LUIZ CARLOS VIEIRA

**DETECÇÃO DE CALICIVÍRUS HUMANO
(SMALL ROUND STRUCTURED VIRUS - SRSV)
PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
(PCR) EM OSTRAS DO LITORAL DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia .

Área de Concentração:
Microbiologia

Orientador :
Prof. Dr. Klaus Eberhard Stewien

São Paulo
1999

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Vieira, Luiz Carlos.

Detecção de calicivírus humano (small round structured virus – SRSV) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em ostras do Litoral do Estado de São Paulo / Luiz Carlos Vieira. -- São Paulo, 1999.

Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia.

Linha de pesquisa: Virologia clínica e molecular.

Orientador: Stewien, Klaus Eberhard.

Versão do título para o inglês: Detection of human calicivirus (Small round structured virus – SRSV) using polymerase chain reaction (PCR) in oysters from São Paulo beaches, Brazil.

Descritores: 1. Caliciviridae 2. Calicivírus humano 3. Reação em cadeia por polimerase 4. Vírus Norwalk 5. Ostras 6. São Paulo, SP

ICB/SBIB/032/99

Candidato(a): Luiz Carlos Vieira.

Título da Dissertação: Detecção de calicivírus humano (small round structured virus – SRSV) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em ostras do Litoral do Estado de São Paulo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a 28/6/99, considerou o(a) candidato(a):

(☒) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

1) Examinador(a)

2) Examinador(a)

3) Presidente

Aos meus pais

Laius Fernandes Vieira e Zelia Gonzaga Vieira

Aos meus irmãos Paulo Flávio e Maria Rosa

A minha esposa Maria Aparecida

A Deus

A G R A D E C I M E N T O S

- . Ao Prof. Dr. Klaus E. Stewien , meu orientador pelo incentivo e apoio ao pleno desenvolvimento desta pesquisa .
- . Ao Prof. Dr. Edison L. Durigon pela amizade , consideração , estima e apreço, além da disponibilidade aos recursos materiais e utilização de todos os aparelhos e setores do Laboratório de Virologia Molecular, do Depto. de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
- . Ao Prof. Dr. Sebastião Timo laria pelo grande interesse transmitido no início do projeto, acesso as primeiras referências e ao uso das aparelhagens em seu laboratório.
- . A Prof.^a Dr.^a Vivian H. Pellizari e Dr.^a Irma N. G. Rivera , a Dna. Rosa de Carvalho e colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental , pela constante amizade e disposição em esclarecer dúvidas, e disponibilidade na utilização de aparelhos e eventuais produtos.
- . Aos Professores e colegas do Setor de Genética , pela amizade e concessão de uso das dependências e aparelhagens .
- . Ao Prof. Dr. Armando M. Ventura pela disposição constante em ensinar nos momentos mais difíceis , e aos colegas Luiz Fernando Zerbini e Aufra Araujo pelo interesse complementar , que também foi decisivo para a concretização da metodologia .
- . A Prof.^a Dr.^a Claudete Rodrigues Paula , que não obstante a grande amizade, contribuiu mais uma vez, com a concessão eventual de reagentes e aparelhagem do Setor de Micologia , que foram fundamentais ao bom andamento dos procedimentos .
- . Aos Prof. Dr. Valderez Gambale, Prof. Dr. Benedito Correa , ao Sr. Tadeu Barbosa e demais técnicos , aos colegas , Rinaldo , Alexandre , Claudia , Tatiana e demais alunos do Setor de Micologia por igual consideração .
- . Aos colegas do Instituto Adolfo Lutz - Setor Virologia , pelo amplo auxílio teórico e prático, a Keico , a Maria Isabel , a Dr.^a Hatune Tanaka , ao Sr. Jonas J. Kisielius e Dr.^a Marli Ueda, que além do incentivo e amizade, contribuíram com parte dessa pesquisa , na Seção de Microscopia Eletrônica .

- . Aos colegas da Virologia no Curso de Pós-Graduação, ao Pedro pela amizade e determinação em auxiliar nas horas decisivas, ao Cesar por sua disposição em transmitir seus conhecimentos. Ao Gilvan, a Rosana e a Marina pela constante amizade e orientações em muitos momentos. A Viviane, a Vanessa, a Adélia, a Maria Angela e Rosângela. Aos técnicos Sr. Carlos A. Silva e Sr. José Lopes. A Dna. Antonia Rodrigues e Dna. Elaine dos Santos, meus agradecimentos pelo preparo dos materiais e vidrarias necessários.
- . Aos Professores da Virologia, Dr.^a Dolores U. Mehnert, Dr.^a Maria Lucia B. O. Rácz, Dr. José Antonio Jerez, pela amizade, incentivo e contribuições teórico-práticas que foram de grande valia. Ao Dr. João Candeias, ao seu apreço, por poder seguir parte de sua trajetória de pesquisa.
- . As colegas do Curso de Pós-Graduação, a Dra. Rosa Maria Piatti, a Dra. Teresa Cristina C. Silva, a Elaine Cides, a Flávia Thiers, a Norma P. Cavalheiro.
- . Aos Professores examinadores do Exame de Qualificação, Dr. Leonardo J. Richtzenhain, Dr. João Renato R. Pinho, e Dr. Edison L. Durigon, pelas preciosas contribuições.
- . Ao Prof. Dr. Tamie Ando (CDC - USA) pelo interesse e concessão dos materiais básicos dessa pesquisa, como controles, iniciadores e sondas moleculares.
- . Ao Prof. Dr. Osmar Domaneschi, pelas contribuições teórico-práticas e dedicação no meu breve estágio, no Laboratório de Malacologia do Instituto de Biociências da USP, onde cursei a Graduação.
- . A Dna. Carmelina de Fábio e Dna. Marily A. Graeber pela revisão bibliográfica. Ao Sr. Sílvio Costa e demais colaboradores da Biblioteca do ICB - USP, pela constante amizade e facilidade de acesso ao acervo.
- . Aos funcionários da Secretaria Geral de Pós-Graduação e da Secretaria do Depto. de Microbiologia do ICB - USP. Ao Sr. Carlos e a Srta. Nancy pelo auxílio na área da computação.
- . Aos Prof. Dr. Carlos Almeida Santa Rosa (*in memoriam*), Prof. Dr. Waldemar Francisco e Prof. Dr. Celeste Fava Netto, superiores que acompanharam meus primeiros passos na área de pesquisa, nesse Instituto.

Resumo

Vírus causadores de gastroenterite, descritos como pequenos vírus de estrutura arredondada (Small Round Structured Viruses-SRSV), foram detectados em extratos de ostras *Crassostrea spp.*, coletadas em regiões distintas do litoral do Estado de São Paulo, utilizando a Reação em Cadeia por Polimerase com transcrição reversa (RT-PCR). Treze lotes de amostras, contendo 10 g de estômagos e divertículos, foram processados para extração e concentração das partículas virais, mediante adsorção-eluição e precipitação por polietilenoglicol (PEG 6000), e purificação com fluorocarbono (Freon, Dupont Co.) para eliminação prévia dos inibidores da reação de RT-PCR. A extração do ácido nucleico viral, foi realizada com uma mistura de isotiocianato de guanidina e fenol (TRIzol®, Gibco) e clorofórmio, sendo completada com uma purificação em coluna *spin*, com membrana de polissulfona (Millipore, Corp.). A reação de RT-PCR foi realizada em uma única etapa, utilizando o kit “*Super Script ONE-STEP RT-PCR System*”® (Gibco). A reação de amplificação enzimática revelou, por eletroforese em gel de agarose (2%), corada com brometo de etídio, produtos de 123 bp, em 3 (23%) dos 13 lotes de amostras coletadas durante o verão de 1998, sendo verificadas em uma delas por imunomicroscopia eletrônica (IME), partículas de SRSV. Os produtos encontrados pertencem ao grupo genômico G2 (Snow Mountain e outros vírus). A aplicação deste método possibilitou pela 1ª vez a detecção molecular de SRSVs no Brasil em ostras naturalmente contaminadas.

Sumário

- Introdução

Dados Históricos	pág. 01
A Contaminação viral no meio aquático e nos moluscos bivalves “	06
A persistência da presença viral nos bivalves	“ 11
Processos de descontaminação	“ 12
Métodos de extração e concentração de vírus entéricos em ostras “	14
Propriedades gerais dos vírus do grupo Norwalk (SRSVs).....	“ 16
Classificação	“ 16
Morfologia e estrutura	“ 17
Organização genômica e replicação	“ 19
Variações antigênicas	“ 23
Variações genotípicas	“ 24
Propriedades Biológicas	“ 27
Vias de transmissão.....	“ 28
Distribuição geográfica	“ 30
Patogenicidade	“ 32
Períodos de incubação e Sintomatologia	“ 32
Patogenia	“ 33
Testes Diagnósticos	“ 35
Métodos Diretos	“ 35

Métodos Indiretos	pag. 37
Métodos Moleculares	“ 38
Detecção do Ácido Nucléico	“ 38
• Objetivos	“ 41
• Materiais e Métodos	“ 42
Reagentes e Soluções	“ 60
• Resultados	“ 69
• Discussão	“ 71
• Conclusões	“ 79
• Referências Bibliográficas	“ 80
Anexos	

1 . INTRODUÇÃO

A presença de partículas virais na água marinha resulta por bilhões de litros de efluentes despejados diariamente nas águas costeiras em todo o mundo, somados às águas superficiais poluídas que chegam diretamente em áreas de estuários de diversas costas marinhas.

Esses fatores tornam evidentes os riscos de saúde associados ao consumo de moluscos bivalves "in natura" ou pouco cozidos , como ostras e mariscos. Ostras são organismos marinhos que se alimentam por um processo de filtração da água, ingerindo partículas para o interior do seu trato digestivo, por meio da geração de uma corrente inicial nos tecidos ciliares de seus palpos labiais (Melnick et al., 1984).

As partículas em suspensão podem reter microrganismos entre os quais vírus entéricos , que podem ser agentes causadores de surtos de gastroenterites. De acordo com Appleton et al., (1981) os moluscos bivalves são considerados um dos principais veículos de transmissão de pequenos vírus de estrutura arredondada ou " Small Round Structured Viruses " (SRSVs).

1.1. Dados Históricos

O primeiro representante do grupo dos SRSVs foi observado por Kapikian et al., (1972) em análises de imunomicroscopia eletrônica (IME) de suspensões fecais de

voluntários que tinham sido administrados por via oral , com filtrados de outras suspensões isentas de bactérias , originárias de um surto de gastroenterite ocorrido na cidade de Norwalk, Ohio, U.S.A. , em 1968, e descrito por Adler & Zickl, (1969) .

O estudo com a IME revelou partículas com 27 nm de diâmetro , que foram consideradas como os primeiros vírus detectados e identificados associados a quadros clínicos de gastroenterites (Kapikian et al., 1996). O vírus Norwalk (NV) tornou-se o protótipo do grupo dos SRSVs, denominados desta forma por Caul & Appleton, (1982) baseados em seu aspecto na microscopia eletrônica , com uma superfície amorfa e um contorno pouco definido , carecendo de uma simetria geométrica .

A primeira citação de surto de gastroenterite epidêmica ocasionado por SRSVs , em que os mesmos foram comparados morfológicamente ao vírus Norwalk , ocorreu na Inglaterra entre consumidores de mariscos (Appleton & Pereira, 1977). Outros vírus relacionados ao NV foram descritos em um outro surto semelhante , que envolveu mais de 2.000 casos , na Austrália (Murphy et al., 1979; Grohmann et al., 1980).

Nos Estados Unidos ocorreram surtos semelhantes em 1980, entre consumidores de ostras provenientes da Costa da Flórida (Gunn et al., 1982) . Dados entre 1981 e 1985 revelaram um aumento de casos de gastroenterite viral nesse período (Guzewich & Morse, 1986; Morse et al., 1986 ; Gerba, 1988) . Gill et al., (1983) estabeleceram uma investigação epidemiológica , para determinar a associação de um quadro clínico de diarreias com vômitos entre pessoas que consumiram ostras, analisando suspensões fecais na microscopia eletrônica e encontrando partículas semelhantes aos SRSVs. As ostras que iam ser

consumidas , foram previamente submetidas a um processo de depuração por 72 horas, em um sistema de circuito aberto , com circulação contínua de água esterilizada por radiação ultravioleta .

Os SRSVs também foram descritos em surtos originados pelo consumo de água (Taylor et al., 1981 ; Kaplan et al., 1982; Gerba et al., 1985) e outros alimentos (Brondum et al., 1985 ; Sekine et al., 1989).

Socket et al., (1985) associaram 87 casos de surtos na Inglaterra, ocorridos entre 1965 e 1983, ao consumo de alimentos de origem marinha . De 60 casos transmitidos por moluscos , 10 foram causados pelo vírus da hepatite A , 22 por “small round viruses“ (SRV) e 28 por agentes etiológicos não identificados. Estas epidemias tem normalmente como causa o consumo de bivalves que foram colhidos em áreas em que esta atividade é proibida ou decorrentes de uma depuração insuficiente (Heller et al., 1986), podendo também ocorrer pelo consumo de alimentos provenientes de áreas de produção autorizadas, mas que sofreram temporariamente uma forte inundação, tornando-se poluídas pelas águas dos rios (Mackowiak et al., 1976).

Os vírus entéricos podem permanecer na água marinha por semanas ou até meses em sua forma infecciosa, período no qual podem infectar os moluscos bivalves (Idema et al., 1991). Entre esses agentes, incluem-se os enterovírus como o vírus da polio , coxsackie , echo e vírus da hepatite A, e outros como os reovírus , os rotavírus , os adenovírus e o vírus Norwalk, que podem causar infecções e doenças com febres, paralisias, meningites, enfermidades respiratórias e gastroenterites (Dienstag et al., 1976 ; Gerba & Goyal, 1978; Sobsey et al., 1978 ; Schwartzbrod et al., 1989). A partir de

análises com pescado de nosso meio ambiente, Schmid et al., (1977) detectaram pela técnica de cultivo celular, vírus pertencentes ao grupo dos enterovírus.

Entre os mais de 110 tipos de vírus conhecidos como entéricos (Goyal, 1984), apenas os SRSVs, o vírus da hepatite A, o vírus da hepatite E, os astrovírus, e os calicivírus podem ser considerados com evidências epidemiológicas, quando transmitidos por moluscos bivalves (Gerba, 1988). Casos de transmissão de astrovírus por bivalves foram relatados na Inglaterra, por Kurtz & Lee, (1987). Entre os vírus acima citados, alguns já foram detectados em nosso meio, a partir de casos de gastroenterite.

