabelecida com um exame microbiológico de amostras de água. A premissa deste padrão adotado é baseada na identificação de microrganismos indicadores de contaminação por esgoto urbano. Os indicadores mais frequentemente usados são enterococos, coliformes termotolerantes e *E. coli* (ORTEGA *et al.*, 2009).

A contaminação de corpos hídricos com esgoto sanitário tem implicações que vão além da contaminação direta de pessoas. A contaminação indireta pode ocorrer com o consumo de alimentos marinhos crescidos nestas áreas contaminadas. Moluscos bivalves são um exemplo, que por apresentarem a capacidade de acumular partículas do meio, resultante de sua fisiologia alimentar, são bons indicadores da qualidade do ambiente em que crescem (SAPKOTA *et al.*, 2008). Se seu crescimento ocorre em áreas com contaminação fecal, eles podem concentrar bactérias e vírus patogênicos em seu trato digestivo e ao serem ingeridos, transmiti-los aos indivíduos susceptíveis, causando-lhes doenças (BOSCH, 1998).

O local avaliado neste estudo corresponde a uma área utilizada pela população adjacente para atividades recreacionais e de lazer. O extrativismo de mariscos e pescados também é realizado, embora não se trate de uma região previamente destinada ao cultivo de frutos do mar e nem se apresente estruturada pela presença de fazendas e criadouros. Os pontos do estuário selecionados (P1 e P2), onde foram coletados os sururus e as ostras correspondem aos locais de ocorrência natural destes bivalves e são prioritários na extração dos bivalves pelos pescadores da região. Segundo estes profissionais, normalmente cerca de 20 Kg de sururus são vendidos por semana, enquanto a comercialização de ostras se dá em sua maioria por encomenda, chegando à demanda de 70 Kg em um único pedido. Apesar de normalmente o sururu ser cozido antes do consumo, outras espécies tais como ostras, são habitualmente consumidas cruas, e podem representar elevado risco tanto a turistas, quanto apreciadores destes bivalves e a própria população local, se consumidas cruas. O mesmo pode acontecer com os mexilhões quando são consumidos mal cozidos.

A avaliação da qualidade bacteriológica das águas de estuário nos pontos 1 e 2 (P1 e P2) revelou durante todo o monitoramento a presença de coliformes termotolerantes dentro dos padrões considerados próprios estabelecidos pela Resolução CONAMA 274/2000 para água recreacionais. Somente os valores encontrados para o mês de dezembro estiveram acima do padrão considerado “próprio”, mas ainda assim mantiveram-se abaixo do limite estabelecido para “impróprio”. Entretanto, as mesmas águas apresentaram o nível de 73% de positividade viral ao longo do período de estudo. Esses resultados reforçam os estudos que mostram que os coliformes termotolerantes não são um indicador de contaminação fecal suficiente, pois não apresenta correlação com a presença de partículas virais em águas (ROMALDE *et al.*, 2002; SERRACA *et al.*, 2010).

Ao analisar a qualidade da água para fins de cultivo de bivalves, conforme padrão preconizado pelo CONAMA 357/2005 foi observada a inadequação da área para este uso, pois o limite de 43 coliformes termotolerantes/100 mL de água do estuário foi excedido em até 30 e 20 vezes no ponto 1 e 2 respectivamente, levando em conta os valores máximos obtidos de coliformes termotolerantes durante todo o período de monitoramento. Apenas os meses de fevereiro no ponto 1 e junho e

agosto no ponto 2 apresentaram níveis abaixo do estabelecido por esta legislação. A adoção exclusiva da análise do parâmetro água do estuário neste caso, já seria suficiente para indicar que a área em que se está sendo feito o extrativismo destes bivalves é uma área imprópria de cultivo, colocando em risco a saúde dos consumidores dos mariscos procedentes desta região.

Os resultados também demonstraram que a densidade encontrada de coliformes termotolerantes nos bivalves mostrou-se cerca de 400x (ostras de mangue), 1000x (sururu de mangue) e 1400x (sururu de coroa) mais contaminados do que as amostras de água de onde foram coletados. Esses dados refletem a eficácia do uso de moluscos bivalves como bioindicadores ambientais, pois podem concentrar contaminantes em níveis tão elevados quanto 1.000 a 10.000 vezes superior às verificadas na fonte de exposição (UNEP, 2004). Isso é significativo, pois a análise do tecido destes organismos é capaz de indicar a contaminação por substâncias ou microrganismos potencialmente patogênicos presentes na água circundante, mesmo que as condições ambientais não aparentem a presença de contaminação proveniente de atividade antrópica.

Estas observações são especialmente relevantes, levando-se em conta as diferenças de critério adotadas para certificação de qualidade sanitária de moluscos bivalves. Os países europeus, por exemplo, classificam os moluscos bivalves de acordo com a quantidade de *Escherichia coli* por 100g do tecido. Já a FDA (2003) dos Estados Unidos classifica as áreas de cultivos de moluscos bivalves de acordo com a quantidade de coliformes totais ou termotolerantes presentes na água de cultivo e não nos moluscos bivalves.

Assim, a adoção do critério utilizado pela FDA na região de estudo levaria a falsa conclusão de que os sururus e ostras da região estariam próprios para consumo, embora tenham sido detectados altos níveis de contaminação por coliformes termotolerantes no tecido destes bivalves. Por outro lado, se a legislação brasileira adotasse um critério com valores similares ao europeu os sururus e ostras coletados e vendidos na Ilha das Caieiras seriam classificados como em área de “cultivo proibido” a maior parte do período de monitoramento. Por este critério, somente uma minoria de amostras de ostras e sururus poderia após processo de depuração, voltar

a ser comercializada. Esse padrão europeu de qualidade parece refletir as condições sanitárias dos bivalves de modo mais próximo à realidade, resultando em um produto mais seguro para a população consumidora.

É importante ressaltar que no estudo de Justino (2009), após analisar amostras de sururu de mangue da mesma região foi verificado que a quantidade média de bactérias presentes era 400X maior que a detectada em 100 mL da água circundante. No estudo atual foi registrado na mesma espécie uma quantidade de coliformes termotolerantes 1000X maior no mesmo volume de água. Esses dados demonstram um aumento significativo da contaminação fecal na área de estudo nos últimos anos.

Os constantes altos níveis de coliformes termotolerantes acumulados nos bivalves pode ser justificado pelo frequente influxo de cargas de esgoto provenientes do Rio Santa Maria no ponto 1. Este rio recebe o aporte de esgoto sem tratamento em vários pontos do seu curso. Alguns estudos já foram realizados na região demonstrando uma importante contribuição de esgoto não tratado lançado no Rio Santa Maria, proveniente do município de Serra (CORREIA JUNIOR, 2003). No ponto 2 os elevados níveis de coliformes termotolerantes detectados em bivalves podem estar mais relacionados com as altas concentrações de coliformes termotolerantes associadas ao sedimento (JENG *et al.*, 2005; HALLER *et al.*, 2009). Um estudo em andamento, para verificar a contaminação fecal no sedimento do ponto 2 tem sido realizado paralelamente à pesquisa com bivalves e já tem demonstrado uma quantidade de coliformes termotolerantes quase tão elevada quanto aquela encontrada nos bivalves (dados ainda não publicados). Outro fator interferente, para os dois pontos de coleta de amostras, é a própria ausência de um sistema de saneamento da Ilha das Caieiras que pode também estar contribuindo para este grau de contaminação visto que diversas manilhas podem ser observadas nas saídas do bairro beirando as margens do estuário (figura 24). O estudo de Justino (2009) corrobora essa afirmação, pois verificou que a maior densidade de *E. coli* foi detectada no cais da Ilha das Caieiras, em relação a outros pontos de análise do estudo, sugerindo que a contaminação proveniente do bairro Ilha das Caieiras e, provavelmente, também dos outros bairros adjacentes, é um dos principais contribuintes para a contaminação do estuário.



Figura 24: Manilhas podem ser observadas nas saídas dos bairros da região da Ilha das Caireiras beirando as margens do estuário.

Nessa mesma região, Justino (2009) também detectou AdV, RV e NoV GII em elevadas frequências nas amostras de água do estuário e bivalves. Um impacto considerável resulta da capacidade de moluscos bivalves acumularem vírus humanos a partir de matrizes aquáticas contaminadas. Vários estudos têm mostrado que moluscos bivalves podem servir como carreadores virais e acumular um alto nível de partículas virais em seus tecidos (LEES, 2000; GIRONES, 2010).