Stewien et al., (1991) evidenciaram astrovírus realizando análises com imunomicroscopia eletrônica em fase sólida (SPIEM) com suspensões fecais de crianças lactentes com diarreia, hospitalizadas na cidade de São Paulo. Astrovírus foram detectados por microscopia eletrônica e confirmados por SPIEM nas fezes de uma criança com gastroenterite, em um surto ocorrido numa mesma família, no estado de São Paulo (Tanaka et al., 1994).

Alguns dos últimos relatos de gastroenterite associados ao consumo de ostras contaminadas por SRSVs, foram descritos nos Estados Unidos (Truman et al., 1987; Centers for Disease Control and Prevention, 1995; Kohn et al., 1995), Japão (Kawamoto et al., 1993; Sugieda et al., 1996), Europa (Chalmers & McMillan, 1995) e Austrália (Stafford et al., 1997).

Os SRSVs às vezes são designados com o nome da região em que ocorreu o surto (Norwalk, Hawaii, Snow Mountain, Taunton, Montgomery County, Otofuke, Grootbrak),

podendo também se tornar denominações dos sorotipos (Hedberg & Osterholm, 1993; Wolfaardt et al., 1995).

Os métodos para detecção de SRSVs em ostras foram desenvolvidos com procedimentos de separação, extração dos vírus com auxílio de um eluente, e posterior concentração, sob diversas formas de metodologia (Di Girolamo et al., 1970; Sobsey et al., 1978; Goyal et al., 1979; Cliver et al., 1983 b; Pietri et al., 1988) completando-se a detecção com métodos clássicos ou moleculares.

Morse et al., (1986) estabeleceram métodos clássicos, procedendo análises por ensaio imunoradioativo (RIA) de suspensões fecais e de extratos de bivalves, de acordo com a técnica descrita por Blacklow et al., (1979) para a detecção por RIA, do antígeno do vírus Norwalk em suspensões fecais.

Ensaio imunoenzimático (EIA) foram aplicados em extratos de ostras, detectando antígenos do vírus da hepatite A em amostras negativas para indicadores bacterianos e colifagos (Grabow et al., 1989). Procedimentos sorológicos foram combinados com a microscopia eletrônica ou com técnicas de detecção do ácido nucleico, aumentando a sensibilidade e especificidade da reação (Romalde, 1996).

Entre os métodos de detecção molecular, a técnica de hibridação do ácido nucleico e a Reação em Cadeia por Polimerase – PCR (Saiki et al., 1985) representaram a implantação de métodos específicos, sensíveis e rápidos. A reação de PCR tornou-se o desenvolvimento mais significativo no campo da biologia molecular, na última década (Erich et al., 1991).

Outro aprimoramento de metodologia foi a utilização de sondas genéticas, tendo sido testado por Zhou et al., (1991) ao trabalharem com sondas de RNA, para captura de

genomas do vírus da hepatite A em ostras artificialmente contaminadas. A importância da geração de métodos mais sensíveis e específicos para a pesquisa de vírus em ostras é eminente, devido ao risco de surtos que podem ocorrer com o consumo de bivalves (Richards, 1987).

Testes de infectividade dos SRSVs ainda não foram considerados, pelo fato dos mesmos não se replicarem em nenhum sistema de cultura celular (Cliver, 1994 a).. A reação de PCR, foi inicialmente aplicada para detecção de SRSVs em suspensões fecais de pacientes relacionados com surtos de gastroenterite (De Leon et al., 1992; Jiang et al., 1992a; Moe et al., 1994). Esses procedimentos foram então adaptados para padronização metodológica com amostras de ostras artificialmente contaminadas (Atmar et al., 1993 - 1995 - 1996; Gouvea et al., 1994; Lees et al., 1994; Jaykus et al., 1996; Häfliger et al., 1997; Green et al., 1998), que puderam servir de modelo, para análises de amostras de campo, associadas ou não a surtos (Lees et al., 1995; Sugieda et al., 1996; Le Guyader et al., 1996).

1.2. A Contaminação viral no meio aquático e nos moluscos bivalves.

O homem quando se encontra infectado por vírus entéricos, libera grandes quantidades de partículas virais em suas fezes, que são veiculados nas redes coletoras e daí para o ambiente aquático. As fezes de uma pessoa infectada por vírus entéricos, com sinais clínicos ou não da doença,

podem conter entre alguns tipos de vírus, cerca de $10^8 - 10^{11}$ partículas virais por grama de fezes (Champsaur, 1989; Cromeans, 1997) .

As redes coletoras são o primeiro elo de ligação neste ciclo , no qual o homem detem a posição central, não só porque é o contaminador primário , mas também como receptor dos agentes patogênicos de veiculação hídrica .

A concentração viral nos efluentes varia de acordo com a área geográfica , fatores socio – econômicos , período climático, e níveis de higiene da população. A quantidade de partículas virais encontrada nesse meio pode aumentar proporcionalmente a estes aspectos e também pelo aumento populacional de uma comunidade . Na prática , efluentes urbanos contem vírus entéricos com concentrações variáveis , que podem alcançar níveis de 10^5 partículas / litro . Em nosso meio , trabalho relativo foi realizado por Martins et al., (1983) com detecção de enterovírus a partir de influentes de estações de tratamento de esgoto da cidade de São Paulo.

Em várias partes do mundo , efluentes são liberados para o meio ambiente sem qualquer tipo de tratamento. Entretanto em muitos países os mesmos são tratados com técnicas físico – químicas ou biológicas. Desta forma , a água que retorna ao ambiente é de melhor qualidade mas ainda contem partículas virais que chegam em uma concentração menor que a das águas de superfície (Shuval, 1984) . Níveis entre 0,05 e 1,35 PFU . L⁻¹ de enterovírus foram detectados por Marques & Martins (1983) em águas de praias da Baixada Santista, no Estado de São Paulo.

Os vírus no meio aquático , se apresentam agrupados ou em forma de partículas individualizadas. Essa

agregação ocorre com numerosas partículas virais liberadas das células infectadas, reunidas em estruturas pseudo – cristalinas que não são desintegradas espontaneamente, dependendo para tal de variações de pH e salinidade do meio (Young & Sharp, 1977). Muitos vírus se adsorvem as partículas presentes nas águas superficiais depositando-se nos sedimentos marinhos. O fenômeno de adsorção viral, é importante por exercer uma ação protetora para os mesmos, mantendo sua viabilidade (Liew & Gerba, 1980).

A camada superficial dos sedimentos marinhos pode se dispersar e atuar como uma fonte de contaminação a distância, por ação das correntes marítimas ou movimentos da maré. A quantidade de partículas virais nos sedimentos pode oscilar, estando geralmente entre 10^2 - 10^3 / kilograma. O ciclo de contaminação do meio aquático marinho põe em risco o próprio homem, ao consumir moluscos bivalves (Schwartzbrod & Boher, 1993).

O conteúdo viral nos bivalves pode variar de acordo com o tipo do organismo, estado fisiológico, tipo e quantidade de vírus, e se os mesmos encontram-se adsorvidos ou não a material particulado. Experimentos com algumas dessas variáveis foram propostos em ostras contaminadas em laboratório pelo rotavírus S A 11 (Boher & Schwartzbrod, 1993; Candeias, 1993). Mitchell et al., (1966) observaram que ostras que permaneciam em contacto com a água do mar com uma concentração viral de 10^3 PFU / mL, após uma hora apresentavam um índice de contaminação 27 vezes maior que o índice obtido da água.

Os vírus, como qualquer outra partícula ingerida pelos bivalves, são inicialmente fixados no muco

branquial e segundo Di Girolamo et al., (1977) esta captura ocorre rapidamente e em proporção inversa a salinidade da água .

Experimentos com contaminação artificial em mariscos , desenvolvidos por vários dias com água do mar, acrescida de uma concentração considerada constante de poliovírus, revelaram a existência de um ciclo de bioacumulação e descarga com grau máximo após uma hora e estabilizando-se num período de 3 horas (Gaillot et al., 1988) , e que resulta num valor equilibrado do número de partículas virais presentes nos bivalves (Landry et al., 1982) .

O mecanismo de bioacumulação depende da intensidade da atividade filtradora, que é influenciada pelo estado fisiológico e características anatômicas do bivalve , parâmetros físicos-químicos da água, e quantidade ou estado das partículas virais, isto é , associadas ou não aos sedimentos.

Certos moluscos que vivem na proximidade , ou no interior das areias , que representam um reservatório de microrganismos, podem estar mais facilmente contaminados do que outros encontrados em mar aberto .

Di Girolamo et al., (1975) trabalhando com poliovírus adicionados a água marinha, demonstraram diferenças no padrão de bioacumulação viral entre diferentes espécies de bivalves , resultando 86 % de partículas virais acumuladas após 48 horas pela ostra *Crassostrea gigas* (uma espécie do oceano Pacífico), enquanto que para a *Ostrea lurida* (uma espécie do Atlântico) foram necessárias 12 horas para que ocorresse o mesmo grau de retenção . Em relação a ostra do Pacífico também foi observado que após 25 horas de exposição à contaminação, 96 % dos vírus encontravam - se no tubo digestivo, 2,6 % no

manto, brânquias e líquido intervalvar e 0,5 % no restante do corpo , incluindo os interstícios do coração e de outros músculos . Decorridas mais 48 horas , 16 % dos vírus encontravam - se nos tecidos , demonstrando assim , que os mesmos difundiam - se progressivamente a partir do trato digestivo , até os tecidos circunvizinhos.

O número de sítios de adsorção viral no muco branquial tem carácter limitado . Esta hipótese (Di Girolamo et al., 1977), também foi defendida por Bedford et al., (1978) ao estimarem em 4.10^{10} , o número máximo de partículas adsorvidas pelo muco da ostra *Crassostrea glomerata* (uma espécie da Nova Zelandia). Em relação aos sítios de retenção nos tecidos internos dos bivalves, Liu et al., (1966) demonstraram que mais de 90% dos vírus retidos permaneciam nos divertículos de mexilhões experimentalmente contaminados por poliovírus .

Metcalf et al., (1980) determinaram que após um período de 2 ou 4 horas de permanência de um bivalve em uma água contaminada , os vírus se dispersam , sendo encontrados mais frequentemente no interior da glândula digestiva .

Power & Collins , (1990) verificaram que 89 % dos colifagos A1– 5a retidos por mariscos estavam presentes no interior de seu trato digestivo, após 48 horas de sua exposição a uma fonte de contaminação, demonstrando assim que o tubo digestivo é o único órgão onde os microrganismos podem ser concentrados, e que outras partes , como brânquias e manto , possuem um grau de contaminação similar à da água circundante. Os colifagos também foram detectados na hemolinfa dos mariscos, o que explicou o fato dos contaminantes se espalharem por seus tecidos .

1. 2. 1. A persistência da presença viral nos bivalves.

Os vírus entéricos são incapazes de se multiplicarem por não encontrarem células receptoras nos tecidos destes moluscos. Assim a população viral inicial pode se manter a mesma ou decrescer, influenciada por fatores físicos ou químicos (Gantzer et al., 1998). A persistência dos vírus durante a imersão dos bivalves depende da sua atividade fisiológica e do ambiente, e em particular do grau de contaminação viral na água.

Essa persistência é muito variável e pode se manter por longos períodos. Metcalf & Stiles (1965), descreveram que o vírus Coxsackie B 2 pode persistir por pelo menos 28 dias, em ostras que permaneceram em tanques com águas de estuário, sob temperatura de 5°C, detectando maior retenção viral na glândula digestiva. Quando a temperatura é baixa, a atividade das ostras diminui, e assim filtram menor quantidade de água. Estas condições podem favorecer a retenção de microorganismos.

Os vírus podem manter-se viáveis por muito tempo, não só em moluscos imersos, como também em moluscos estocados em temperaturas de refrigeração ou de congelamento. Tierney et al., (1982) observaram que o índice de poliovírus encontrados em ostras contaminadas experimentalmente, não decrescia após 28 dias de estocagem a 5 °C, confirmando resultados similares, obtidos anteriormente, por Metcalf & Stiles (1965).

Di Girolamo et al., (1970) descreveram que 91% dos poliovírus que contaminavam ostras do Pacífico, mantidas a temperatura de $-17,5^{\circ}\text{C}$, permaneciam viáveis após 2 semanas de estocagem, decrescendo para 40% após 6 semanas, e para 10% em 12 semanas. Uma epidemia de gastroenterite causada por SRSVs, foi associada ao consumo de bivalves que haviam sido congelados por 15 semanas antes do consumo (Linco & Grohmann, 1980).

1.2.2. Processos de descontaminação

A transmissão de vírus entéricos por moluscos bivalves é relativamente simples de se compreender, já que por seus hábitos alimentares, são capazes de filtrar até 20 litros de água por hora, o que significa uma ampla acumulação de microorganismos presentes na água marinha. Esta propriedade biológica pode colaborar em processos de depuração para a purificação microbiológica. Entretanto, várias epidemias de vírus entéricos foram detectadas mesmo com o consumo de bivalves que passaram por esses procedimentos (Gill et al., 1983; Sockett et al., 1985; Heller et al., 1986). Em relação a presença viral esses sistemas podem ser otimizados, padronizados e melhor controlados a fim de aperfeiçoar a sua eficiência.

As técnicas de descontaminação, baseiam-se em sistemas de imersão em que os bivalves permanecem geralmente entre 24 – 72 horas em contacto com água do mar de boa qualidade, ou com uma água que recebe um tratamento

contínuo de desinfecção , como a cloração, ozonização ou a radiação ultravioleta. A radiação U V é capaz de destruir os vírus, tornando-se um procedimento de escolha para esse tipo de descontaminação (Chang et al., 1985) .

Vários fatores interferem sobre os sistemas de descontaminação , como os tipos de métodos estabelecidos, que podem utilizar a água do mar ou água marinha artificial , o grau inicial de contaminação , o sistema utilizado que pode ser estático ou de fluxo contínuo , o tipo do vírus e a espécie do bivalve (Candeias , 1993) .

Liu et al., (1967) observaram que para ocorrer a depuração, as boas condições fisiológicas destes organismos dependiam da concentração do oxigênio dissolvido na água , sendo necessário um nível de saturação entre 60 – 70% , a uma temperatura mínima de 12 °C e na faixa ideal acima de 19 °C , para favorecer a eficiência da eliminação dos microrganismos . O fator salinidade foi estabelecido com valores ideais entre 23 e 30 % , sob temperaturas entre 18 – 20 °C .

Hoff & Becker (1969) e Metcalf et al., (1979) demonstraram, por experimentos de eliminação do poliovírus, que o grau de descontaminação por depuração , diminui com o correr do tempo , e que essa atividade foi maior nas primeiras 24 horas, decrescendo nas horas seguintes.