6.4 Detecção viral nas amostras de água do estuário e moluscos bivalves.

Os vírus entéricos humanos são os agentes etiológicos mais comumente transmitidos por moluscos bivalves, sendo as ostras os vetores de doença predominantes. Mexilhões também são responsáveis por muitos surtos (LEES, 2000).

Nesse estudo verificou-se a ocorrência de AdV, RV e NoV GII em águas do estuário e no sururu de coroa procedentes de uma área próxima a desembocadura de um importante rio da Baía de Vitória, que recebe o aporte de efluentes domésticos *in natura*, o Rio Santa Maria da Vitória. Outro ponto de ocorrência de AdV, RV e NoV em água do estuário de ostras e sururus de mangue foi em uma área de bosque de manguezal considerada mais protegida, localizada a uma distância maior da desembocadura do rio em relação ao primeiro ponto.

Os três vírus estudados foram detectados em todas as amostras analisadas durante vários meses de todo o período de monitoramento. A tabela 24 apresenta uma comparação entre os resultados das frequências virais obtidas no presente estudo a alguns trabalhos realizados em outros países. Essa análise demonstra uma elevada frequência dos três vírus estudados nas amostras de bivalves da Ilha das Caieiras, acima daquela encontrada em bivalves de outras regiões.

Tabela 24: Detecção de vírus entéricos em amostras de moluscos bivalves e de água observada por diferentes autores.

Autor/Local	Vírus estudados	Resultados
Le Guyader <i>et al.</i> (2000) França	RV e outros	RV presente em 27% das amostras de ostras e em 52% das amostras de mexilhão
Nishida <i>et al.</i> (2003) Japão	NoV	Presença de NoV em 9% das amostras de ostras.
Karamoko <i>et al.</i> (2005) Marrocos	AdV	Adenovírus em 20% das amostras de mexilhões coletados em área contaminada por esgoto
Vilariño <i>et al.</i> (2009) Espanha	NoV, RV e outros	NoV em 50% das amostras de mexilhão <i>Mytilus galloprovincialis</i> . RV em 4,9% dos mexilhões.
Presente estudo Ilha das Caieiras, cidade de Vitória – ES	AdV, NoV e RV	RV em até 69,2% das amostras de P1, P2 e sururu de coroa; NoV GII em 84,6% das amostras de ostras e 38,5% de P2. AdV em 53,8% de sururus de coroa e 46,1% de P2

Os principais fatores que controlam a ocorrência e distribuição de vírus entéricos no ambiente incluem elevada excreção pelos hospedeiros, temperatura da água, susceptibilidade a inativação pela luz solar, agregação com sólidos suspensos e outras variáveis ambientais, como a concentração de nutrientes, presença de predadores, chuva e escoamento superficial (FONG & LIPP, 2005). Uma comparação do presente estudo com resultados obtidos em estudos similares é feita a seguir. Em todos os casos a presença de vírus está relacionada a um ou mais fatores indicados por Fong & LIPP (2005).

O estudo feito por Kozyra *et al.* (2011) na Polônia analisou amostras de água do Rio Wieprz e detectou AdV e NoV em 35% das amostras de água fluvial. AdV humanos foram detectados em 28.3% destas amostras positivas. Comparando estes dados com o monitoramento realizado no P1, do presente estudo, percebe-se que essa área mais afetada pela influência fluvial, apresentou uma prevalência superior ao estudo de Kozyra *et al.* (2011), com cerca de 40% de prevalência de AdV. Em estudos prévios realizados por outros autores, AdV humanos tem sido detectados com uma prevalência que varia entre 22,2 - 97,5% em águas fluviais (VAN HEERDEN *et al.*, 2005; HAMZA *et al.*, 2009).

Estudos realizados na Europa e em outras partes do mundo têm sugerido incluir adenovírus como um indicador de poluição de origem fecal em águas porque eles têm se mostrado mais persistentes e presentes em maior número do que enterovírus e outros vírus em esgoto e ambientes aquáticos contaminados (FONG & LIPP, 2005). Entre estes estudos, o de Muniain-Mujika *et al.* analisou prevalência de patógenos virais em moluscos bivalves em três sítios da Espanha, com diferentes níveis de contaminação fecal, 47%, 19% e 24% de positividade para HAdV, enterovírus humanos (HEV), e vírus da hepatite A, respectivamente. Eles propuseram o uso HAdV como um indicador de contaminação viral em bivalves, porque HAdV foi detectado em todas as amostras que foram positivas para HEV e vírus da hepatite A.

No presente estudo AdV não foram os vírus de maior prevalência nas amostras de água, sururus ou ostras. Os RV foram os vírus mais prevalentes nas amostras de água (P1 e P2) e nos bivalves a prevalência variou entre RV e NoV GII. Um perfil semelhante foi observado com as matrizes de água no mesmo local de coleta de amostras no estudo de Justino (2009). Isso sugere que embora AdV possa ser preferencial na utilização como marcador viral de contaminação de ambientes costeiros em algumas regiões do mundo, o mesmo pode não ser o marcador de contaminação ambiental mais apropriado na nossa região de estudo. Adicionalmente, esse resultado ressalta a importância dos estudos para encontrar um marcador mais próximo ao 'ideal' em águas costeiras e moluscos bivalves.

A elevada prevalência de RV seja em amostras de matrizes aquáticas ou de moluscos bivalves tem sido descrita por muitos autores (GERBA *et al.*, 1996; LE GUYADER *et al.*, 2000; MIAGOSTOVICH *et al.*, 2008) e representam a causa mais comum de diarreia grave na infância em todo o mundo. Dados do INCQS (2010) apontam RV como o 6º maior agente etiológico causador de surtos alimentares no Brasil entre 1999 a 2010. Dentre os vírus entéricos, RV é o único que pode ser prevenido por vacinação. A Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH) de nome comercial Rotarix foi implantada no Brasil em março de 2006, dirigida à população de menores de seis meses de idade e atualmente faz parte do Programa Nacional de Imunização. É uma vacina elaborada com vírus isolados de humanos e atenuados. A cepa utilizada (RIX4414) possui apenas um sorotipo em sua composição que é o G1[P8] (MS, 2006). A alta prevalência de RV foi observada nas amostras do estuário e bivalves no presente estudo, apesar de a região da Ilha das Caieiras apresentar a cobertura vacinal com a VORH. No trabalho de Nakagomi *et al.* (2008) realizado em Recife, a análise de amostras clínicas de crianças com diarreia, após período de introdução da VORH, demonstrou a diminuição significativa de 27% de detecção da taxa de RV G1P [8] e com isso houve redução na taxa de detecção de rotavírus entre os casos de diarreia causada por esta cepa. Por outro lado, foi observada uma alta prevalência de RV G2P[4] entre as crianças doentes. Isso ocorreu devido a menor eficácia da vacina VORH contra a cepa RV G2P[4], que ao encontrar uma população vulnerável apresentou vantagem seletiva sobre as cepas G1. De maneira similar, a alta prevalência de RV nas amostras ambientais da Ilha das Caieiras, mesmo com a cobertura vacinal, pode estar dentro da flutuação normal de co-circulação de genótipos de RV, mas afirmações conclusivas não podem ser feitas, pois não foram realizados experimentos para conferir a genotipagem dos vírus estudados.

Além de AdV e RV, o terceiro vírus detectado nas amostras de águas de estuário e moluscos bivalves da Ilha das Caieiras foi o NoV GII. Quando Justino (2009) detectou NoV em amostras de água do estuário na Ilha das Caieiras, foi detectada uma taxa de 4,8% de positividade nas amostras, enquanto que nas análises de sururu de mangue não foram detectadas nenhuma amostra positiva de NoV ao longo de todo monitoramento. O atual monitoramento indicou um aumento para 15,4% e 38,5% de positividade deste vírus nas amostras de P1 e P2 da mesma

região, e verificou a presença de NoV GII nas amostras de sururus de coroa, sururus de mangue e ostras de mangue com taxas de 53,8%, 60,0% e 84,6%, respectivamente.

Esses dados sugerem um aumento na circulação do NoV GII na região de estudo, o que é corroborado com o estudo de Ribeiro *et al.* (2008) que demonstrou a presença de NoV em 40% das amostras clínicas analisadas na cidade de Vitória. Contudo, a utilização de uma nova técnica mais sensível, a qPCR também pode ter sido a causa na elevação da prevalência do NoV GII nas amostras, pois permitiu a detecção do genoma viral desta espécie de vírus em vários meses em que a nested-PCR não foi capaz de detectar.

A maior taxa de positividade de NoV GII foi observadas nas ostras de mangue. Isso corrobora os estudos de Wang *et al.* (2008) que demonstrou que ao infectar os tecidos digestivos das ostras, NoV são capazes de ligarem-se especificamente a anticorpos nestes tecidos, tornando-os mais estáveis nesta espécie de bivalve. A presença de NoV em ostras de mangue neste estudo, chegou a ser 9x maior do que um estudo realizado por Nishida *et al.* (2003) com ostras procedentes de seu ambiente marinho natural no Japão. Esse dado sugere uma contaminação significativa das ostras da região e deve despertar a preocupação de autoridades de saúde, pois NoV em ostras são reconhecidamente causadores de gastroenterites e estão frequentemente associados a surtos em humanos (LOPMAN *et al.*, 2003). Adicionalmente esta espécie de bivalve é costumeiramente consumida crua, especialmente por turistas. Assim, a elevada contaminação das ostras de mangue da localidade da Ilha das Caieiras e seu consumo *in natura* constituem potencial risco para saúde dos consumidores da região.

Problemas de saúde humana associados ao consumo de moluscos bivalves contaminados com diversos vírus são bem descritos (LE GUYANDER *et al.*, 2000; LE GUYANDER *et al.*, 2008). A detecção de mais de um tipo de vírus nestes animais aumenta o risco de desenvolvimento de doenças, especialmente surtos de gastroenterite. Ainda assim, não são raros os estudos que demonstram a detecção de mais de um tipo de vírus (coinfecção) nas amostras de bivalves, sejam procedentes de seu ambiente natural ou cultivados em cativeiro (VILARIÑO *et al.*;

2009). Nos estudos de Vilariño *et al.* (2009) e Justino (2009) realizados na Galícia (Espanha) e em Vitória (Brasil), respectivamente, foram monitorados moluscos bivalves em ambiente natural para a presença de diferente vírus, dentre eles NoV e RV e AdV. Ambos demonstram a coinfecção de bivalves com dois vírus diferentes. O presente estudo também realizado em bivalves provenientes de ambientes naturais apresentou uma positividade total viral superior à encontrada na região da Galícia, e apresentou a coinfecção dos 3 diferentes vírus procurados. Bivalves de seu ambiente natural apresentam uma variedade maior de vírus detectados e as maiores taxas de coinfecção quando comparados aos bivaes de cativeiro. Isso reflete a condição de áreas contaminadas com esgoto urbano, em que mais de 100 espécies de vírus de origem fecal são lançadas no ambiente (TEUNES *et al.*; 2008).

Um diagnóstico preciso para a detecção de vírus no ambiente, especialmente quando contaminado por esgoto, é dificultado pela presença de substâncias inibidoras como compostos fenólicos, metais pesados e ácido húmicos. (SCHRIEWER, *et al.*, 2011 apud WILSON, 1997). Essas substâncias inibidoras impactam na sensibilidade de técnicas moleculares, podendo levar a subestimação da presença ou concentração de agentes patogênicos nas amostras. Assim, a escolha de um método mais sensível e específico é fundamental para análise de microrganismos em amostras ambientais.

6.5 A PCR em tempo real como ferramenta na detecção e quantificação de microrganismos em amostras ambientais

A PCR em tempo real tem sido descrita como mais rápida, sensível e específica que as técnicas moleculares convencionais. O uso da técnica da PCR em tempo real neste estudo viabilizou uma análise quantitativa da contaminação viral das amostras. A tabela 25 apresenta uma comparação dos resultados de análises de vírus em diferentes matrizes utilizando a PCR em Tempo Real.

Tabela 25: Quantificação de vírus entéricos em amostras ambientais, clínicas e de moluscos bivalves observada por diferentes autores

Autor/Local	Descrição
Muscillo <i>et al</i> (2008) Itália	AdV em água do mar: $4 \times 10^0 - 7,7 \times 10^3$ CG/10L AdV em água fluvial e de estuário: $3,4 \times 10^5 - 2,3 \times 10^6$ CG/10L AdV em esgoto: $1,1 \times 10^3 - 1,8 \times 10^5$ CG/mL
Zeng <i>et al</i> (2008)	RV em amostras clínicas: $1.70 \times 10^4 - 9.23 \times 10^{11}$ CG/g de fezes
Le Guyander <i>et al</i> (2009) França	NoV GII em mexilhões: $1,5 \times 10^1$ CG/g de tecido
Haramoto <i>et al</i> (2010) Japão	AdV em água fluvial: $3,16 \times 10^3 - 1,38 \times 10^5$ CG/L
Fumian <i>et al</i> (2010) Rio de Janeiro, Brasil	RV A em esgoto: $2.5 \times 10^4 - 1.6 \times 10^7$ CG/L
Rigotto <i>et al</i> (2010) Florianópolis, Brasil	AdV em água do mar: $6,0 \times 10^3 - 7,3 \times 10^7$ CG/L AdV em ostras de região de cultivo: $1,3 \times 10^4 - 6,0 \times 10^5$ CG/g tecido
Souza <i>et al</i> (2012) Florianópolis, Brasil	AdV em água do mar: Ausente – $3,0 \times 10^8$ CG/L AdV em ostras de região de cultivo: $4,3 \times 10^1 - 3,7 \times 10^5$ CG/g de tecido NoV GII em ostras de região de cultivo: $1,2 \times 10^6$ CG/g de tecido
Este estudo (2012) Vitória, Brasil	AdV em água de estuário: $3,92 \times 10^1 - 3,04 \times 10^2$ CG/100mL AdV em moluscos: $1,27 \times 10^2 - 9,15 \times 10^3$ CG/g tecido RV em água de estuário: $9,24 \times 10^1 - 3,17 \times 10^4$ CG/100mL RV em moluscos: $9,92 \times 10^1 - 1,26 \times 10^5$ CG/g tecido NoV GII em águas do estuário: $2,02 - 1,55 \times 10^1$ CG/100mL NoV GII em moluscos: $1,43 \times 10^1 - 9,53 \times 10^1$ CG/g tecido

("CG": Cópias gênicas).

Os resultados do presente trabalho revelaram concentrações similares de partículas virais (cópias genômicas) quando comparado com outros estudos, nas amostras de

água e de bivalves para AdV e NoV GII. Por outro lado, a concentração de RV em todas as amostras analisadas atingiu níveis tão elevados quanto os encontrados em amostras clínicas (fezes) e de esgoto, que normalmente são mais contaminadas do que amostras de estuário e de água do mar, respectivamente.

Um padrão que determine limites máximos toleráveis de partículas virais em ambientes aquáticos ou em moluscos bivalves destinados ao consumo humano ainda não foi estabelecido. Entretanto, um fator consensual entre os diferentes autores é que a contaminação de ambientes aquáticos e moluscos bivalves por vírus entéricos relaciona-se com a proximidade a descargas de esgoto urbano ou a presença de estações de tratamento de esgoto, que não são eficientes em remover partículas virais ao longo do seu processo (MUSCILLO *et al.*, 2008; HARAMOTO *et al.*, 2010; RIGOTTO *et al.*, 2010).

No presente estudo, nas amostras de água do estuário, os resultados foram expressos em números de cópias genômicas por 100 mL de água e não por 1 L, como nos outros estudos. Este padrão de volume de água foi adotado para permitir uma comparação entre a quantidade de vírus com os resultados de coliformes termotolerantes, que são expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por 100 mL, segundo o critério estabelecido para análise de balneabilidade de água recreacionais (CONAMA 274/2000). O resultado desta comparação demonstrou que a adequação aos padrões de balneabilidade de coliformes termotolerantes em 100 mL de água do estuário, nos pontos 1 e 2, não assegura a qualidade da mesma, pois no mesmo volume, a quantidade de genomas virais detectados nas amostras foi elevada. Esse fato faz com que o risco de contaminação humana e o desenvolvimento de doenças permaneça sobre a população exposta, pois a dose infecciosa de vírus entéricos pode ser tão baixa quanto 1-10 partículas virais viáveis (BOSCH 2010).

A utilização da técnica PCR em tempo real mostrou-se fundamental para um diagnóstico mais preciso da contaminação dos moluscos bivalves estudados. Com esta técnica foi possível detectar mais amostras positivas para os três vírus avaliados, demonstrando que o emprego de métodos baseados na PCR em tempo

real para detecção e quantificação viral fornece as vantagens de uma análise rápida com elevada sensibilidade e reprodutibilidade.