De acordo com Perkins et al., (1980) e Mesquita, (1988) as bactérias , e em particular os indicadores de contaminação fecal , são eliminados mais rapidamente que os vírus, baseando - se em experimentos em que bivalves com níveis de bactérias da ordem de 10^2 - 10^3 / g ⁻¹ , tornaram-se totalmente purificados após uma permanência de 24 – 48 hs. , em um tanque de descontaminação , enquanto que nas mesmas

condições em relação aos vírus, eram necessários um mínimo de 3 dias para ocorrer semelhante purificação .

Power & Collins , (1990) demonstraram padrões diferentes de depuração em bivalves, ao compararem a eliminação do colifago A1-5a com a *E. coli* , ocorrendo um grau de redução de 99,9 % para *E. coli* e de 90 % para o colifago, após um intervalo de 48 hs. em contacto com água tratada pela radiação UV.

Conclui - se daí que a eliminação dos coliformes fecais não assegura a descontaminação completa dos bivalves , assegurando somente que ocorreu plena atividade filtradora , durante o processo de depuração . Estas observações alertam para o risco das doenças de origem viral , veiculadas por ostras descontaminadas , de acordo com critérios baseados apenas na presença de contaminação bacteriana (Grohmann et al., 1981 ; Gill et al., 1983 ; Richards , 1985).

1.2.3. Métodos de extração e concentração de vírus entéricos em ostras

Esses métodos requerem uma amostra de 10 – 200 g de tecido dos moluscos e fluido intervalvar. As conchas são lavadas e escovadas em sua parte externa e a abertura se dá em condições de assepsia. Os tecidos e o líquido intervalvar são coletados de maneira estéril e homogeneizados em um liquidificador (Konowalchuk & Speirs, 1972; Bedford et al., 1978), com acréscimo opcional de água destilada estéril, e monitoramento da concentração iônica para

estabelecer sua condutividade , optando-se por acidificação ou não da suspensão (Sobsey et al., 1978).

A extração das partículas virais é processada por eluição em condições de pH alcalino e sob agitação. Os eluentes são compostos por soluções de pH em torno de 9,0 – 9,5 , com ou sem proteínas, como o extrato de carne acrescido de cloreto de sódio em tampão glicina (Katzenelson et al., 1976; Sobsey et al., 1978; Metcalf et al., 1980; Hejkal et al., 1982; De Leon et al., 1986; Lewis & Metcalf, 1988; Bayeva et al., 1990; Regan et al., 1993; Bonanno et al., 1998), e com a escolha de uma proporção entre amostra e eluente que pode variar entre 1:1 a 1:10 .

A clarificação do eluato é obtida por uma centrifugação que separa os resíduos dos tecidos das ostras. A posterior concentração dos vírus presentes no eluato clarificado , é obtida com uma precipitação ácida ou pela utilização do polietileno glicol, como por exemplo , o PEG - 6.000 (Lewis & Metcalf, 1988). Esse composto é um polímero sintético, solúvel em água e não tóxico, que forma um coloide em torno dos vírus, facilitando sua precipitação. Por ser constituído de macromoléculas neutras, que são capazes de precipitar as partículas virais em qualquer tipo de solução, proteica ou não, traduz-se numa técnica eficiente, simples e econômica.

Em experimentos comparativos , a precipitação com PEG 6.000 , demonstrou ser mais eficiente que a floculação orgânica , em relação aos resultados, à diminuição da toxicidade da amostra e à eficiência de recuperação (Boher et al., 1991). A floculação orgânica foi desenvolvida por Katzenelson et al. , (1976) e baseia-se na habilidade de proteínas dissolvidas , flocularem a um pH ácido abaixo de seu pH inicial. Os vírus

presentes na suspensão , são captados nessa fase , e daí recuperados. Este método só pode ser realizado com o uso de eluentes ou soluções com proteínas .

Dois grupos de proteínas são normalmente utilizados no processo de floculação: o extrato de carne, e a caseína ou leite em pó desnatado. Entretanto floculações incompletas, com baixa recuperação viral , foram frequentemente observadas (Sobsey et al., 1985; Lewis & Metcalf, 1988). Estes concentrados dificilmente podem ser testados em procedimentos de biologia molecular, visto que o extrato de carne apresenta propriedades de inibição nessas reações (Schwab et al., 1991).

1.3. Propriedades gerais dos vírus do grupo Norwalk - (SRSVs).

1.3.1. Classificação

A família *Caliciviridae* , segundo o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (Cubitt et al., 1995) , possui apenas o gênero *Calicivírus*. Este gênero é composto das seguintes espécies : *Calicivírus* canino (Ca CV); *Calicivírus* felino (FCV) ; Vírus da hepatite E (HEV) ; Vírus da doença hemorrágica do coelho (RHDV) ; Vírus do leão marinho São Miguel (SMSV) ; Vírus do exantema vesicular dos suínos (VESV); *Calicivírus* humanos (HuCV).

Os *Calicivírus* humanos incluem o Vírus Norwalk (Kapikian et al., 1972) ; Cepa Hawaii (Wyatt et al.,

1974; Thornhill et al., 1977) ; Cepa Taunton (Caul et al., 1979) ; Cepa Snow Mountain (Morens et al., 1979); Cepa Southampton (Lambden et al., 1993).

A classificação dos SRSVs como sendo membros da família *Caliciviridae* , foi confirmada por Green et al., (1994), ao demonstrarem similaridades entre as posições e tamanhos das regiões codificadoras (“ open reading frames “ - ORFs) do vírus Southampton (SHV) , com regiões correspondentes do calicivírus felino (Carter et al. , 1992). A organização genômica do vírus Norwalk (NV), também revelou similaridades com a do FCV e do RHDV (Jiang et al., 1993; Cubitt, 1994), além de evidenciar semelhanças com a morfologia não clássica do FCV (Caul et al., 1979).

1.3.2. Morfologia e estrutura

Os SRSVs quando observados por microscopia eletrônica direta (M E D) ou na imunomicroscopia eletrônica (I M E) na qual as partículas virais se agregam a anticorpos, revelam diâmetros entre 25 – 34 nm, não apresentam envoltório lipídico, nem carboidratos (Cubitt et al., 1995) , sendo o capsídeo formado por um único tipo de proteína agrupada em 90 dímeros, constituindo os capsômeros.

Com a possibilidade de clonagem do genoma do NV (Jiang et al., 1990), essa proteína estrutural , quando expressa em baculovírus , demonstrou por criomicroscopia eletrônica a forma de uma partícula com simetria icosaédrica (Jiang et al., 1992b ; Prasad et al., 1996) . O peso molecular dessa

proteína varia entre 58 – 64 kDa nos diversos SRSVs (Greenberg et al., 1981; Terashima et al., 1983), possui uma atividade imunogênica e funções nos eventos iniciais da infecção celular (Prasad et al., 1996). O vírus Norwalk é constituído também por outra proteína solúvel, com peso molecular entre 28 – 30 kDa (Greenberg et al., 1981; Cubitt et al., 1995).

O peso molecular da partícula completa é de 15×10^6 daltons; o seu coeficiente de sedimentação varia entre 170 – 187 S com uma densidade de 1,33 a 1,41 g / cm³ em cloreto de cério (Cubitt et al., 1995; Carter & Cubitt, 1995; Kapikian et al., 1996).

Partículas vazias possuem coeficiente de sedimentação com uma densidade de 1,30 g / cm³ em cloreto de cério (Thornhill et al., 1977).

O vírus Norwalk e demais SRSVs, quando analisados em estudos com voluntários, demonstraram reter sua infectividade, após um tratamento pelo calor a temperatura de 60 °C por 30 minutos; tolerando uma concentração de 20 % de eter por 18 horas a 4 °C; resistindo a pH ácido até 2,7 por 3 horas a temperatura ambiente, e não sendo inativados por concentração de 0,5 % de hipoclorito de sódio (Dolin et al., 1972; Keswick et al., 1985; ICMSF, 1996).

De acordo com Adak et al., (1991), os SRSVs são frágeis sob temperaturas de congelamento em freezer, ocorrendo frequentemente a sua desintegração nessas condições. Entretanto existe a evidência de surtos que envolveram o consumo de ostras congeladas (ICMSF, 1996) e da retenção da infectividade viral por alguns anos, a essas temperaturas, demonstrada em estudos com voluntários (Herrmann & Blacklow, 1995).

1. 3. 3. Organização genômica e replicação

A primeira sequência obtida do genoma do vírus Norwalk, foi analisada por sequenciamento do DNA clonado de partículas virais isoladas em fezes de voluntários infectados (Jiang et al., 1990 ; Matsui et al., 1991). Outros SRSVs foram detectados e sequenciados, como o SHV que foi diagnosticado em uma criança de 2 anos, durante um surto ocorrido em 1991, na localidade de Southampton, U. K. e classificado no genogrupo G 1. Um SRSV pertencente ao genogrupo G 2, foi identificado em um surto de gastroenterite ocorrido no Hospital da Universidade de Southampton em 1993, e denominado como vírus Lordsdale, e um representante do genogrupo G 3 dos calicivírus humanos que foi detectado em uma criança de 6 meses, e descrito como vírus Manchester (Liu et al., 1995).

O genoma do vírus Norwalk é caracterizado por RNA de fita simples (Jiang et al., 1990 ; Matsui et al., 1991; Kapikian, 1994), com polaridade positiva, linear, que funciona como um mRNA para a síntese de proteínas. Compõem-se de 7654 nucleotídeos, excetuando a região poliadenilada da extremidade 3' (Jiang et al., 1993; Hardy & Estes, 1996). As sequências do SHV e do NV, foram recentemente reestabelecidas, com a verificação de mais doze bases adicionais, incluídas na extremidade 5' do NV (Lambden & Clarke, 1995 ; Hardy & Estes, 1996).

Os nucleotídeos da sequência genômica do vírus Norwalk, estão distribuídos em três regiões codificadoras

(ORFs) . A mais extensa ORF , designada como ORF 1, codifica uma poliproteína precursora de outras proteínas não estruturais, está delimitada entre os nucleotídeos 5 e 5371, e mantém similaridade em relação a posição das seqüências do picornavírus que codificam uma 2C helicase, uma 3C protease e uma 3D RNA polimerase RNA – dependente. Proteínas codificadas por essa ORF demonstraram ser imunorreativas, pela reação de uma proteína de fusão expressa pelo DNA recombinante λ g t 11 ao soro humano , ou em experimentos de imunoprecipitação, com uma proteína de 57 kDa , que foi expressa em células de inseto (Matsui et al., 1991; Jiang et al., 1993).

A ORF 2 do NV está compreendida entre os nucleotídeos 5358 e 6947 , e codifica uma proteína de 530 aminoácidos, com peso molecular de 56, 571 kDa , de valor semelhante ao peso molecular da proteína do capsídeo que foi inferido em 56, 6 kDa por análise de sistema de expressão , com células de inseto , infectadas por baculovírus recombinante, que continham em seu genoma a seqüência da ORF2. Em relação a ORF 2 do SHV, infere-se que ela codifica uma proteína estrutural de 546 aminoácidos (Lambden & Clarke, 1995).

A terceira região codificadora ou ORF 3, localiza-se na extremidade 3', delimitada entre os nucleotídeos 6950 e 7585 e estabelece-se que esteja relacionada a expressão de um polipeptídeo de 212 aminoácidos , com peso molecular de 22, 5 kDa, um ponto isoelétrico de 10,99 , que não apresenta similaridade de seqüência com outras proteínas no “GenBank”, e não possui função conhecida (Jiang et al., 1993).

Toda a organização genômica do vírus Norwalk, também é conservada no SHV que pertence ao mesmo genogrupo, e no vírus Lordsdale que é classificado no genogrupo G2.

A organização do vírus Manchester, incluído no genogrupo G3, difere da dos outros dois genogrupos. A ORF 1 do genogrupo G3 tem a capacidade de codificar 2.208 aminoácidos e inclui domínios de ligação conservados, típicos da 2 C helicase , 3 C protease e 3 D RNA polimerase , em posições genômicas correspondentes a de outros calicivírus , sendo que esta ORF também compreende a região de codificação da proteína do capsídeo, que encontra-se contínua a região da RNA polimerase. A organização genômica do G3 é similar à do calicivírus RHDV (Estes et al., 1997).

Várias diferenças ocorrem entre a organização genômica do NV e do SHV , e entre os vírus pertencentes aos três genogrupos , quando comparados a de outros calicivírus . O SHV possui uma outra região denominada como ORF 4, que não foi determinada em outros SRSVs . As proteínas do capsídeo do FCV , do RHDV , e do HEV , que são codificadas na ORF 2 , diferem em relação as suas extensões . Os sorotipos 1 e 4 do SMSV apresentam a ORF 2 mais extensa que a do NV . A diferença no tamanho da proteína expressa por essa ORF, deve-se a presença de aminoácidos adicionais em sua terminação N , nos sorotipos citados , e as proteínas do capsídeo dos mesmos são compostas de maior número de aminoácidos , em relação a proteína do capsídeo do vírus Norwalk (Estes et al., 1997).

O genoma do RHDV possui apenas duas ORFs , pois a seqüência da proteína do capsídeo está inserida na ORF 1 . A organização genômica do RHDV tem sido confirmada em mais de uma cepa isolada , não representando assim um resultado de possível erro de sequenciamento. O tamanho relativo da pequena região designada como ORF 3 é distinto entre os diversos calicivírus . As ORFs 3 dos calicivírus

de origem animal , são menores em comparação a ORF 3 do vírus Norwalk (Estes et al., 1997).

A replicação dos SRSVs , por sua semelhança de organização genômica desenvolve-se supostamente, segundo o modelo da dos calicivírus de origem animal , que conseguem propagar o seu crescimento em sistemas celulares . Ocorrem evidências que alguns calicivírus produzem uma espécie de RNA subgenômico durante a replicação (Neill & Mengeling, 1988; Meyers et al., 1991). Muitas espécies de RNA subgenômico tem sido detectadas em células infectadas pelo calicivírus felino (Carter , 1990) e experimentos de hibridação com sonda de cDNA acoplada ao RNA do NV, indicaram que esse pode produzir um RNA subgenômico. Em paralelo a essas observações, uma espécie de RNA subgenômico com mais de 2 kb , já foi detectada em fezes de voluntários infectados com o vírus Norwalk (Estes et al., 1997) .