Neste estudo, também foi observada a detecção de várias amostras positivas para nested-PCR, enquanto negativa para qPCR nas análises de RV e NoV GII. O uso de primers para diferentes regiões do genoma pode ser uma possível razão desta diferença observada. Os primers sugeridos por Hafliger *et al* (1997) para NoV GII utilizados na nested-PCR correspondem a região conservada do gene da RNA polimerase, enquanto que os primers sugeridos por Kageyama *et al* (2003) para o mesmo vírus utilizado na qPCR correspondem a região conservada de junção das ORFs 1 e 2, referentes aos genes da RNA polimerase e do capsídeo viral. Para a detecção de RV, os primers sugeridos por Hafliger *et al* (1997) para a nested-PCR e Zeng *et al* (2008) para qPCR correspondem, respectivamente a região conservada do gene da proteína estrutural do capsídeo externo VP7 e a proteína não estrutural NSP3. Esses dados demonstram que a escolha dos primers pode afetar a eficácia das técnicas utilizadas e que a escolha do primer mais adequado é fundamental para um diagnóstico mais preciso da amostra avaliada. É digno de nota que para a detecção de AdV, Allard *et al* (2001) e Hernroth *et al* (2002) sugeriram os primers situados na mesma região de amplificação, correspondente à região conservada do gene hexon. Neste caso, não houve a detecção de amostras positivas pela nested-PCR que não tenha sido detectada pela qPCR.

Uma razão adicional para a detecção da mesma amostra como sendo positiva utilizando a nested-PCR, enquanto negativa com a qPCR, é a sua maior sensibilidade à inibição devido ao uso de sondas marcadas com fluoróforos. Wilson (1997) e Stults *et al* (2001) demonstraram que contaminantes orgânicos, metais, ácidos húmicos e outros componentes inibidores presentes em elevadas concentrações em amostras ambientais podem associar-se a sonda, interferindo na detecção da fluorescência. Esse efeito torna a qPCR mais sensível a inibição do que a nested-PCR que não apresenta o uso de sondas em seu sistema de detecção.

Assim, não se recomenda a exclusão do uso de técnicas de PCR convencionais pela substituição com a PCR em Tempo Real. Recomenda-se seu uso em conjunto com as técnicas moleculares convencionais, para tornar análises virais em matrizes

ambientais ou alimentares mais precisas. Porém é importante que os seguintes obstáculos sejam considerados: resultados falso-negativos quando o título viral é muito baixo e a superestimação do risco através da detecção de partículas virais não-infecciosas/inativadas, sugerindo um resultado positivo que não necessariamente representa uma ameaça à saúde pública (YEH *et al.*, 2009).

A incapacidade de fornecer informações sobre a infectividade do patógeno ou o indicador detectado tem sido a principal crítica da utilização desta técnica em amostras ambientais (GIRONES, 2010). Assim, diferentes grupos de estudo de Virologia Ambiental em várias partes do mundo têm se empenhado em discutir e esclarecer este e outros aspectos da contaminação ambiental por vírus entéricos e as metodologias mais apropriadas de detecção, quantificação e confirmação de sua infecciosidade. O avanço destas pesquisas permitirá uma avaliação mais acurada da qualidade microbiológica de ecossistemas aquáticos e alimentos provenientes destes.

7. CONCLUSÕES

As amostras dos moluscos bivalves provenientes de área de manguezal do sistema estuarino da Baía de Vitória revelaram elevadas concentrações de coliformes termotolerantes sendo que as duas espécies de mexilhão (sururu de mangue e sururu de coroa) apresentaram-se mais contaminados que as ostras para este parâmetro.

Os níveis de coliformes termotolerantes das amostras de água do estuário apresentam-se bastante superiores aos limites estabelecidos para águas destinadas ao cultivo de bivalves definido pelo CONAMA (357/2005) durante a maior parte do período de monitoramento, demonstrando que a área de onde são coletados os bivalves não é uma área própria para seu cultivo e comercialização.

Os três vírus avaliados, adenovírus, rotavírus e norovírus foram detectados nas amostras de água do estuário e nas diferentes espécies de bivalves estudadas ao longo de todo o período de monitoramento. A elevada contaminação viral e bacteriológica das amostras indica que esta área continua sob impacto antropogênico resultante do despejo de esgoto sanitário na região, e que o consumo de diferentes espécies de bivalves procedentes do manguezal da Ilha das Caieiras apresenta um potencial risco de causar doenças gastrointestinais aos consumidores, especialmente se ingeridos crus.

Uma diferença significativa foi observada na detecção dos vírus entéricos nas amostras de bivalves pelo uso da qPCR em comparação com a PCR convencional (nested-PCR). A qPCR mostrou-se mais eficiente e sensível na detecção de vírus entéricos nas amostras de bivalves, sugerindo que sua implementação na rotina de análise de amostras ambientais e alimentares pode fornecer um laudo mais preciso da qualidade sanitária das matrizes avaliadas. As análises moleculares detectam partículas virais apenas pela presença do número de cópias do seu genoma, não sendo, portanto possível inferir sobre o seu potencial infeccioso nestas amostras.

Os estudos envolvendo condições ambientais e a presença de vírus nas amostras de água e bivalves corroboraram estudos anteriores em que os parâmetros turbidez

e sólidos dissolvidos totais apresentaram correlação positiva com presença de vírus no ambiente, enquanto que com os outros parâmetros avaliados nenhuma correlação foi observada.

8. PERSPECTIVAS

Verificar, por técnicas de cultura celular a infecciosidade de vírus entéricos presentes na água, nos sururu e ostras provenientes do sistema estuarino da Baía de Vitória. Essa verificação permitirá avaliar o real risco de consumo de alimentos provenientes de áreas contaminadas por material fecal ou pela exposição ao ambiente contaminado.

Realizar a genotipagem dos vírus entéricos encontrados nas amostras de água, sururus e ostras, visando identificar os genótipos dominantes na região. Compará-los com os vírus isolados de pacientes com gastroenterite de origem viral para confirmação da circulação dos mesmos vírus entre este ambiente e a população da Ilha das Caieiras.

Realizar um monitoramento após a implantação do sistema de esgotamento sanitário que atenderá a região de estudo, a fim de comparar com os resultados obtidos neste trabalho e avaliar a qualidade do tratamento de esgoto nessa região.

9. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS – ANA 2002. Ecossistemas Aquáticos. Disponível em: www.ana.gov.br/pnrh/.../5Textos/6-9EcossistemasAquaticos.pdf
Acesso: 12/11/2010.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA - BRASIL. (ANVISA) Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico princípios gerais para estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I, II e III. Diário Oficial. Brasília, 1 de janeiro de 2001.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia Molecular da Célula*, 3 ed. Artmed. 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, n. 12, p. 498-505, 2001.

ALONSO M. Gastroenteritis por rotavirus. **Archivos Argentinos de Pediatría**; v. 99, p. 483-484, 2001.

ALVES, N. C.; ODORIZZI, A. C.; GOULART, F. C.; Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP. **Revista de Saúde Pública** v. 36, p.749-751, 2002.

ASANAKA, M.; ATMAR, R.L.; RUVOLO, V.; CRAWFORD, S.E.; NEILL, F.H.; ESTES, M.K. Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells. **Proceeding of the Natural Academic of Sciences**, v. 102, p. 10327-10332, 2005.

APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, ed. 19, 1995.

APHA; AWWA; WEF. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, ed. 21, 2005.

ARNOLD, M.M.; PATTON, J.T. Rotavirus Antagonism of the Innate Immune Response. **Viruses**, v. 1, p. 1035-1056, 2009.

ATMAR, R.L.; OPEKUN, A.R.; GILGER, M.A.; ESTES, M.K.; CRAWFORD, S.E.; NEILL, F.H. Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1553-1557, 2008.

ATMAR, R.L.; Noroviruses: State of the Art. **Food and environmental virology**, v. 2, p.117-126, 2010.

BAQUEIRO-CÁRDENAS, R. E.; BORABE, L.; GOLDARACENA-ISLAS, G. C.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, J. Los moluscos y la contaminación. Una revision. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v.78, p1-7, 2007.

BARBOSA, I.B.M. Modernidade e assimetrias na paisagem: a fragmentação de ecossistemas naturais e humanos na Baía noroeste de Vitória – ES. **Dissertação (mestrado)**. Departamento de Estruturas ambientais urbanas / Faculdade de arquitetura e urbanismo da Universidade de São Paulo, 2004.

BARROSO, G.F.; Dias Jr., C. Avaliação preliminar da qualidade da água do Canal da Passagem/manguezal do Lameirão, Vitória – ES. **Anais do VIII Seminário Regional de Ecologia**. UFSCar, São Carlos, p. 221-232, 1997.