A região que compreende a ORF 1 do genoma do NV e de outros calicivírus demonstram similaridade com a seqüência de aminoácidos das proteínas precursoras P2 e P3 dos picornavírus, sugerindo-se que algumas das estratégias de replicação dos picornavírus podem ser semelhantes as do NV . Outras comparações de seqüências de aminoácidos da mesma ORF, resultou em uma expressiva homologia entre as regiões da 2C helicase , 3C protease e RNA polimerase RNA – dependente , entre os picornavírus e outros vírus RNA (Estes et al., 1997). O processo de replicação é caracterizado, pela formação de um RNA de polaridade negativa, que atua como molde para produzir novas fitas de RNA e as partículas virais tornam-se completas no citoplasma das células hospedeiras .

1.3.4. Variações antigênicas .

Os SRSVs são sorotipados por IME ou por SPIEM, utilizando soros de pacientes convalescentes , com reatividade a epítomos do capsídeo de virions completos. Pesquisadores do Japão classificaram os SRSVs em nove tipos antigênicos, descritos de SRSV 1 a SRSV 9 (Okada et al., 1990). Na Inglaterra Lewis , (1991) descreveu o agente Taunton , o NV, o agente Hawaii (HV) e o agente Snow Mountain (SMA), respectivamente, como protótipos dos tipos UK1, UK2, UK3 , e UK4 .

Uma classificação sugerida por Lambden et al., (1993) , designou o NV como sorotipo 1, o HV como tipo 2 , o SMA e o vírus Southampton como tipo 3, e o agente Taunton como tipo 4.

Analizando suspensões fecais provenientes de diferentes surtos, Lewis et al., (1995) classificaram seis grupos antigênicos, incluindo o isolamento do agente de Oklahoma.

A classificação antigênica dos SRSVs não corresponde a denominação do local em que foram isolados , devido a possibilidade de novos agentes serem identificados na mesma região geográfica. Guest et al., (1987) demonstraram que ocorria reações cruzadas, entre soros humanos reativos ao agente Snow Mountain, e o antígeno do vírus Norwalk. Um vírus denominado como agente Montgomery County, demonstrou similaridade antigênica com o vírus Norwalk (Herrmann & Blacklow, 1995).

A determinação definitiva dos aspectos da classificação antigênica , depende da produção de soros hiperimune e anticorpos monoclonais específicos , criteriosamente preparados a partir de suspensões fecais de voluntários infectados com o NV , e mais recentemente com a produção de antígenos recombinantes, como proteínas do capsídeo, produzidas em sistemas de expressão (Herrmann et al., 1995; Caul, 1996).

1.3.5. Variações genotípicas

As determinações de similaridade genômica, são realizadas inicialmente, com a amplificação de regiões mais conservadas do genoma, como por exemplo a da RNA polimerase, RNA – dependente, utilizando iniciadores (“primers”) complementares a partes desta região, completando-se com uma posterior análise de comparação, por sequenciamento.

Dois genogrupos distinguem-se entre os SRSVs, denominados como genogrupo G1 e genogrupo G2, representados pelo vírus Norwalk , e agente Snow Mountain (SMA) respectivamente, classificados por análises de seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos, de parte da região da polimerase, da região do capsídeo, ou da ORF 3 .

A similaridade de seqüências de aminoácidos entre duas cepas diferentes pertencentes ao mesmo genogrupo foi estabelecida aproximadamente entre 92 – 99% para a região da polimerase , e entre 77 – 98 % para a região do capsídeo (Kapikian et al., 1996; Estes et al., 1997). O vírus Southampton foi incluído no genogrupo G1, por apresentar

similaridade de seqüências de aminoácidos codificados a partir da região da polimerase , da região do capsídeo, e da ORF3 (Lambden et al., 1993).

O genogrupo G 2 ainda inclui o HV como um segundo subtipo , apesar de estudos com a IME terem definido o SMA e o HV , como vírus distintos . Esses subtipos podem refletir sorotipos diferentes, pelo fato de que, o vírus Hawaii apresenta apenas 85 ou 86 % de similaridade com as proteínas do capsídeo de outras duas cepas pertencentes ao grupo G 2 , designadas como vírus Toronto ou minireovírus (Lew et al., 1994) , e a cepa OTH - 25 , estando esses mais relacionados ao SMA em relação a região da polimerase. Outros subtipos estão incluídos no grupo G2, entre os quais, o vírus Taunton, o vírus Bristol (Green et al., 1994), e o vírus Lordsdale, (Dingle et al., 1995).

Lambden & Clarke (1995), classificaram os SRSVs, em dois grupos genéticos, baseando-se em análises de seqüências dos aminoácidos que pertencem as proteínas do capsídeo , e relataram aproximadamente 68 % de identidade entre as mesmas , quando analisaram cepas antigenicamente distintas dentro de um mesmo genogrupo , e um índice de 48% , quando a comparação se deu em separado entre cepas pertencentes aos dois genogrupos.

Um terceiro genogrupo é composto apenas por calicivírus humanos com morfologia típica a do gênero *Calicivirus*, (Estes et al., 1995), entre os quais destacam - se, o vírus Sapporo e o vírus Manchester (Metcalf et al., 1995; Matson et al., 1995; Liu et al., 1995). A análise de seqüências e organização genômica deste grupo, os aproximam dos calicivírus de origem animal (Lambden et al., 1994; Matson et al., 1995; Liu et al., 1995).

Os vírus pertencentes ao grupo G 3 apresentam uma similaridade de seqüência em cerca de 40% , na região da RNA polimerase, em relação ao FCV e ao SMSV (Estes et al., 1997). Os três genogrupos circulam mundial e simultaneamente, apesar que o genogrupo G2 parece apresentar uma distribuição predominante (Jiang et al., 1996).

Os calicivírus , segundo Berke et al. (1997) estão classificados em cinco genogrupos, que incluem os SRSVs (“Norwalk-like”), os vírus “Sapporo-like” e o vírus da hepatite E (HEV), (designados como calicivírus humanos - HuCVs) , e os vírus RHDV e VESV que são denominados como calicivírus animais (AnCVs), estabelecendo-se ainda uma subdivisão dos genogrupos em subgenogrupos.

Comparações entre as seqüências de vírus , com aproximada reatividade antigênica , que foram isolados em épocas e locais diferentes, indicaram que a seqüência de aminoácidos não sofre uma rápida alteração temporal . A seqüência de um calicivírus humano, com relação antigênica similar a do vírus protótipo Norwalk (NV), e posteriormente isolado, após 21 anos no Japão, apresentou 87,2 % de similaridade de nucleotídeos em relação ao NV , totalizou 2.516 bases contínuas , e atingiu cerca de 96 – 98 % de similaridade de aminoácidos em duas ORFs (Wang et al., 1994).

Cepas com semelhança antigênica ao SMA , e que foram isoladas posteriormente , a intervalos de 13 e 16 anos, no Japão e na Inglaterra , revelaram que 80 % dos seus nucleotídeos , e que entre 88 a 92 % de seus aminoácidos , apresentaram identidade , respectivamente em relação a cepa protótipo (Estes et al., 1997) .

Estas revelações denotaram , que os vírus relacionados antigenicamente ao seu vírus protótipo , podem estar circulando , e que ocorre uma boa taxa de conservação genética no decorrer do tempo . Apesar que regiões variáveis da proteína do capsídeo terem sido identificadas, isto não tem interferido na antigenicidade específica de um vírus, quando comparada a alterações de outras regiões do genoma (Estes et al. , 1997).

A utilização da reação da RT- PCR , utilizando iniciadores (“ primers”) derivados de seqüências do vírus Norwalk, e do SHV , resultaram em baixos índices de detecção molecular em diferentes surtos , provavelmente em consequência da grande diversidade de seqüências nucleotídicas , encontrada entre esses SRSVs, distintos antigenicamente (Green et al., 1993; Moe et al., 1994).

Ando et al., (1994) e Wang et al., (1994) determinaram que SRSVs similares antigenicamente ao NV , como o HV e o SMA , não apresentavam similaridade de seqüência na região da RNA polimerase , distinguindo-os no genogrupo G2.

1.3.6. Propriedades biológicas

Ao contrário de outros calicivírus, os SRSVs, são hospedeiros exclusivos do trato gastrointestinal humano. Tentativas de indução da doença , em outros animais não tiveram êxito (Kapikian et al., 1996), exceto em chimpanzes (Wyatt et al., 1978), que ao serem infectados com o NV, desenvolveram resposta sorológica detectada por IME e RIA , e

apresentaram detecção em suas fezes do antígeno viral por RIA (Kapikian et al., 1975; Greenberg et al., 1978).

1.3.6.1. Vias de transmissão

As evidências para as formas de transmissão dos SRSVs, apontam para a sua disseminação a partir de uma fonte primária que atua como a causa principal do surto, e a disseminação posterior da mesma, via pessoa-a-pessoa.

Os alimentos e/ou a água atuam como veículos, apresentando vantagens, na disseminação viral, quando comparados a transmissão via pessoa-a-pessoa, contando com a possibilidade de uma maior extensão a novos grupos de hospedeiros potenciais (Cliver, 1994 b).

A transmissão secundária pode advir de um surto com uma fonte comum, ou partindo da disseminação pessoa-a-pessoa (Herrman & Blacklow, 1995).

Os riscos de propagação dos SRSVs por alimentos, incluem, além do consumo de moluscos bivalves crus ou inadequadamente cozidos, o contacto por manipuladores sintomáticos ou não, que atuam como elementos centrais na via fecal - oral (Lo et al., 1994), e a contaminação cruzada por outros alimentos, como saladas, sanduíches e produtos de confeitaria (Kuritsky et al., 1984).

A água de consumo, o gelo quando manipulado e as águas de piscinas, podem também veicular os SRSVs (Hedberg & Osterholm, 1993; Khan et al., 1994; Lara et al., 1995).

O vírus Norwalk pode ser detectado nas fezes do paciente, na fase aguda da doença e subseqüentemente por mais um ou dois dias . Existem evidências que os manipuladores de alimentos , podem transmitir o NV , por cerca de dois dias após cessar os sinais de sintomatologia (White et al., 1986 ; Iversen et al., 1987).

A ocorrência de surtos de gastroenterite, também foi relatada em pequenas comunidades, em locais com agrupamento constante ou temporário de pessoas, como hospitais, escolas, alojamentos, e em navios (Hedberg & Osterholm, 1993; Lo et al., 1994). Uma transmissão direta pelo ar, na forma de aerossóis com partículas presentes em vômitos (Greenberg et al., 1979b), pode explicar o rápido contágio entre os pacientes de um hospital e em outros grupos de pessoas em outras instituições. As partículas podem contaminar superfícies, e daí serem transmitidas via ar – oral (Noah , 1994 ; Chadwick & McCann, 1994).

Dentro de uma comunidade, os SRSVs possuem um baixo nível de infecção , até que um indivíduo passa a infectar uma fonte comum , que poderá tornar-se a causa de um grave surto (Lo et al., 1994) . Apesar de que os casos de transmissão secundária poderem multiplicar o número de pessoas afetadas , os surtos estão geralmente limitados a um período de uma ou duas semanas , que pode se prolongar , dependendo da natureza do ambiente, ou da renovação da população susceptível, como em ocasiões da intercalação de novos passageiros em um cruzeiro marítimo (Centers for Disease Control, 1990).

1.3.6.2. Distribuição geográfica

Os estudos soroepidemiológicos indicam que as infecções causadas pelos vírus do grupo Norwalk , ocorrem em todas as regiões do mundo (Blacklow et al., 1979; Greenberg et al., 1979a ; Murphy, 1981) . Estudos com IME , com RIA e ensaio imunoenzimático (EIA) usando soros pareados de voluntários experimentalmente infectados revelaram a presença do NV em amostras de fezes de pacientes envolvidos em surtos de gastroenterite nos U.S.A., Austrália, Reino Unido e no Canadá (Cubitt, 1989).

Dados de prevalência de anticorpos para o NV foram inicialmente analisados em estudos extensivos, utilizando reagentes experimentalmente obtidos em voluntários, com métodos de RIA (Blacklow et al., 1979) ou ensaio de hemaglutinação por imunoadesência - IAHA (Kapikian et al., 1978; Greenberg et al., 1979a). Os níveis de anticorpos para o NV são adquiridos gradualmente, iniciando com baixos índices nas crianças , e aumentando a incidência nos adultos , com o decorrer dos anos (Kapikian et al., 1978).

A taxa de aquisição de anticorpos para o NV varia de acordo com a região, sendo que essa ocorre mais precocemente em países menos desenvolvidos (Greenberg et al., 1979a). Em países em desenvolvimento, como Bangladesh, Kuwait ou México , muitas pessoas adquirem anticorpos para o NV na faixa etária entre os 2 e 5 anos, enquanto nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos esses níveis ocorrem gradualmente em indivíduos com idade superior aos 20 anos

(Greenberg et al., 1979a; Cukor et al., 1980; Black et al., 1982; Jiang et al., 1995a; Dimitrov et al., 1997).

No Brasil, Gabbay et al., (1994) utilizando a técnica de EIA com antígeno recombinante, detectaram em um levantamento soroepidemiológico, de oito comunidades indígenas da Região Amazônica, variações de soroprevalência entre 38 a 100 % dentre as localidades, e que as crianças com faixa etária de 6 a 10 anos, apresentaram níveis de anticorpos similares aos dos adultos. Em várias tribos, a baixa prevalência de títulos de anticorpos para o NV, sugeriu uma introdução recente desse agente, nessas tribos, em meados do ano de 1994.

A utilização da RT – PCR, além de contribuir para o diagnóstico rápido, específico e com alta sensibilidade, tem se somado a elucidar a epidemiologia das gastroenterites virais causadas por SRSVs (Loeffelholz, 1996). Análises de sequenciamentos, revelaram variações dentre os genogrupos G1 e G2, em surtos ocorridos em comunidades semifechadas na Holanda, em 1996 (Vinjé et al., 1997).

Beller et al., (1997) conduziram pesquisas para elucidar um surto de gastroenterite, ocasionado por SRSVs, analisando amostras de água de um restaurante e fezes dos turistas ou funcionários do estabelecimento. As análises por RT – PCR e sequenciamento dos produtos amplificados revelaram a identificação do genotipo 2/P2B nas fezes de dois turistas e de um empregado, como também na água de abastecimento.

Tanaka et al., (1996) e Ueda et al., (1998) trabalhando com suspensões fecais provenientes de surtos de gastroenterite ocorridos na Baixada Santista e no interior do estado de São Paulo, no início do ano de 1995, identificaram pela técnica da IME, partículas com morfologia semelhante a dos SRSVs,

confirmados por Timenetsky et al., (1996) com a RT-PCR, como pertencentes ao genogrupo G2 . Os casos destacaram-se entre amostras fecais de crianças, com até um ano de idade . Um soro utilizado para essa reação de IME , foi coletado na fase convalescente , de um caso de gastroenterite ocorrido em um adulto com 27 anos, proveniente da cidade de São Sebastião (SP), tendo sido detectados , em sua suspensão fecal na fase aguda, genomas de SRSVs pertencentes ao grupo G2 (Ueda et al., 1996).

1.3.6.3. Patogenicidade

1.3.6.3.1. Períodos de incubação e Sintomatologia

Estudos de surtos associados aos SRSVs, demonstram estimativas de períodos de incubação entre 24 e 48 hs. , podendo alcançar os limites de 4 a 77 hs. Infecções experimentais com voluntários , demonstraram que esse período pode perdurar entre 10 e 51 hs. para o NV , e entre 19 a 41 hs. para o agente Snow Mountain (Wyatt et al., 1974; Dolin et al., 1982 ; Kapikian, 1994). Os sinais clínicos da fase aguda da doença, usualmente cessam após um intervalo de 24 a 48 horas (Kapikian, 1994).

A disseminação viral quando determinada pela IME, coincide com o avanço da doença e usualmente não há detecção por essa metodologia, após 72 hs. do início da sintomatologia .

Os sintomas mais predominantes incluem náusea e vômitos , frequentemente severos , enquanto que a febre e a diarreia são relativamente brandas . As fezes diarreicas não contem a presença de hemácias , muco ou leucócitos . Outros sintomas incluem, o aparecimento de cólicas abdominais brandas , dor de cabeça e indisposição geral .

As análises realizadas com voluntários experimentalmente infectados, denotaram uma baixíssima incidência da elevação temporária do número de leucócitos .

Os sintomas respiratórios não apresentam manifestação, e as crianças estão mais propensas a ter vômitos, enquanto que nos adultos, a diarreia é a ocorrência mais comum.

Os vômitos podem ser originados por uma redução da mobilidade gástrica , que pode ser mais pronunciada nas crianças, que nos adultos (Christensen, 1989).

1.3.6.3.2 Patogenia

O vírus Norwalk invade o trato gastrointestinal, causando lesões da mucosa do intestino delgado proximal, que desaparecem durante as duas semanas pós - infecção . Estudos de histopatologia, não demonstraram alterações nas mucosas gástrica e retal . A má adsorção da D - xylose , da lactose e de gorduras voltam a normalidade , após um período de duas semanas do advento da doença . A secreção gástrica do ácido clorídrico , da pepsina e do fator intrínseco não sofrem alteração, mas o esvaziamento gástrico é significativamente retardado, e esta função anormal da mucosa gástrica ,

provavelmente explica a frequente náusea e o aparecimento dos vômitos, muito característicos dessa doença (Blacklow & Greenberg, 1991).

A patogênese em voluntários administrados via oral, com o NV, e com o agente Hawaii (HV), revelou lesões histopatológicas em biopsias do jejuno, com infiltração nas células mononucleares e presença de vacúolos citoplasmáticos. Os níveis das enzimas fosfatase alcalina, trealase, e sucrase presentes a luz do intestino delgado, decrescem durante o período da doença, não sendo percebido qualquer aumento da atividade da adenil – ciclase, presente no jejuno. Os níveis de interferon analisados no soro e em aspirados e biopsias do jejuno mantiveram-se em níveis considerados normais, nos mesmos tipos de experimentos com voluntários induzidos a doença pelo NV ou HV (Kapikian et al., 1996).

Alguns estudos indicaram que a infecção não conferiu imunidade duradoura para o NV (Barnett, 1983), e outros sugeriram que os anticorpos presentes no soro, ou no trato gastrointestinal, não conferiam proteção contra uma nova infecção pelo NV, mas só com duas exposições a esse agente, em intervalos de seis meses, que a presença dos anticorpos no soro relacionava-se com a proteção.

A frequência e o intervalo de exposição ao NV, podem ser importantes no aparecimento da resposta imune, em algumas pessoas, como as que habitam regiões em desenvolvimento, expostas a repetidos eventos de infecção, nas quais os níveis de anticorpos correlacionam-se com a resistência a doença. Uma pequena porcentagem de voluntários, entretanto, mantem-se resistentes a doença, desenvolvendo baixos níveis de anticorpos no soro, mantendo esses níveis mesmo após

sucessivas exposições ao NV. Formas não usuais de resistência clínica a infecção pelo NV, podem ocorrer por mecanismos não especificamente imunológicos (Blacklow & Greenberg, 1991).

1.3.7. Testes Diagnósticos

1.3.7.1. Métodos Diretos

As técnicas de diagnóstico direto dos SRSVs , em fezes , incluem a microscopia eletrônica direta (MED), a imunomicroscopia eletrônica (IME), o ensaio imunoradioativo (RIA) e os ensaios imunoenzimáticos (EIA) .

A MED, tem aplicação restrita, por sua pouca sensibilidade na detecção de SRSVs , frequentemente presentes com baixo título de partículas virais , em pessoas com a enfermidade .

A IME para a pesquisa do NV em suspensões fecais (Kapikian et al., 1972 ; Okada et al., 1990) possui uma maior sensibilidade , na pesquisa dos antígenos, mas se os anticorpos presentes estiverem em excesso , os vírus não podem ser visualizados , resultando em falhas em sua detecção. Este detalhe foi contornado , com o advento da SPIEM , que funciona como uma reação de ELISA de captura , que foi desenvolvida por Lewis et al., (1988) em exame de amostras de fezes, preparadas e submetidas ao contacto com uma grade de MED adicionada de uma diluição de soro padrão, proveniente de pacientes em fase

aguda , ou convalescente dentre um intervalo de três a quatro semanas. A sensibilidade da IME atinge o valor aproximado de 10^5 partículas / mL (Estes et al., 1997).

O desenvolvimento da técnica de RIA para o agente Norwalk , foi estabelecida por Greenberg et al., (1978), que detectaram em suspensões fecais, antígenos solúveis ou particulados, quando em contacto com anticorpos marcados por isótopos radioativos, obtidos de pacientes pré-infectados ou convalescentes. Greenberg et al., (1979b) diagnosticaram a presença do antígeno do NV em vômitos de pacientes experimentalmente infectados com o procedimento de RIA, e em uma das amostras , após um processo de concentração por ultracentrifugação, foram visualizadas partículas de NV por imunomicroscopia eletrônica.

Os ensaios imunoenzimáticos foram inicialmente implantados por Madore et al., (1986) , e baseiam-se nos mesmos princípios do RIA, mas sem empregar a marcação radioativa. Ambos os métodos são mais sensíveis que a IME para a detecção de antígenos do NV (Greenberg et al., 1978; Greenberg & Kapikian, 1978).

A Reação em Cadeia por Polimerase com transcrição reversa (RT - PCR) é menos sensível que o ELISA recombinante , para a detecção do NV em fezes de voluntários, devido a uma grande quantidade de antígenos solúveis, que não são detectados pela PCR, e muitas vezes pela ausência concomitante do ácido nucleico (Kapikian et al., 1996).

A sensibilidade do EIA é comparável a da RT – PCR , para a confirmação da presença de NV em fezes , e mais sensível que os ensaios de hibridação por dot – blot , e ensaios por RIA , sendo que o ensaio de EIA que utiliza o antissoro para o antígeno recombinante do NV (Cubitt et al.,

1994), pode detectar nas suspensões fecais, além de partículas virais, proteínas solúveis, o que explica a sensibilidade similar dessa técnica, em relação à da RT – PCR (Estes et al., 1997).

1.3.7.2. Métodos Indiretos

A detecção de anticorpos por IME, tem sido utilizada para medir a resposta dos mesmos à infecção pelos SRSVs, sendo altamente específica, e reveladora de variações antigênicas.

Estudos com imunomicroscopia eletrônica em fase sólida (SPIEM) com captura de IgM, desenvolvidos por Lewis et al., (1988) revelaram eficácia, na investigação de surtos de gastroenterite causados por SRSVs.

O ensaio imunoradioativo e os ensaios imunoenzimáticos, são os principais testes indiretos para o diagnóstico de infecções causadas pelo vírus Norwalk, sendo que outros SRSVs relacionados antigenicamente ao NV, podem estabelecer reações cruzadas (Cubitt et al., 1987).

Um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos para o NV, foi desenvolvido por Gary et al., (1985). Posteriormente, com a utilização da proteína recombinante do capsídeo do NV, expressa em baculovírus, pode-se verificar comparável especificidade e sensibilidade, aos ensaios que acoplavam o vírus NV nativo, como antígeno para evidência sorológica da infecção, ocorrendo reações mais fracas, em

paralelo, com soros de voluntários infectados pelo HV ou SMA (Monroe et al., 1993 ; Kapikian et al., 1996).

Os ensaios de hemaglutinação por imunoadesência (IAHA) , podem ser realizados para comprovar a presença de anticorpos , mas são menos eficientes que a IME ou ao RIA, requerendo inclusive, antígenos com maior título e melhor purificados (Kapikian , 1994).

1.3.7.3. Métodos Moleculares

1.3.7.3.1. Detecção do Ácido Nucleico

A reação de PCR com transcrição reversa (RT-PCR) e a detecção por ensaios de hibridação,são capazes de captar pequenas quantidades de ácido nucleico presentes em suspensões, suspensões fecais e já são consideradas tão sensíveis como as reações de RIA ou EIA , na investigação da presença viral em fezes de voluntários (De Leon et al., 1992; Jiang et al., 1992a; Green et al., 1993; Willcocks et al., 1993 ; Jiang et al., 1995b) ou em ostras artificialmente contaminadas com partículas do NV (Atmar et al.; 1993).

Análises de resultados de sequenciamento, com cepas virais pertencentes a uma mesma família, mostram uma variabilidade considerada entre as seqüências de nucleotídeos pertencentes a essas, não sendo possível selecionar um simples par de iniciadores, capaz de reagir com uma ampla gama de genomas virais (Wang et al., 1994; Ando et al., 1995;

Green et al., 1995; Jiang et al., 1995b). Assim foram desenvolvidos várias combinações de pares de iniciadores e sondas de hibridação, que identificam seqüências da região da polimerase, ou de outras regiões do genoma, em distintos genogrupos (Estes et al., 1997).

O advento da Reação em Cadeia por Polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), também favoreceu a obtenção de amplicons para posterior análise de sequenciamento para os bancos de dados. O sucesso da detecção molecular de vírus em suspensões fecais, depende da remoção de substâncias presentes nessas, que podem inibir as enzimas transcriptase reversa (RT) e/ou *Taq* polimerase. Muitos procedimentos para remoção destas substâncias tem sido desenvolvidos entre os quais a extração com a etapa de precipitação pelo detergente catiônico, brometo de cetiltrimetilamonio - CTAB (Del Sal et al., 1989; Jiang et al., 1992a - 1995b) ou adsorção em partículas de sílica.

Hale et al., (1996) trabalhando com fezes experimentalmente inoculadas com partículas de SRSVs, compararam quatro técnicas de extração do RNA desses vírus, com posterior detecção pela RT-PCR, obtendo remoção dos inibidores, em 100% das amostras que foram previamente tratadas com o tiocianato de guanidina (Chomczynsky & Sacchi, 1987) e adsorvidas em partículas de sílica, e apenas 19 % dessas amostras demonstraram presença de seu genoma após um tratamento de precipitação por PEG, extração com fenol/clorofórmio e adição do detergente CTAB.

Procedimentos de concentração viral em extratos de ostras, que utilizam o CTAB, precipitam os ácidos nucleicos e algumas proteínas, enquanto outras proteínas e

polissacarídeos permanecem em solução (Jaykus et al., 1995). Esta metodologia foi aprovada por Zhou et al., (1991) ; Atmar et al., (1993-1995); Jaykus et al., (1993) ; Gouvea et al., (1994); Wolfaardt et al., (1995); Le Guyader et al., (1996) ; e Sugieda et al. , (1996). Entretanto não foi eficiente, na pesquisa do vírus da hepatite A e NV , em extratos de ostras experimentalmente inoculadas (Jaykus et al., 1995).

Processos acoplados a metodologia da RT - PCR, tem sido descritos para comprovar a presença genômica dos SRSVs em moluscos bivalves , como ostras e mariscos (Atmar et al., 1995 ; Lees et al., 1995 ; Atmar et al., 1996 ; Le Guyader et al., 1996). Os níveis de contaminação viral nestes espécimes são geralmente baixos e assim um método de concentração inicial de partículas virais é primordial para que as etapas seguintes tenham uma otimização de seus procedimentos. Os inibidores da reação de RT-PCR , como polissacarídeos, entre os quais o glicogênio, devem ser removidos previamente dessas amostras, com as mesmas finalidades (Atmar et al., 1993 - 1995 - 1996 ; Lees et al., 1995).

Como as partículas virais são concentradas mais eficientemente pelo estômago com seus divertículos , métodos que utilizam esses órgãos são atualmente escolhidos ao invés de outros que tentam extrair o ácido nucleico do corpo inteiro da ostra (Atmar et al., 1995). Esses métodos tem sido implantados com sucesso na detecção molecular de vírus implicados em diversos surtos (Lees et al., 1995 ; Le Guyader et al. , 1996) e atualmente podem detectar a maioria dos SRSVs, revelando um impacto na identificação desses agentes no meio ambiente (Hale , 1997).

OBJETIVOS

- Desenvolvimento de uma metodologia simplificada para extração e concentração de vírus entéricos humanos presentes em ostras, naturalmente contaminadas, tendo como alvo os pequenos vírus de estrutura arredondada (Grupo SRSV - *Calicivirus*).
- Implementação de técnicas para remoção dos inibidores das enzimas taq polimerase e/ou transcriptase reversa da reação de RT - PCR, presentes nos tecidos das ostras .
- Classificar os possíveis genomas detectados pela RT - PCR e hibridação por Southern - blot , dentro de seus respectivos genogrupos e subgrupos filogenéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras: Ostras do gênero *Crassostrea spp.* e da espécie *Crassostrea rhizophorae* foram obtidas em diversos pontos de comercialização, nos municípios de Ubatuba, Bertioga, Cananéia e Peruíbe, no Estado de São Paulo, durante os meses de verão e inverno de 1997 e 1998, sendo transportadas sob refrigeração até o laboratório, para início das análises. As superfícies externas das conchas foram lavadas e escovadas em água bidestilada estéril, para retirada de detritos. Após secagem rápida, procedeu-se a abertura das valvas e corte do músculo adutor, com auxílio de um estilete estéril. O conjunto do estômago e divertículos digestivos foi exposto, seccionado e submetido a extração inicial. Os órgãos foram imediatamente processados ou congelados a -20°C , para análise posterior.