BARROSO, Luis Roberto. Saneamento básico: competências constitucionais da União, estados e municípios. **Revista Diálogo Jurídico**, Salvador, CAJ – Centro de Atualização Jurídica, n. 13, abr./maio 2002. Disponível em: <<http://www.direitopublico.com.br>>. Acesso em: 5/12/10.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

BØRRETZEN, P.; SALBU, B. Bioavailability of sediment-associated and low molecular-mass species of radionuclides/trace metals to the mussel *Mytilus edulis*. **Journal of Environmental Radioactivity**, v.100, p.333-341, 2009.

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

BOSCH, A.; GUIX, S.; SANO, D.; PINTO, R.M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 295-301, 2008.

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

BOXMAN, I.L.A. Human Enteric Viruses Occurrence in Shellfish from European Markets. **Food and Environmental Virology**, v .4, p. 605-634, 2010.

BRANCO, J.O; VERANI, J.R. Dinâmica da Alimentação Natural de *Callinectes Danae* Smith (Decapoda, Portunidae) na Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 4, p. 1003-1018, 1997.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente (**CONAMA**). Resolução 274 de 29 de Novembro de 2000. Dispõe sobre a classificação das águas doces, salobras e salinas, em todo o Território Nacional, bem como determina os padrões de lançamento. Diário Oficial, 08 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente (**CONAMA**). Resolução nº 357 de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial, 18 de março de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004 (Federal). Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 (Federal). Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial: 14 de dezembro de 2011.

BURKHARDT, W.; CALCI, K.R. Selective accumulation may account for shellfish associated viral illness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.1375-1378, 2000.

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.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, J. F. JR.; MORENO, P. Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores. In: Lisboa, A.H. & Goulart, E.M.A. (Organizadores). **Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais**. 1 ed. v. 1, p. 556-567, 2005.

CARMO, T.M.S. Os manguezais ao norte da Baía de Vitória, Espírito Santo. **Anais do Simpósio 'Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: Síntese dos conhecimentos'**, v. 2, p. 173-194. Cananéia/SP, 1987.

CARMO, T.M.S; Perrone, E.C.; Fundão, D.N.; Melo, R.M.S.; Zanottixavier, S. Macrofauna de invertebrados do estuário do rio Santa Maria da Vitória, Vitória, ES. **Anais do III Simpósio 'Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: subsídios a um gerenciamento ambiental'**, v. 1, p. 305-314, Serra Negra/SP, 1994.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Updated Norovirus Outbreak Management and Disease Prevention Guidelines. **MMWR**, v. 60, 2011.

CHAUDHRY, Y.; NAYAK, A.; BORDELEAU, M.; TANAKA, J.; PELLETIER, J.; BELSHAM, G.J.; Caliciviruses differ in their functional requirements for eIF4F components. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 25315-25325, 2006.

COELHO, C.; SANTOS, C.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M.; Standardization of RT-PCR and cell culture techniques for hepatitis A virus (HAV) detection in oysters. **Virus Reviews and Research**, v. 4 , p.158, 1999.

CONNER, M.E.; RAMIG, R.F. Viral enteric diseases. In: *Viral Pathogenesis*, ed. by Nal Nathanson et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p.713-743.

CORREIA JUNIOR, Y. Estudo da Variação de parâmetros de qualidade de água em pontos da região do estuário do Rio Santa Maria da Vitória. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. UFES, 2003.

Corrigendum to regulation (EC) nº 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29th April 2004 on the hygiene of foodstuffs. Official Journal of the European Union: 30th April 2004.

Corrigendum to regulation (EC) nº 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29th April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Official Journal of the European Union: 30th April 2004.

Corrigendum to Regulation (EC) nº 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29th April 2004 laying down specific rules for the organization of official

controls on products of animal origin intended for human consumption. Official Journal of the European Union: 30th April 2004.

CROCI, L.; DE MEDICI, D.; SCALFARO, C.; FIORE, A.; DIVIZIA, M.; DONIA, D.; CONSENTINO, A.M.; MORETTI, P.; COSTANTINI, G. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p. 293-298, 2000.

Directive of the European Parliament and of the Council of 21th of April 2004 (2004/41/CE). Official Journal of the European Union.

Directive of the European Parliament and of the Council of 12th of December 2006 laying down harvest water quality (2006/113/CE). Official Journal of the European Union.

DO CARMO, G.M.I.; YEN, C.; CORTES, J.; SIQUEIRA, A.A.; OLIVEIRA, W.K.; CORTEZ-ESCALANTE, J.J.; LOPMAN, B.; FLANNERY, B.; OLIVEIRA, L.H.; CARMO, E. H.; PATEL, M. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Medicine**, v. 8, p. 1-11, 2011.

EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). Produção de Moluscos, 2008. Available on: < <http://www.epagri.rct-sc.br/epagri/index.jsp>>, Florianópolis, SC. Acesso em 5/11/2010.

ESTES, M.K.; KAPIKAN, A.Z.; Rotaviruses. **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia, p.1917–74, 2007.

EUROPEAN UNION - EU 2006, DIRECTIVE 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council concerning the management of bathing water quality. **Official Journal of the European Communities**, p. 37-51, 2006.

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 28/10/ 2009.

FAUCONNEAU, B. Health value and safety quality of aquaculture products. **Revue Médecine Vétérinaire**, v.5, p. 331-336, 2002.

FDA (*Food and Drug Administration*). U. S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Guide for the control of Molluscan Shellfish. National Shellfish Sanitation Program (NSSP), 2003.

FDA (*Food and Drug Administration*). Bacterial and Viral Pathogens of Greatest Concern in Seafood Processing - Public Health Impacts. 2011. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheriesProductsHazardsandControlsGuide/UCM252450.pdf> Acesso em 12/03/12.

FERNANDES, A. J. & PERIA, L. C. S., 1995, "Características do ambiente", In: SCHAEFFER-NOVELLI, Y., Manguezal: Ecosistema entre a Terra e o Mar, **Caribbean Ecological Research**, São Paulo.

FERREIRA, R. D. Os manguezais da Baía de Vitória: um estudo de geografia física integrada. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Departamento de geografia, 1989.

FERREIRA, J.F.; OLIVEIRA-NETO, F.M., 2007. Cultivo de Moluscos em Santa Catarina. Disponível em < <http://www.cca.ufsc.br/~jff/disciplinas/cultivodemoluscos/pdf/Cultivo%20de%20Moluscos%20em%20Santa%20Catarina%202006.pdf> > Acesso: 27/08/10.

FIELDS B.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds). ADENOVIRUSES. In: *Virology*, v.2 , p. 2149-2171. Lippincott-Raven, 5 ed., Philadelphia, USA, 2007.

FONG, T.T.; LIPP, E.K.; Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. **Microbiology and molecular biology reviews**, v.69, p. 357–371, 2005.

FUMIAN, T. M.; LEITE, J.P.G.; CASTELLO, A.A.; GAGGERO, A.; CAILLOU, M.S.; MIAGOSTOVICH, M.P. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **Journal of Virological Methods**, v.170, p. 42–46, 2010.

GALVÃO, P.M.A; REBELO, M.F.; GUIMARÃES, J.R.D.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v 13, p.59-66, 2009.

GEO BRASIL. Ambientes Marinhos e Costeiros. In: Perspectivas do meio Ambiente no Brasil / Thereza Christina Carvalho Santos; João Batista Drummond Câmara. Ambi Brasília: Edições IBAMA, 2002.

GERBA, C.P.; ROSE, J.B.; HAAS, C.N.; CRABTREE, K.D. Waterborne rotavirus: a risk assessment. **Water Research**, v.30, p.2929-2940, 1996.

GIRONES, R. Tracking viruses that contaminate environments. **Microbe**, v.1, p. 19-25, 2006.

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

GONZÁLEZ-LOSA, M.R.; MARÍN, G.G.P.; CABRERA, L.M.; SOLÍS, M.P. Acute Gastroenteritis Associated with Rotavirus in Adults. **Archives of Medical Research**, v. 32, p.164-167, 2001.

HAFLIGER, D.; GILGEN, M.; LUTHY, J.; HUBNER, P. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 27-36, 1997.

HALLER, L.; POTÉ, J.; LOIZEAU, J.; WILDI, W. Distribution and survival of fecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, lake Geneva, Switzerland. **Ecological Indicators**, v. 9, p. 540-547, 2009.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; STANG, A.; SURE, K.; UBERLA, K.; WILHELM, M. Detection of human viruses in rivers of a densely populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, v. 43, p. 2657-2668, 2009.