Preparo da amostra: A purificação do concentrado inicial foi estabelecida de acordo com o método da eluição-precipitação (Lees et al., 1994) com modificações. Amostras com 10 g de estômago com divertículos mais 100 mL de tampão de eluição (0,09 M glicina; 3% (w/v) extrato de carne; 3,2 % NaCl; pH 9.5) foram trituradas em liquidificador, homogeneizadas por 30 minutos a temperatura ambiente, e centrifugadas a $10.000 \times g$ a 4°C por 30 min. Para cada 100 mL da mistura de sobrenadantes foi acrescentado 8 g de polietilenoglicol 6000 (Synth, S.P., Brasil) e manteve-se sob agitação por 30 min. seguida de repouso por 12 hs. a 4°C . Após igual centrifugação, os sedimentos de cada tubo foram ressuspensos em 10 mL de solução 0,15M Na_2HPO_4 (pH 9,5) com agitação vigorosa por 30 min. e novamente centrifugados. Os sobrenadantes foram ajustados para o pH de 7,5 (com HCl 1N) e clarificados por duas vezes com igual volume de 1,1,2 – trichloro – 1,2,2 – trifluoroethano (freon) com centrifugações a $500 \times g$ por 30 minutos a 4°C . O concentrado obtido na fase aquosa de cada tubo foi estocado a -70°C ou imediatamente separado para a extração do ácido nucleico.

PROCEDIMENTO DA EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO

MÉTODO DE ADSORÇÃO - ELUIÇÃO E PRECIPITAÇÃO

OSTRAS INTEIRAS OU ESTÔMAGO E DIVERTÍCULOS (10 gramas)

Extração do RNA:

Foram desenvolvidas três metodologias para a extração do ácido nucleico nos concentrados purificados das ostras .

PROTOCOLO COMPLETO DA EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL COM CTAB

A. PARA O CONTROLE POSITIVO (EXTRATO DE FEZES POSITIVA PARA SRSV)

1. Adicionar 50 μ L de amostra em um microtubo com 450 μ L de PBS estéril.
2. Homogeneizar (vortex) por 6 minutos.
3. Adicionar 500 μ L de freon.
4. Homogeneizar (vortex) por 6 minutos.
5. Centrifugar a 200 x g por 30 minutos a 4 °C.
6. Separar o sobrenadante (FASE AQUOSA)

B. PARA O CONTROLE POSITIVO OU PARA A MISTURA DESTE COM UM CONCENTRADO PURIFICADO DE OSTRAS .

(MISTURA = 200 μ L da FASE AQUOSA + 300 μ L do CONC. PURIF. DE OSTRAS)

7. Adicionar 200 μ L da FASE AQUOSA ou 500 μ L da MISTURA em um microtubo.
8. Acrescentar 1 mL de Trizol [®] a 4 °C.
9. Misturar (vortex) por 15 segundos.
10. Acrescentar 200 μ L de Clorofórmio a 4 °C.
11. Misturar (vortex) por 30 segundos.
12. Incubar por 5 minutos a 4 °C.
13. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
14. Adicionar 500 μ L do sobrenadante, em um microtubo com 500 μ L de Isopropanol a 4 °C.
15. Misturar (vortex).
16. Incubar por 15 minutos a 4 °C.
17. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
18. Inverter o microtubo e secar sua borda com gaze estéril.
19. Acrescentar ao centrifugado , 800 μ L de Etanol 75 ° a 4 °C.
20. Misturar (vortex) por 5 - 10 segundos.

21. Centrifugar a 10.000 xg por 15 minutos a 4° C.
22. Desprezar o sobrenadante.
23. Secar o centrifugado por inversão do microtubo, em papel de filtro estéril.
24. Adicionar ao centrifugado, 100 µL de uma solução a 1,4 % de CTAB e NaCl a 0,11 M.
25. Misturar (vortex).
26. Incubar por 15 minutos a 4° C.
27. Centrifugar a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C.
28. Desprezar o sobrenadante.
29. Adicionar ao centrifugado, 100 µL de uma solução a 1 M de NaCl.
30. Misturar (vortex).
31. Acrescentar 200 µL de isopropanol a 4 °C.
32. Misturar (vortex).
33. Incubar por 15 minutos a 4 °C.
34. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
35. Acrescentar ao centrifugado, 800 µL de etanol 75 °C.
36. Misturar (vortex) por 5-10 segundos.
37. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
38. Desprezar o sobrenadante.
39. Repetir itens 35 a 38.
40. Secar o centrifugado por inversão, em papel de filtro estéril.
41. Adicionar 20 µL de H₂O MilliQ-DEPEC.
42. Estocar a - 70 °C e/ou proceder a RT-PCR.

PROTOCOLO SIMPLIFICADO - EXTRAÇÃO COM CTAB (CETIL TRIMETIL AMINO BROMETO)

(A) PROCESSAMENTO DA AMOSTRA DE OSTRAS (10 g) –

Extração com TRIZOL-CLOROFÓRMIO

↓
Precipitação com ISOPROPANOL - ETANOL 75%

↓
Ressuspensão pellet - 1,4% CTAB + 0,11 M NaCl

↓
Centrifugar 10.000 x g - 30 min - 4 ° C

↓
Ressuspender em 1 M NaCl

↓
Reprecipitar com ISOPROPANOL

↓
Ressuspender pellet – ETANOL 75%
↓
Centrifugar 10.000 x g - 15 min 4 ° C

2 X

↓
Ressuspender em DEPC – H₂O MilliQ

↓
Estocar a - 20 ° C / -70 ° C e/ ou proceder RT-PCR .

[* Concentrado purif. ostra (300 µL)+ extrato fezes controle positivo, purificado por Freon (200 µL)] .

PROTOCOLO COMPLETO DA EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL COM ACETATO DE AMÔNIO - (E TESTE INICIAL DA COLUNA SPIN MILLIPORE)

A. PARA O CONTROLE POSITIVO (Extrato de fezes positiva para SRSV).

1. Adicionar 50 μ L de amostra em um microtubo com 450 μ L de PBS estéril.
2. Homogeneizar (vortex) por 6 minutos.
3. Adicionar 500 μ L de freon.
4. Homogeneizar (vortex) por 6 minutos.
5. Centrifugar a 200 x g por 30 minutos a 4 °C.
6. Separar o sobrenadante (FASE AQUOSA).

B. PARA UM CONCENTRADO PURIFICADO DE OSTRÁ OU PARA A MISTURA DESTE COM UM CONTROLE POSITIVO .

(MISTURA = 200 μ L da FASE AQUOSA + 300 μ L do CONC. PURIF. DE OSTRÁ)

7. Adicionar 200 μ L de CONC. PURIF. DE OSTRÁ ou 500 μ L da MISTURA em um microtubo.
8. Acrescentar 1 mL de Trizol [®] a 4 °C.
9. Misturar (vortex) por 15 segundos.
10. Acrescentar 200 μ L de Clorofórmio .
11. Misturar (vortex) por 30 segundos.
12. Incubar por 5 minutos a 4 °C.
13. Centrifugar a 10.000 x g por 15 min. a 4 °C. Separar o sobrenadante a 4 °C. CONTINUAR COM ITEM 14 (OU AO ITEM 14 A PARA PURIFICAÇÃO EM COLUNA SPIN MILLIPORE [®]).
14. Adicionar 500 μ L do sobrenadante em um microtubo com 500 μ L de isopropanol a 4 °C.
15. Misturar (vortex).
16. Incubar por 15 minutos a 4 °C.
17. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
18. Inverter o microtubo e secar sua borda com gaze estéril.
19. Acrescentar ao centrifugado, 800 μ L de Etanol 75° a 4 °C.
20. Misturar (vortex) por 5 - 10 segundos.
21. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C.

22. Desprezar o sobrenadante.
23. Secar o centrifugado por inversão, em papel de filtro estéril.
24. Ressuspender o centrifugado em 300 µL de tampão TE a 4 °C.
25. Acrescentar 150 µL de uma solução a 7,5 M de Acetato de amônio, e 750 µL de Etanol absoluto (aprox. 100 °) a 4 °C.
26. Misturar (vortex) rapidamente.
27. Incubar por 15 minutos a 4 °C.
28. Desprezar o sobrenadante.
29. Inverter o microtubo, secando sua borda com gaze estéril.
30. Acrescentar 800 µL de Etanol 75 ° a 4 °C.
31. Misturar (vortex).
32. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
33. Desprezar o sobrenadante.
34. Inverter o microtubo secando sua borda em papel de filtro estéril.
35. Ressuspender o centrifugado com o auxílio de uma ponteira com filtro, em 100 µL de tampão TE Modificado (a 4 °C).
36. Estocar a -20 °C ou -70 °C, e / ou proceder a RT-PCR.

**Procedimento utilizando a coluna Spin Millipore Ø
(para a mistura de um concentrado purificado de ostra
mais controle positivo)**

- 14 A. Adicionar 150 µL de água MilliQ-DEPEC estéril (a 4 °C)
no recipiente retentor de uma coluna Spin Millipore ®,
com membrana de polissulfona (limite de pêsso molecular =
100.000).
- 15 A. Acrescentar a esse volume, 150 µL do sobrenadante obtido
no item 13.
- 16 A. Centrifugar a 2.000 x g por 5 minutos.
- 17 A. Descartar o volume filtrado.
- 18 A. Adicionar ao volume retido sobre a membrana, 250 µL
de água MilliQ – DEPC estéril (a 4 °C).
- 19 A. Centrifugar a 2.000 x g por 5 minutos .
- 20 A. Ressuspender o volume retido sobre a membrana , com 20
µL de tampão TE Modificado (a 4 °C).
- 21 A. Estocar a - 20 °C ou – 70 °C e / ou proceder a RT-PCR.

PROTOCOLO SIMPLIFICADO - EXTRAÇÃO COM ACETATO DE AMÔNIO

(A) PROCESSAMENTO DA AMOSTRA DE OSTRAS (10 g) –

(B) CONCENTRADO PURIFICADO

OU

MIX POSITIVO *

OPÇÃO 2

Extração com TRIZOL-CLOROFÓRMIO

OPÇÃO 1

Precipitação com ISOPROPANOL-ETANOL 75%

Ressuspensão pellet TAMPÃO TE (10 mM Tris-HCl, 1mM Na₂EDTA-pH 8,0)

Reprecipitar com 7,5 M ACETATO DE AMÔNIO - ETANOL 100% (1:1)

Ressuspender em ETANOL 75 % .

Centrifugar 10.000 x g – 15 min - 4 °C

Ressuspender em TAMPÃO TE Modif. (10 mM Tris-HCl - 0,1 mM Na₂ EDTA)

Estocar a - 20 ° C / -70 ° C e/ ou proceder RT-PCR (5 µL de amostra)

OPÇÃO 2 :

PURIFICAR COLUNA SPIN

- Duas ressuspensões em H₂O MilliQ DEPC
- Eluir o volume retido em TE modificado

(amostra : 1- 5 µL de vol. retido) → síntese do cDNA (RT-PCR)

[* Concentrado purif. ostras (300 µL) + extrato fezes purif. Freon (200 µL)]

PROTOCOLO COMPLETO PARA EXTRAÇÃO DO RNA DE SRSVs , EM
CONCENTRADOS PURIFICADOS DE OSTRAS , COM AUXÍLIO DE COLUNA
SPIN MILLIPORE ®.

A. PARA O CONTROLE POSITIVO (Extrato de fezes positiva para SRSV)

1. Adicionar 50 µL de amostra em um microtubo com 450 µL de PBS estéril.
2. Homogeneizar (vortex) por 6 minutos.
3. Adicionar 500 µL de freon.
4. Homogeneizar (vortex) por 6 minutos.
5. Centrifugar a 200 x g por 30 minutos a 4 °C.
6. Separar o sobrenadante (FASE AQUOSA).
7. Adicionar 200 µL da FASE AQUOSA em um microtubo.
8. Acrescentar 1 mL de Trizol ® a 4 °C.
9. Misturar (vortex) por 15 segundos.
10. Acrescentar 200 µL de Clorofórmio a 4 °C.
11. Misturar (vortex) por 30 segundos.
12. Incubar por 5 minutos a 4 °C.
13. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C.
14. Adicionar 500 µL do sobrenadante, em um microtubo com 500 µL de isopropanol a 4 °C.
15. Misturar (vortex).
16. Incubar por 15 minutos a 4° C.
17. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4° C.
18. Inverter o microtubo e secar sua borda com gaze estéril.
19. Acrescentar ao centrifugado , 800 µL de Etanol 75° C a 4° C.
20. Misturar (vortex) por 5 - 10 segundos.
21. Centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos a 4° C.
22. Desprezar o sobrenadante.
23. Secar o centrifugado por inversão do microtubo , em papel de filtro estéril.
24. Adicionar ao centrifugado, 20 µL de H2O MilliQ - DEPEC.
25. Estocar a - 70 °C e/ou proceder a RT-PCR.

B. Para um concentrado purificado de ostra (s).

1. Adicionar 200 µL de um concentrado purificado em um microtubo.
2. Acrescentar 1 mL de Trizol ® a 4 °C.
3. Misturar (vortex) por 15 segundos.
4. Acrescentar 200 µL de Clorofórmio.
5. Misturar (vortex) por 30 segundos.
6. Incubar por 5 minutos a 4 °C.
7. Centrifugar a 10.000 x g por 15 min a 4 °C. Separar o sobrenadante (fase aquosa) e manter a 4 °C.

8. Purificação do RNA das amostras: O uso de uma coluna do método proposto para adenovírus (Hierholzer et al., 1993) foi testado, utilizando-se uma coluna de purificação ULTRAFREE-MC (Millipore, Corp.) com membrana de polissulfona de limite nominal de peso molecular igual a 100.000 daltons. Para a obtenção do ácido nucléico, foram adicionados ao recipiente retentor, 150 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1mM Na₂ EDTA; pH 8,0) e igual volume da fase aquosa, centrifugando-se a 2.000 x g por 5 minutos . A seguir adiciona-se ao volume retido sobre a membrana, 250 µL de tampão TE a 4 °C. Centrifuga-se novamente a 2.000 x g por 5 minutos. A superfície da membrana foi lavada com 20 µL de tampão TE modificado (10 mM Tris-HCl; 0,1 mM Na₂ EDTA; pH 8,0) a 4 °C, e este volume final foi transferido para um novo tubo que pode ser estocado a -20 °C ou - 70 °C ou utilizado para proceder imediatamente a RT-PCR.

RT-PCR = EXTRAÇÃO

SUSPENSÃO FECAL

CONCENTRADO
PURIFICADO
DE OSTRAS
(AMOSTRA B)

RT-PCR: Após a extração das amostras e do controle positivo (cedido pelo CDC-USA) procedeu-se a RT-PCR. Esta metodologia utilizou o sistema Super Script ONE-STEP RT-PCR® (Gibco-BRL). As reações (com volume final de 50 µL) foram realizadas em cada tubo, a partir de 25 µL do tampão de reação 2 x concentrado (2,4 mM MgSO₄; 0,4 mM de cada dNTP; 4 µg/mL de albumina sérica bovina); 13 µL de solução (5mM MgSO₄), para concentração final de 2,5 mM MgSO₄; 1,5 µL de uma solução a 10 mM de dNTPs, para concentração de 2,0 mM de dNTPS; 0,5 µL de cada primer a 50 µM para concentração de 0,5 µM; água ultrapura (MilliQ-Millipore) com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC – Sigma) – 50 µL (q.s.p.); 5,0 µL de amostra e 1,0 µL de mistura das enzimas SUPER SCRIPT II RT e Taq DNA polymerase recombinante (em tampão 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,1 mM Na₂ EDTA; 1 mM DTT; 50% glicerol (v/v); e estabilizante). A mistura foi recoberta com 30 µL de óleo mineral estéril (Sigma) e transferida para um termociclador Mini Cyclor (MJ Research), estabelecido com o seguinte programa:

1 ciclo de transcrição reversa a 42°C, 60 minutos;

1 ciclo de desnaturação a 94° C, 3 minutos;

40 ciclos sucessivos a :

94° C, por 60 segundos;

48° C, por 90 segundos;

60° C, por 120 segundos;

e uma extensão adicional a 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados (10 µL de cada amostra) foram submetidos a corrida de eletroforese em gel de agarose (Gibco-BRL), a 2%(w/v) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (EtdBr-Sigma) em tampão TBE (89 mM – Tris H Cl; 89 mM H₃ BO₃; 2 mM Na₂ EDTA; pH 8,3) durante 45 min. a 100 volts., visualizados sobre transluminador de U.V., e comparados ao controle positivo e ao marcador de peso molecular (100 pb Ladder Gibco-BRL).

RT - PCR : CONDIÇÕES DA REAÇÃO

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO INICIAL	VOLUME	CONCENTRAÇÃO FINAL
2 X TAMPÃO DE REAÇÃO (Mg SO4) (d NTPs)	2,4 mM 1,6 mM	25,0 mL	1,2 mM 0,8 mM
Mg SO4 adicional d NTPs adicionais	5,0 mM 10,0 mM	13,0 mL 1,5 mL	1,3 mM 1,2 mM
AGUA DEPC (MilliQ)	-	50,0 mL (q.s.p.)	-
PRIMER	50,0 mM	0,5 mL	0,5 mM
AMOSTRA	-	5,0 mL	-
ENZIMAS (Super Script II RT) (Taq DNA polimerase) (Tris-HCl) (NaCl)	20,0 mM 100,0 mM	1,0 mL	0,4 mM 2,0 mM
ÓLEO MINERAL	-	30,0 mL	-
CICLOS DE TEMPERATURA : 42 °C – 60 min. – (síntese do cDNA) 94 °C - 3 min. - (pré-desnaturação) 40 ciclos sucessivos [94°C - 60”(desnaturação) 48°C - 90”(anexamento) 60°C – 120”(extensão) 72 °C - 7 min. - (extensão final) → (4° C)			

Iniciadores ('primers'): Dois conjuntos de primers para a detecção dos genogrupos G1 e G2 foram utilizados, baseados em seqüências da região da RNA polimerase respectivamente do genogrupo 1 e de dois tipos de SRSVs (Seg. Ando et al.,1994), sintetizados no CDC Biotechnology Core Facility (CDC, Atlanta, Ga, USA).

Ambos os genogrupos são caracterizados na síntese da fita simples do cDNA pela reação com o primer antisense SR 33. Para a síntese da fita positiva, o grupo G1 pode ser identificado com a reação de um dos três primers: SR 48, SR 50 ou SR 52, que são adicionados em conjunto à reação, enquanto que, para o grupo G2, a reação é completada com o primer SR 46.

O primer SR 33 foi determinado segundo a seqüência da região YGDD da RNA polimerase. Os primers SR 48, SR 50, SR 52 e SR 46 foram determinados na região entre os domínios de ligação GLPSG e YGDD (Jiang et al., 1993; e Lambden et al., 1993). Ambos os conjuntos de primers determinam produtos com 123 bp.

Primers:

*SRSV-G1	seqüência (5'→3')	polaridade	nucleotideos
SR 33:	TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC	-	4856-4876
SR 48:	GTG AAC AGC ATA AAT CAC TGG	+	4754-4773
SR 50:	GTG AAC AGT ATA AAC CAC TGG	+	4754-4773
SR 52:	GTG AAC AGT ATA AAC CAT TGG	+	4754-4773
**SRSV-G2			
SR 33:	TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC	-	4856-4876
SR 46:	TGG AAT TCC ATC GCC CAC TGG	+	4754-4773

* ref. à seqüência do genoma do vírus Norwalk (M87661).

**ref. às seqüências dos vírus Snow Mountain e vírus Hawaii.

Hibridação pelo Southern blot e detecção pela quimioluminescência.

Para a detecção do produto amplificado, foram utilizadas sondas específicas para o genogrupo G1 e genogrupo G2. A desnaturação dos produtos da reação RT-PCR, se fez pela imersão do gel em tampão desnaturante (0,5N NaOH; 1,5 M NaCl) durante uma hora, seguida de neutralização em solução a 0,5 M Tris- HCl; 1,5 M NaCl; pH 7,5 por 30 min. e de transferência durante 90 min. para membrana de nylon com carga positiva (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim, W.-Germany), com tampão 20 X SSC (3 M NaCl; 0,3 M $C_6H_5O_7Na_3$; pH 7,0), utilizando-se a cuba a vácuo Vacuum Blotter (BIO-RAD Labs.), montada segundo instruções do fabricante.

Após dois ciclos de imobilização do produto, com luz UV, no aparelho Ultraviolet Cross Linker (AMERSHAM International plc, Little Chalfont, Bucks, England, UK), a membrana foi pré-hibridada em tampão 5 x SSC; 0,02% (w/v) SDS; 1% (w/v) de reagente de bloqueio (BOEHRINGER Mannheim) por 3 h. a 58°C e hibridada, utilizando o tampão anterior acrescido de uma sonda marcada pela digoxigenina, para uma concentração final de 10 pmol/mL em Sistema

Hybridization Oven/Shaker (AMERSHAM, International), em tubos tipo “roller” durante 12 h., a 58°C. A membrana foi mantida por 3 h. em solução de bloqueio (100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl, 2% (w/v) de reagente de bloqueio; pH 7,6) substituindo-se por tampão de lavagem (100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl) durante 2 min. e a seguir por solução de bloqueio acrescida de conjugado anticorpo antidigoxigenina-fosfatase alcalina (anti-digoxigenin-AP Fab fragments – BOEHRINGER Mannheim), para concentração de 250 mU/mL, por 30 min.; tampão de lavagem, por duas vezes de 15 min.; e em tampão de equilíbrio (100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM Mg Cl₂; pH 9,5) por 5 minutos. A detecção prosseguiu adicionando-se 1 mL de LUMI-PHOS 530 (BOEHRINGER Mannheim) sobre a membrana, intercalando-a entre folhas de acetato, mantendo a 37°C por 30 min., e exposta a um filme X – OMat AR (EASTMAN KODAK CO., Rochester, N.Y.) por período variável (5-10 minutos), e revelando em câmara escura.

Descrição das sondas (marcadas com digoxigenina sintetizadas no CDC Biotechnology Core Facility-Ga,USA, cedidas por Dr. Tamie Ando_) :

SRSV

genogrupos:

*G1	. (grupo)	seqüência (5'→3')	(polaridade)	(região)
	filogenético)			nucleotídeos
SR-63d	(P1-A)	ACA TCA GGA GAG TGC CCA CT	-	4804-4823
SR-65d	(P1-A)	ACA TCA GGT GAT AAG CCA GT	-	4804-4823
SR-69d	(P1-A)	ACA TCG GGT GAT AGG CCT GT	-	4804-4823
**G2				
SR-61d	(P2-A)	ATG TCG GGG CCT AGT CCT GT	-	4804-4823
SR-47d	(P2-B)	ATG TCA GGG GAC AGG TTT GT	-	4804-4823
SR-67d	(P1-B)	ACA TCT GGT GAG AGA CCT GA	-	4804-4823

*Determinadas com base na seqüência de 4 SRSVs (cepas UK2); do vírus Norwalk e de outros 4 SRSVs, respectivamente.

**Determinadas com base na seqüência de 7 SRSVs (4 cepas UK1); de 12 SRSVs (5 cepas UK3 - 4 cepas UK4 - 2 SRSVs - e do vírus Snow Mountain); e de 2 SRSVs (2 cepas UK1), respectivamente.

Deteccão pela imunomicroscopia eletrônica (IME)

a) Soro - foi utilizado um "pool" de soros humanos processado segundo o método de Kisielius et al.,(1997) produzido na Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz (I.A.L.-S.Paulo), com diluição ótima de trabalho de 1:500 para imunomicroscopia eletrônica.

b) Reação de imunomicroscopia eletrônica (IME) – Um volume de 54 µL da suspensão purificada de ostra foi adicionado a 6 µL de antissoro diluído para uma diluição final de 1:500, em um microtubo de 1,5µL mantido a temperatura ambiente por 1 hora e, posteriormente, por 18 horas a 4°C. Uma gota desta mistura foi depositada sobre um bloco de ágar e, em seguida, uma grade de cobre de 300 mesh, previamente revestida com filme de "formvar" e carvão, foi anexada sobre a gota. Após a secagem, a grade foi submetida a coloração negativa, com uma gota de fosfotungstato de potássio a 2% (pH 6,4). Após um minuto de coloração, retirou-se o excesso do corante com papel de filtro e, em seguida, foi observada em um microscópio eletrônico Philips EM 400 T, operando a 80 Kv.

REAGENTES E SOLUÇÕES TAMPÃO

Extração e Concentração - (partículas virais)

Soluções necessárias :

- (1) Tampão de eluição (0,09 M glicina; 3% extrato de carne;
3,2 % Na Cl ; pH 9,5)

$C_2 H_5 NO_2$ 3,03 g

Na Cl 16,0 g

Extrato de carne 15,0 g

Água bidestilada , completar a 500,0 mL

Ajustar o pH com Na OH 1 N . Autoclavar , 121 ° C , 20 min .

Conservar a 4 °C .

- (2) Solução de clarificação (0,15 M $Na_2 H PO_4$)

$Na_2 H PO_4$ 2,25 g

Água bidestilada , completar a 150,0 mL

Autoclavar , 121 ° C , 20 min .

Conservar a 4 °C .

- (3) Solução tampão fosfato (PBS) , pH 7,0

$Na_2 H PO_4 \cdot 12.H_2O$ 2,65 g

$Na H_2 PO_4 \cdot 2.H_2O$ 0,405 g

Na Cl 8,183 g

Água bidestilada, completar a 1.000,0 mL

Acertar o pH e autoclavar , 121 °C, 20 min . Manter a 4 °C.

Extração do ácido nucleico viral (RNA)

Soluções necessárias :

- (1) Solução 7,5 M acetato de amônio

$\text{NH}_4 \text{C}_2 \text{H}_3 \text{O}_2$ 5,775 g

Água Milli-Q DEPC estéril10,0 mL

Filtrar em filtro de membrana (porosidade de 0,22 μ).

Conservar a 4 °C .

- (2) Tampão de eluição TE (10 mM Tris-H Cl , pH 8,0 ; 1 mM EDTA)

10 X concentrado

1 M Tris – H Cl 10,0 mL

0,5 M Na_2 EDTA 2,0 mL

Água Milli-Q DEPC estéril 88,0 mL

(Solução de uso : diluir 1:10 em H₂O milli-Q DEPC estéril)

Distribuir em microtubos . Conservar a - 20 °C .

- (3) Solução 1 M Tris – H Cl , pH 8,0

Tris - HCl 121,1 g

Água Milli-Q DEPC 800,0 mL

Ajuste o pH com HCl concentrado . Completar o volume para 1.000 mL em balão volumétrico . Distribuir em alíquotas e esterilizar em autoclave , 121 °C , 20 min . Manter a 4 °C .

(4) Solução 0,5 M EDTA , pH 8,0

Na₂ EDTA 2.H₂O 186,1 g

Água Milli-Q DEPC 800,0 mL

Ajuste o pH com NaOH granulado . Completar o volume para 1.000 mL em balão volumétrico . Distribuir em alíquotas e esterilizar em autoclave , 121 °C , 20 min .

Conservar a 4 °C .

(5) Tampão de eluição TE modificado (10 mM Tris-H Cl , pH 8,0 ; 0,1 mM EDTA)

10 X concentrado

1 M Tris - HCl 10,0 mL

0,5 M Na₂ EDTA 0,2 mL

Água Milli-Q DEPC estéril 89,8 mL

(Solução de uso : diluir 1: 10 em H₂O DEPC estéril)

Distribuir em microtubos . Conservar a - 20 °C .

RT - PCR

Soluções necessárias :

(1) Água Milli-Q DEPC - 0,1 %

C₆ H₁₀ O₅ 500,0 µL

Água Milli-Q 500,0 mL

Preparar em capela de exaustão , manter em repouso por 12 h.

Distribuir em frascos novos e estéreis. Autoclavar , 121 °C, 20 min .

Aliquotar em microtubos . Conservar a - 20 °C .

(2) Mistura de 10 mM dNTPs

100 mM	dATP		5,0 µL
100 mM	dTTP		5,0 µL
100 mM	dGTP		5,0 µL
100 mM	dCTP		5,0 µL

Água Milli-Q DEPC estéril 30,0 µL

Distribuir em microtubos . Manter a - 20 °C .

Eletroforese em gel de agarose

Soluções necessárias :

- (1) Tampão do gel e da corrida eletroforética TBE (89 mM Tris ; 89 mM H₃ BO₃ ; 2 mM EDTA , pH 8,3)

5 X concentrado

Tris base54,0 g

H₃ BO₃ 27,5 g

0,5 M Na₂ EDTA 20,0 mL

Água Milli-Q , completar a1.000,0 mL

Misture o Tris e o EDTA em 500 mL de água milli-Q .

Adicionar o ácido bórico . Completar o volume em
balão volumétrico de 1.000 mL . Autoclavar , 121 °C , 20 min.

Conservar a 4 °C .