HARRIS, J. P.; EDMUNDS, W. J.; PEBODY, R.; BROWN, D. W.; LOPMAN, B. A. Deaths from Norovirus among the Elderly, England and Wales. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1020- 1027, 2008.

HARAMOTO, E.; KITAJIMA, M.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. **Water research**, v. 44, p.1747-1752, 2010.

HE, L.; HE, Z. Water quality prediction of marine recreational beaches receiving watershed baseflow and stormwater runoff in southern California, USA. **Water Research**, v. 42, p. 2563-2573, 2008.

HEJKAL, T. W. & C. P. GERBA. Uptake and survival of enteric viruses in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p.207-211, 1981.

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 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.

HO, B.S.W.; TAM, T.Y. Natural depuration of shellfish for human consumption: a note of caution. **Water Research**, v. 34, p. 1401-1406, 2000.

HOEBE, C. J.; VENNEMA, H.; HUSMAN, A. M.; & DUYNHOVEN, Y. T. Norovirus Outbreak among Primary Schoolchildren Who Had Played in a Recreational Water Fountain. **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, p.699-705, 2004.

HORWITZ, M.S.; Adenoviruses. In: **Virology**, v.2, p. 2149-2171, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico de 2008, p. 40, Rio de Janeiro, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS). Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Fiocruz, Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758.

Acesso em 14/08/11.

INTERNATIONAL STANDART (ISO 16140). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. 1^o ed., 2003.

ITURRIZA-GOMARA, M.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G.; DESSLBERGER, U.; GRAY, J. J. Comparison of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 93-103, 1999.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, p.711. 2005.

JAYARAM, H.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Research**, v. 101, p. 67-81, 2004.

JENG, H. A. C.; ENGLANDE, A. J.; BAKEER, R. M.; BRADFORD, H. B. Impacto of urban stormwater runoff on estuarine environmental quality. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 63, p. 513-526, 2005.

JESUS, H.C.; COSTA, E.A.; MENDONÇA, A.S.F.; ZANDONADE, E. Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da ilha de Vitória-ES. **Química Nova**, v. 27, p. 378-386, 2004.

JESUS, H.C., AMORIM, N.R.; ALONSO, M.K. Investigação da poluição da Baía de Vitória-ES através da análise de metais, colimetria e agrotóxicos em sururu de mangue (*Mytella guyanensis*). XLVI Congresso Brasileiro de Química, 2006.

JUSTINO, J. F.; **Dissertação de mestrado**. Avaliação de coliformes e vírus entéricos na água e no mexilhão (*Mytella guyanensis*) em área de manguezal da Baía de Vitória (ES). Vitória, 2009.

KAGEYAMA, T.; KOJIMA, S.; SHINOHARA, M.; UCHIDA, K.; FUKUSHI, S.; HOSHINO, F. B. 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.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: Knipe D.M.; Howley P.M.; Griffin, D.E., editors. **Fields Virology**, 4 th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 1787-1833.

KARAMOKO, Y.; Ibenyassine, K.; Aitmhand, R.; Idaomar, M., Ennaji, M.M. Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region) by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 126 p. 135-137, 2005.

KARST, S. M.; Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. **Viruses**, v. 2, p. 748-781, 2010;

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1033-1039, 2002.

KAY, D., KERSHAW, S., LEE, R., et al. Results on Field investigations into the impact of intermittent sewage discharges on the microbiological quality of wild mussels (*Mytilus edulis*) in a tidal estuary. **Water Research**, v. 42, p. 3033-3046, 2008.

KJERFVE, B. & LACERDA, L. D. "Mangroves of Brazil", Conservation and Sustainable Utilization of Mangrove Forests in Latin America and Africa Regions, Part I – Latin America, **International Society for Mangrove Ecosystems**, Japan, 1993.

KOOPMANS, M.; DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p. 23-41, 2004.

KOU, X.; WU, Q.; WANG, D.; ZHANG, J. Simultaneous detection of norovirus and rotavirus in oysters by multiplex RT-PCR. **Food Control**, v. 19, p.722-726, 2008.

KOZYRA, I.; KAUPKE, A.; RZE_ZUTKA, A.; Seasonal Occurrence of Human Enteric Viruses in River Water Samples Collected from Rural Areas of South-East Poland. **Food Environmental Virology**, v 3, p.115–120, 2011.

LANDGRAF, M. Microrganismos Indicadores. In: **Microbiologia de Alimentos**. Franco, B.D.G.M. & Landgraf, M. (organizadores). SP, p.142. 2005.

LAZZARINI, M. O saneamento e os consumidores. In: BRASIL. Presidência da República. Secretaria Especial de Desenvolvimento Urbano – SEDU/PR. Programa de Modernização do Setor Saneamento – PMSS. **O pensamento do setor saneamento no Brasil: perspectivas futuras**. Brasília, 2002.

LEES, D. Viruses and Bivalve Shellfish. **International Journal of food Microbiology**, v. 59, p. 81-116, 2000.

LE GUYADER, F.; HAUGARREAU, L.; MIOSSEC, L.; DUBOIS, E.; POMMEPUY, M. Three-Year Study To Assess Human Enteric Viruses in Shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3241-3248, 2000.

LE GUYADER, F.; LE SAUX, J.C.; AMBERT-BALAY, K.; KROL, J.; SERAIS, O.; PARNAUDEAU, S.; GIRAUDON, H.; DELMAS, G.; POMMEPUY, M.; POTHIER, P.; ATMAR, R.L. 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, L. R. Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 618–624, 2009.

LENOCH, R. Saúde Pública e Moluscos Marinhos Cultivados. **Gerenciamento Costeiro Integrado**, UNIVALI, Itajai/SC, v. 3, p. 15 - 17, 2004.

LEWIS, G. D.; METCALF, T. G. P. 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.

LOPMAN, B.A.; REACHER, M.H.; VAN DUIJNHOFEN, Y.; HANON, F.X.; BROWN, D.; KOOPMANS, M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. **Emergence Infect Diseases**, v. 9, p. 90-96, 2003.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1145-1156, 2001.

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

MATTNER, F.; SOHR, D.; HEIM, A.; GASTMEIER, P.; VENNEMA, H.; KOOPMANS, M. Risk groups for clinical complications of norovirus infections: an outbreak investigation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 69-74, 2006.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, M.S.; ATTOUI, H.; BANYAI, K.; BRISTER, J.R.; BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GOMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, M.F.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J.T.; DESSELBERGER, U.; RANST, M.V. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, v.156, p.1397-1413, 2011.

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

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

METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. **Annual Reviews Microbiology**, v.49, p.461-487, 1995.

MIAGOSTOVICH, M. P.; FERREIRA, F. F. M.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S. L. B.; SILVA, L. A.; LEITE, J. P. G. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, Central Amazônia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 375-382, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. 2006. Indicadores de Mortalidade. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2006/c07.def> . Acesso: 24/04/09.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA), 2007. Recursos hídricos e ambiente urbano. Disponível em <http://www.mma.gov.br>. Acesso: 27/08/10

MIOTTO, L. N.; Coliformes termotolerantes e *enterococcus* em ostras e águas salinas utilizadas para cultivo de moluscos bivalves da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina - Brasil, **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. UFSC. 2009.

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**, v. 64 p.40-48, 2012.

MULLENDORE, J. L.; Sobsey, M. D.; Shieeh, Y. S. C.; Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. **Journal of Virological Methods**, v. 94, p.25-35, 2001.

MUNIAN-MUJIKI, I.; GIRONES, R.; LUCENA, F. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 89, p. 109-118, 2000.

MURCHIE, L. W.; CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J. P.; LINTON, M.; PATTERSON, M. F.; SMIDDY, M. High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.3, p.257-270, 2005.

MUSCILLO, M.; POURSHABAN, M.; IACONELLI, M.; FONTANA, S.; DI GRAZIA, A.; MANZARA, S.; FADDA, G.; SANTANGELO, R.; LA ROSA, G. Detection and Quantification of Human Adenoviruses in Surface Waters by Nested PCR, TaqMan Real-Time PCR and Cell Culture Assays. **Water, Air & Soil Pollution**, v.191, p.83-93, 2008.

NAKAGOMI, T.; CUEVAS, L.E.; GURGEL, R.G.; ELROKHSI, S.H.; BELKHIR, Y.A.; ABUGALIA, M.; DOVE, W.; MONTENEGRO, F.M.U.; CORREIA, J.B.; NAKAGOMI,

O.; CUNLIFFE, N.A.; HART, C.A. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. **Archives of Virology**, v.153, p591–593, 2008.

NENONEN, N.; Hannoun, C.; Horal, P. Hernroth, B.; Bergstrom, T. Tracing of norovirus outbreak strains in mussels collected near sewage effluents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2544-2549, 2008.

NISHIDA, T.; H.; SAITOH, M.; SHINOHARA, M.; KATO, M.; FUKUDA, S.; MUNEMURA, T.; MIKAMI, T.; KAWAMOTO, A.; AKIYAMA, M.; KATO, Y.; NISHI, K.; KOZAWA, K.; NISHIO, O. Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5782–5786, 2003.

OLIVEIRA, J.; CUNHA, A.; CASTILHO, F.; ROMALDE, J.L.; PEREIRA, M.J. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. **Food Control**, v.22, p.805-816, 2011.

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.

PREFEITURA MUNICIPAL DE VITÓRIA (PMV), 2009. Sabor e Tradição. Disponível em: <http://www.vitoria.es.gov.br/turismo.php?pagina=saboretradicao>. Acesso: 27/08/10

PHANUWAN, C.; TAKIZAWA, S.; OGUMA, K.; KATAYAMA, H.; YUNIKA, A.; OHGAKI, S. Monitoring of human enteric viruses and coliform bacteria in waters after urban flood in Jakarta, Indonesia. **Water Science & Technology**, v. 54, p. 203-210, 2006.

PINA, S.; MONTSERRAT, P.; 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.

PITTA, M.S. Tendência actual del estreptococo como indicador de contaminação fecal. **Revista Cubana Higiene y Epidemiología**, v.1, p.38-43, 2002.

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. In: **Oceans and Heath: Pathogens in the Marine Environment**, p. 331-359, 2006.

RIBEIRO, E. N. Avaliação de indicadores microbianos de balneabilidade em ambientes costeiros de Vitória/ES. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. UFES, 2002.

RIBEIRO, L. R., GIUBERTI, R. S., BARREIRA, D., SAICK, K. W., LEITE, J., MIAGOSTOVICH, M. P. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, p.201-206, 2008.

RICHARDS, G. P. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 218-251, 1988.

RIGO, D. Análise do escoamento em regiões estuarinas com manguezais – medições e modelagem na Baía de Vitória, ES. **Tese: Doutorado**. Departamento de Engenharia Oceânica/Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

RIGOTTO, C.; SINCERO, T.C.M.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Proposal for the use of adenoviruses as bioindicators for human viral contamination in cultivated oysters. **Virus Reviews and Research**, v.8, p.101, 2003.

RIGOTTO, C.; VICTORIA, M.; MORESCO, V.; KOLESNIKOVAS, K.C.; CORRÊA, A.A.; SOUZA, D.S.M.; MIAGOSTOVICH, M.P.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Assessment of adenovirus, hepatitis A virus and rotavirus presence in environmental

samples in Florianopolis, South Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1979–1987, 2010.

RIOU, P.; LESAUX, J.C.; DUMAS, F.; CAPRAIS, M.P.; LEGUYADER, S.F.; POMMEMPUY, M. Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas. **Water Research**, v.41, p.2774-2786, 2007.

ROBERTSON, L.J. The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 201-216, 2007.

ROCKX, B.; WIT, M. D.; VENNEMA, H.; VINJE, J.; KOOPMANS, M. Natural History of Human Calicivirus Infection: A Prospective Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 246-253, 2002.

ROHAYEM, J.; ROBEL, I.; JAGER, K.; SCHEFFLER, U.; RUDOLPH, W. Protein-primed and de novo initiation of RNA synthesis by Norovirus 3D. **Journal of Virology**, v. 80, p. 7060-7069, 2006.

ROMALDE, J. L.; AREA, E.; SÁNCHEZ, G.; RIBAO, C.; TORRADO, I.; ABAD, X. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 119-130, 2002.

SÁ, H.S. Caracterização da fauna de crustáceos (crustacea) do manguezal de Cariacica, Espírito Santo, Brasil. **Caderno de Pesquisa da UFES**, v. 9, p. 15-26, 1995.

SAIKI, R.K. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SANTOS, C.S.; RIGOTTO, C.; COELHO, C.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Semi-nested RT-PCR and cell culture for rotavirus detection in artificially seeded oyster meat. **Virus Reviews and Research**, v. 4, p.158, 1999.

SAPKOTA, A.; SAPKOTA, A.R.; KUCHARSKI, M.; BURKE, J.; MCKENZIE, S.; WALKER P.; *et al.* Aquaculture practices and potencial human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v. 34, p. 1215-1226, 2008.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezais brasileiros: Região sudeste-sul. **Anais do Simpósio sobre Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: síntese dos conhecimentos**, p. 78-79, Cananéia/SP, 1987.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal - Ecossistema entre a Terra e o Mar. **Caribbean Ecological Research**, p.63, 1995.

SCHRIEWER, A.; WEHLMANN, A.; WUERTZ, S.; Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p.16-21, 2011.

SCHULTZ, A.C.; SAADBYE, P.; HOORFAR, J.; NØRRUNG, B. Comparison of methods for detection of norovirus in oysters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 352-356, 2007.

SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA – SEAP/PR/2007 – Programa Nacional de Controle Higiênico-sanitário de Moluscos Bivalves. Disponível em: [http://200.198.202.145/seap/didaq/html2/prog_nac_controle_higienico\(Moluscos Bivalves\).html](http://200.198.202.145/seap/didaq/html2/prog_nac_controle_higienico(Moluscos Bivalves).html). Acesso em 23/11/09.

SEIDEL, K. M.; SAGAR M. G.; RAO, V. C.; MELNICK, J. L. Concentration of Rotavirus and Enteroviruses from Blue Crabs (*Callinectes sapidus*) **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 1293-1296, 1983.

SERRACCA, L.; VERANI, M.; BATTISTINI, R.; ROSSINI, I.; CARDUCCI, A.; ERCOLINI, C. Evaluation of Adenovirus and *E. coli* as indicators for human enteric viruses presence in mussels produced in La Spezia Gulf (Italy). **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p.462–467, 2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Boletim eletrônico epidemiológico. Doenças transmitidas por alimentos. N. 6, 2005. Disponível em www.saude.gov.br/svs.

SHENK, T.; Adenoviridae: The viruses and their replication. In: **Virology**, v.2, p. 2265-2300, 2001.

SIQUEIRA-SILVA, J. Estudo da interação de adenovírus humano, sorotipo 41 (HadV 41), com células permissivas (**Tese de Doutorado**). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008

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

SOLER, M.; LOBOS, S.; LORCA, M.; NAVARRETE, E. Enterovirus in Valparaiso natural water resources: a methodological proposal for its analysis. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 44, p. 511-516, 2009.

SOUZA, E. M. Avaliação da contaminação por metais pesados (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) no manguezal do rio Santa Maria da Vitória, Grande Vitória/ES, utilizando *Crassostrea rhizophorae* (Guildins, 1828) e *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) como biomonitores. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, 2002.

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**, v.76, p.153-161, 2012.

STEWART, P.L.; FULLER, S.D.; BURNET, R.M. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. **Embo J**, v. 12, p.2589-2599, 1993.

STULTS, J.R.; SNOEYENBOS-WEST, O.; METHE, B.; LOVLEY, D.R.; CHANDLER, D.P. Application of the 5' Fluorogenic Exonuclease Assay (TaqMan) for Quantitative Ribosomal DNA and rRNA Analysis in Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 2781–2789, 2001.

TAN, M., & JIANG, X. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. **Trends in Microbiology**, v.13, p. 1000-1016, 2005.

TAVARES, T.M; CARDOSO, D.D.P.; BRITO, W.M.E.D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical**. v. 34, p. 85-104, 2005.

TEUNIS, P. F.; MOE, C. L.; LIU, P.; MILLER, S. E.; LINDESMITH, L.; BARIC, R. S.; Norwalk Virus: How Infectious is it? **Journal of Medical Virology**, v. 80, p.1468-1476, 2008.

TRAORE, O.; ARNAL, C.; MIGNOTTE, B.; MAUL, A.; LAVERAN, H.; BILLAUDEL, S.; SCHWARTZBROD, L. Reverse Transcriptase PCR Detection of Astrovirus, Hepatitis A Virus, and Poliovirus in Experimentally Contaminated Mussels: Comparison of Several Extraction and Concentration Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p. 3118-3122, 1998.

TROEGER, H.; LODDENKEMPER, C.; SCHNEIDER, T.; SCHREIER, E.; EPPLE, H.; ZEITZ, M. Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection. **Gut**, v. 58, p. 1070-1077, 2009.

UEKI, Y.; SANO, D.; WATANABE, T.; AKIYAMA, K.; OMURA, T. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. **Water Research**, v. 39, p. 4271-4280, 2005.

UMESHA, K. R.; BHAVANI, N.C.; VENUGOPAL, N.M.; KARUNASAGAR, I. KROHNE, G.; KARUNASAGAR, I. Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 279-286, 2008.

UNEP. Guidance for a global monitoring programme for persistent organic Pollutants. Inter- Organization programme for the sound management of chemicals. Geneva, Switzerland, 2004.

VAN HEERDEN, J.; EHLERS, M. M.; HEIM, A.; GRABOW, W. O. 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.

VILARIÑO, L.M.; LE GUYADER, S.F.; POLO, D.; SCHAEFFER, J.; KRÖL,J.; ROMALDE, L.J. Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve mollusks. **International Microbiology**, v.12, p.145-151, 2009.

WANG, D.; WU, Q.; KOU, X.; YAO, L.; ZHANG, J. Distribution of norovirus in oyster tissues. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1966–1972, 2008.

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

WIDDOWSON, M.; SULKA, A.; BULENS, S. N.; BEARD, R. S.; CHAVES, S. S.; HAMMOND, R. Norovirus and Foodborne Disease, United States, 1991–2000. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 95-102, 2005.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.3741–3751, 1997.

WOLD, W.S.M.; HORWITZ, M.S.; 2007. Adenoviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. 627 (Eds.), *Fields Virology*, 7^o ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 628, p. 2395–2436.

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

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

YILMAZ, H.; BOSTAN, K.; TURAN, N.; MURATOGLU, K.; YILMAZ, A.; OZKUL, A.; KOCAZEYBEK, B.; HELPS, C. Real-Time PCR Detection of Norovirus in Mussels Collected from the Bosphorus in Istanbul, Turkey.

YOKOYA, N. S., 1995, "Distribuição e origem", In: SCHAEFFER-NOVELLI, Y., Manguezal: Ecosistema entre a Terra e o Mar, **Caribbean Ecological Research**, São Paulo.

YU JIN; WEI-XIA, C.; XUE-MEI, Y.; MIAO, J.; QING, Z.; ZI-QIAN, X.; JIE-MEI, Y.; LIN, Z.; SU-HUA, Y.; NA LIU; SHU-XIAN, C.; ZHAO-YIN, F.; ZHAO-JUN, D.; Short communication: Viral agents associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Lanzhou, China. **Journal of Clinical Virology**. v. 44, p.238–241, 2009.

ZENG, S.Q.; HALKOSALOA, A.; SALMINENA, M.; SZAKALA, E.D.; PUUSTINENA, L.; VESIKARIA, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of Virological Methods**, v.153, p. 238–240, 2008.

ZHENG, D.; ANDO, T.; FANKHAUSER, R. L.; BEARD, S.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S.; Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, v. 346, p.312-323, 2006.

ANEXO 1**CÁLCULO PARA OBTENÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS/G DE BIVALVES**

10 Gramas da porção gastrointestinal



3500 microlitros

(Eluído total)



400 microlitros

(Utilizado para extração)



30 microlitros

(Resultado da extração)



5 microlitros

(para síntese cDNA)



25 microlitros

(cDNA obtido)



5 microlitros

(reação qPCR)



X NÚMEROS DE CÓPIAS GENÔMICAS/ REAÇÃO

ENTÃO: Exemplo, obtenção de 10 cópias genômicas/reação

10 cópias – 5 microlitros cDNA

X – 25 microlitros cDNA

x 5

X= 50 cópias genômicas/ 25 microlitros cDNA

25 microlitros cDNA = 5 microlitros da extração ácidos nucléicos

50 cópias genômicas – 5 microlitros extração ácidos nucléicos

Y – 30 microlitros da extração ácidos nucléicos $\times 6$

Y = 300 cópias genômicas/ 30 microlitros da extração ácidos nucléicos

30 microlitros da extração ácidos nucléicos = 400 microlitros de eluído inicial

300 cópias genômicas – 400 microlitros de eluído inicial

Z – 3500 microlitros de eluído total $\times 8,75$

Z = 2625 cópias genômicas/3500 microlitros de eluído total

3500 microlitros de eluído total = 10g de porção gastrointestinal

2625 cópias genômicas – 10g de porção gastrointestinal

W – 1g de porção gastrointestinal

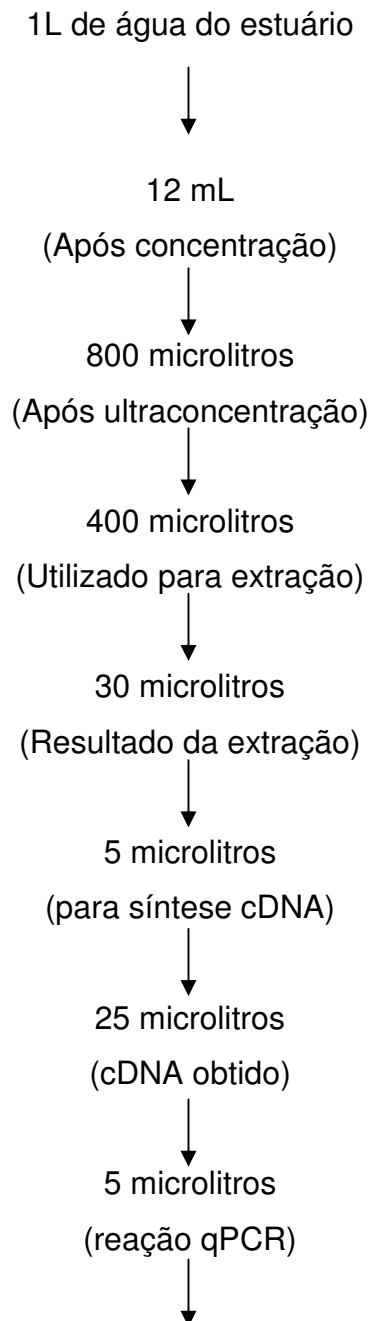
W = 262,5 Cópias genômicas/g de marisco

K = constante (5 x 6 x 8,75 = 262,5)

X= número de cópias genômicas por ciclo

N= número de cópias genômicas/g de tecido de molusco

$$N=(X * K)/10$$

ANEXO 2**CÁLCULO PARA OBTENÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS/100 mL DE ÁGUA DO ESTUÁRIO**

X NÚMEROS DE CÓPIAS GENÔMICAS/ REAÇÃO

ENTÃO: Exemplo, obtenção de 10 cópias genômicas/reação

$$\begin{array}{r} 10 \text{ cópias} - 5 \text{ microlitros cDNA} \\ X \quad - 25 \text{ microlitros cDNA} \end{array} \quad \times 5$$

$$X = 50 \text{ cópias genômicas} / 25 \text{ microlitros cDNA}$$

25 microlitros cDNA = 5 microlitros da extração ácidos nucléicos

$$\begin{array}{r} 50 \text{ cópias genômicas} - 5 \text{ microlitros extração ácidos nucléicos} \\ Y \quad - 30 \text{ microlitros da extração ácidos nucléicos} \end{array} \quad \times 6$$

$$Y = 300 \text{ cópias genômicas} / 30 \text{ microlitros da extração ácidos nucléicos}$$

30 microlitros da extração ácidos nucléicos = 400 microlitros do ultraconcentrado

$$\begin{array}{r} 300 \text{ cópias genômicas} - 400 \text{ microlitros do ultraconcentrado} \\ Z \quad - 800 \text{ microlitros do ultraconcentrado total} \end{array} \quad \times 2,0$$

$$Z = 600 \text{ cópias genômicas} / 800 \text{ do ultraconcentrado total}$$

800 do ultraconcentrado total equivalem a 12 mL do volume concentrado

12 mL do volume concentrado equivalem a 1L (1000 mL).

Para obtenção do resultado em 100 mL, dividi-se o número de cópias obtidos por 10.

$$\begin{array}{r} 600 \text{ cópias genômicas} - 1000 \text{ mL} \\ W \quad - 100 \text{ mL de água do estuário} \end{array} \quad \times 1/10$$

$$W = 60 \text{ Cópias genômicas} / 100 \text{ mL de água do estuário}$$

$$K = \text{constante} (5 \times 6 \times 2 = 60)$$

X= número de cópias genômicas por ciclo

N= número de cópias genômicas/g de tecido de molusco

$$N = (X * K) / 10$$