(Solução de uso : diluir 1: 5 em água milli-Q)

- (2) Marcador de peso molecular (100 pb Ladder Gibco ®)

100 pb “ Ladder “ 2,0 µL

Corante azul de bromofenol 2,0 µL

Água milli-Q DEPC estéril 8,0 µL

Conservar a 4 °C .

- (3) Corante de corrida eletroforética Azul de bromofenol (“ loading dye “)

Azul de bromofenol 0,025 g
Glicerol 3,0 mL
Água milli-Q DEPC estéril 7,0 mL

Conservar a 4 °C .

- (4) Solução de Brometo de etídio (1 %)

Etd Br 1,0 g
Água Milli-Q DEPC estéril100,0 mL

Manusear com cuidado (produto carcinogênico) .

Agitar até dissolver . Conservar a 4 °C , em frasco ambar .

Transferência por Southern Blotting

Soluções necessárias :

- (1) Tampão de desnaturação (0,5 N Na OH ; 1,5 M Na Cl)

Na OH 20,0 g
Na Cl 87,7 g
Água bidestilada , completar a.....1.000,0 mL

Conservar a 4 °C .

- (2) Tampão de neutralização (0,5 M Tris-H Cl ; 1,5 M Na Cl, pH 7,5)

Tris - HCl 60,6 g
Na Cl 87,7 g
Água bidestilada 700,0 mL

Ajustar o pH com HCl concentrado. Completar o volume para 1.000 mL com água bidestilada em balão volumétrico.

Conservar a 4 °C .

- (3) Tampão de transferência 20 x SSC (3 M NaCl ; 0,3 M citrato de sódio ; pH 7,0)

NaCl 175,3 g

C₆H₅O₇Na₃ 88,2 g

Água bidestilada 800,0 mL

Ajustar o pH com HCl e completar o volume para 1.000 mL

Conservar a 4 °C .

- (4) Tampão de pré-hibridação (5 X SSC ; 0,02 % (w/v) SDS ;

1,0 % reagente de bloqueio)

5 X SSC : NaCl 43,83 g

C₆H₅O₇Na₃ 22,1 g

Água bidest. 800,0 mL

pH 7,0

H₂O bidest q.s.p. 1.000,0 mL | 200,0 mL
(pré-aquecido)

SDS 0,04 g

Reagente de bloqueio 2,0 g

Conservar a - 20 °C .

- (5) Tampão de hibridação

tampão de pré-hibridação 30,0 mL

sonda marcada com digoxigenina (para conc. final = 10 pmol/mL)

Conservar a - 20 °C .

- (6) Tampão 1 - Lavagem (100 mM Tris-H Cl; 150 mM Na Cl)
- 1 M Tris (pH 7,6) 100,0 mL
- 5 M Na Cl 30,0 mL
- Água bidestilada 870,0 mL
- Conservar a 4 °C .
- (7) Tampão 2 - Bloqueio
- tampão 1200,0 mL (pré-aquecido)
- reagente de bloqueio 4,0 g
- Ajustar o pH a 7,5. Conservar a - 20 °C .
- (8) Solução de bloqueio com Conjugado fosfatase alcalina / anti DIG
- tampão 2 30,0 mL (a 4 °C)
- conjugado (para conc. final = 250 mU / mL)... 10,0 µL
- Conservar a 4 °C .
- (9) Tampão 3 - Equilíbrio (100 mM Tris-H Cl ; 100 mM Na Cl ;
50 mM Mg Cl₂ ; pH 9,5)
- Tris-H Cl 12,1 g
- Água bidestilada 700,0 mL
- 5 M Na Cl 20,0 mL
- 1 M Mg Cl₂..... 50,0 mL
- Ajustar o pH vagarosamente com H Cl . Completar o volume
para 1.000 mL em balão volumétrico . Conservar a 4 ° C .

(10) Solução 1 M Mg Cl_2

$\text{Mg Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 10,15 g

Água bidestilada 50,0 mL

Conservar a 4 °C.

Resultados:

- Das duas amostras de ostras originárias da região de Bertioga, uma foi positiva para RNA de SRSV, tendo sido coletada no mês de janeiro de 1998 ([tabela 1](#)).
- Das amostras de Cananéia demonstrou-se a presença de RNA de SRSV em um entre 5 lotes, também com coleta no mesmo mês, e entre três lotes de amostras de Peruíbe, um foi positivo para RNA de SRSV.

Amostras de ostras naturalmente contaminadas (*Crassostrea spp.*) foram adquiridas de pontos de comercialização e processadas pelos procedimentos de extração das partículas virais e do ácido nucleico, e posterior detecção pela PCR e hibridação por Southern blot. Os resultados positivos foram obtidos a partir de 3 lotes com 1, 12, e 22 amostras respectivamente, consistindo de “pools” de estômagos com divertículos, indicando a presença de SRSVs de origem ambiental, como provável resultante da atividade filtradora destas ostras em águas poluídas por efluentes. Os três lotes de amostras (Bertioga 1-lote 7, Cananéia 98-lote 9, e Peruíbe 2-lote 11) foram positivos pela eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR quando comparadas a controles positivos de SRSVs (origem: CDC-USA). Estes resultados mostram claramente graus diferentes de sinal de intensidade de detecção entre essas três amostras ([fig. 3](#)). Os níveis de inibição da reação de RT – PCR por produtos inerentes aos tecidos das ostras podem ser exarcebados nas amostras de águas poluídas, o que resultou no desenvolvimento de métodos de processamento e de extração do ácido nucleico. A aplicação desses procedimentos de extração das amostras para a reação de RT-PCR foi estudada comparando-se os concentrados

purificados das ostras, com misturas de concentrados de ostras acrescidos de amostras purificadas de extratos fecais positivos para SRSV. Uma das comparações estabelecidas foi entre duas misturas de 300 µL de amostra, mais 200 µL de extrato fecal positivo. A primeira mistura teve um pré-tratamento com acetato de amônio e a seguir com etanol, e a segunda mistura não teve este tratamento, mas foi filtrada em coluna “spin” Ultrafree-MC®100.000(limite de peso molecular), Millipore Corp., com recuperação do sobrenadante. A primeira não apresentou resultados no gel da eletroforese ou hibridação. O resultado positivo da segunda mistura no gel de agarose foi a primeira evidência da eficácia desta coluna na eliminação de inibidores presentes nos concentrados purificados das ostras ([fig.2](#)) . Igual tratamento apenas por coluna não foi eficaz quando estabelecido nos extratos purificados fecais , optando-se pela extração e precipitação por isopropanol e purificação com etanol 75% ([fig. 1](#)).

Outras fases de tratamento também foram testadas anteriormente , como a inclusão de CTAB (cetil-trimethyl-amino-romide) no processo de extração do ácido nucleico de mistura similar a citada acima, na tentativa de neutralizar a ação dos inibidores, não surgindo efeito positivo . As três amostras positivas foram identificadas na reação de PCR com iniciadores (“primers”) construídos com base em sequências de vírus pertencentes ao genogrupo G2.

A transferência do gel para membrana de nylon com posterior detecção por sondas específicas do genogrupo G2 não foi evidenciada, ocorrendo apenas com o controle positivo ([fig. de transferência](#) - anexa ao gel da [fig.3](#)).

DISCUSSÃO:

Moluscos bivalves possuem características específicas que dificultam as análises virológicas de seus tecidos: a baixa concentração de partículas virais faz com que não seja suficiente o uso de métodos simples de extração para a recuperação dos ácidos nucleicos, e posterior detecção na reação de PCR, em conjunto com uma quantidade significativa de substâncias presentes nestas amostras, inerentes ou não às mesmas, que interferem ou inibem a amplificação do ácido nucleico alvo. A proposta do presente trabalho, foi de tentar elucidar esses fatores, minimizando-os, em relação à análise viral, em ostras de nossas costas marinhas.

De acordo com Cliver et al., (1983b) os métodos de processamento dos tecidos de uma espécie de ostra, nem sempre são aplicáveis a outras, podendo um procedimento simples não ser igualmente efetivo para várias espécies.

Os resultados obtidos não refletiram, efetivamente, estas observações, já que amostras bem distintas em tamanho e forma, com cerca de 50mm, 70mm, e 160mm, de comprimento, provindas de três regiões diferentes do litoral do Estado de S. Paulo, sugeriram serem classificadas como espécies diferentes, sendo que todas, quando submetidas à mesma metodologia em conjunto, demonstraram a presença de RNA viral do grupo SRSV, na RT-PCR.

A preferência pelo uso de tecidos específicos, como o estômago e seus divertículos, ao invés da ostra inteira, baseou-se em duas razões. Primeiramente, em evidências que o processo digestivo da ostra não inativa todos os microrganismos, incluindo vírus associados à matéria particulada (Hedstrom & Lycke, 1964; Bonadonna et al., 1990). Em segundo lugar, Romalde et al., (1994) e Atmar et al., (1995) estabeleceram que uma melhor detecção viral nestes órgãos é possível pela simplicidade, maior rapidez de processamento e aumento da sensibilidade com diminuição da interferência da amostra na reação de RT-PCR, que é maior do que quando a mesma é composta da ostra inteira.

A extração das partículas virais foi desenvolvida com uma metodologia rápida, simples e de baixo custo, combinando procedimentos de adsorção/eluição, segundo Regan et al., (1993) com as observações de De Leon et al., (1986) em relação a presença de um tampão alcalino com alta condutividade, e composto de glicina, mais extrato de carne para atuar como matéria orgânica adicional, facilitando assim a adsorção dos vírus, e auxiliando na etapa seguinte da precipitação. (Richards et al., 1982; Croci et al., 1993 e Bouchriti et al., 1994).

Esta próxima etapa foi adaptada a partir do trabalho clássico de Lewis & Metcalf, (1988) e da metodologia de Lees et al., (1994), utilizando o PEG 6000, um polímero orgânico que forma uma fase coloidal, e incorpora as partículas virais diminuindo o volume da amostra.

A alta performance desta técnica também foi confirmada por Candeias,(1993) em trabalhos experimentais com rotavírus,quando em comparação com outras metodologias de precipitação viral.

A dissolução do precipitado com solução de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ a 0,15M se deu com agitação manual por 30 minutos, sem auxílio de sonicação, que é uma etapa de rotina em muitos protocolos correlatos.

A incorporação do Freon para remoção de lipídeos (Mitchell et al., 1966; Cliver, 1979) foi precedida em duas etapas para assegurar melhor purificação do extrato (Dix & Jaykus, 1998).

O preparo da amostra teste composta de um "mix" do extrato de fezes contaminado por SRSV, mais extrato purificado do bivalve, seguiram as mesmas determinações de Bouchriti & Goyal, (1993) e de Dix & Jaykus, (1998) que trabalharam com os mesmos tipos de misturas, mas utilizando extratos de mariscos.A eficiência do TRIzol® (Simms et al., 1993/94), um composto de isotiocianato de guanidina mais fenol ácido, justifica-se na lise da partícula viral, na proteção do RNA à digestão enzimática, eliminando inibidores, além da maior rapidez no tempo de processamento (Lees et al., 1995; Shieh et al., 1995; Johansen & Grinde, 1996; Häfliger et al., 1997).

A concentração de polissacarídeos presentes nos tecidos das ostras, conduz a inibição da PCR,pois amostras negativas de concentrados purificados, podem se tornar positivas ao serem diluídas ou após a extração dos mesmos (Wilson, 1997). A atividade inibitória, persistindo a despeito do método de processamento, tem

como consequência o desenvolvimento de novos tratamentos para remoção destas substâncias.

O brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), um detergente catiônico, tem sido usado para remover polissacarídeos em extratos de ostras, em métodos de detecção de SRSVs por PCR (Gouvea et al., 1994; Le Guyader et al., 1996; Sugieda et al., 1996). Entretanto Jaykus et al., (1995) não observaram efetividade neste método, na detecção molecular do vírus Norwalk em ostras artificialmente contaminadas, sugerindo a não precipitação das partículas virais, ou a degradação do RNA genômico durante este tratamento.

Atmar et al., (1995) também não obtiveram resultados com o mesmo tratamento em extratos de ostras inteiras, artificialmente contaminadas com o vírus Norwalk, persistindo o grau de inibição, mas chegaram a resultados positivos quando analisaram extratos de estômagos e divertículos, no mesmo tipo de experimento.

Do método desenvolvido neste trabalho, utilizando o CTAB na etapa da extração e precipitação, não surgiram resultados positivos, quando testado no "mix" (amostra do concentrado fecal positivo mais concentrado de estômago/divertículos de ostra), não sendo demonstrados nos resultados da RT-PCR, ou na transferência por Southern blot. Um segundo método utilizado na extração do ácido nucleico, foi testado e se resumiu em acoplar um tratamento com acetato de amônio, nas mesmas etapas acima citadas.

Goswami et al., (1993) estabeleceram uma metodologia de extração do ácido nucleico do vírus da

hepatite A, em mariscos, com remoção de polissacarídeos, por lavagens sucessivas com solução a 3M de acetato de sódio, que também foi utilizado em experimentos com ostras artificialmente contaminadas pelo vírus Norwalk (Atmar et al., 1996). Raina & Chandlee, (1996) provaram a eficácia do tratamento com soluções de acetato de sódio a 3M e acetato de amônio a 7,5M, na remoção de polissacarídeos do fungo *Sclerotinia homoeocarpa*, facilitando a amplificação do seu DNA genômico.

Um tratamento com acetato de amônio a 2,5M, incorporado antes da precipitação pelo etanol, foi testado e aprovado com eficiência de 90% na remoção de proteínas em soluções de DNA, adicionadas com albumina sérica bovina (Crouse & Amorese, 1997). Os testes aqui realizados com acetato de amônio a 7,5M não foram eficientes na remoção de polissacarídeos do "mix" (extrato da suspensão fecal positiva mais concentrado purificado da ostra) – (Fig 2, canaleta 2) .

A exclusão de moléculas menores do que as partículas virais pode ser obtida através da ultrafiltração (Cliver et al., 1983a). Esta técnica tem sido implementada em análises do vírus da hepatite A, de amostras ambientais, por RT-PCR (Tsai et al., 1993, 1994; Jothikumar et al., 1998). Divizia et al., (1993) em análises semelhantes, utilizaram membranas de ultrafiltração compostas por polisulfona com especificação de 10.000 daltons, em relação ao limite de peso molecular (N.M.W.L.) das substâncias que atravessam a mesma. O presente estudo também utilizou membranas idênticas, com limite de peso

molecular igual a 100.000 daltons , para melhor exclusão das substâncias inibidoras.

Os tampões TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0 -- 1mM EDTA) e TE modificado (10mM Tris – HCl, pH 8,0--0,1mM EDTA) foram utilizados para ressuspender os produtos não filtrados na coluna e sua manutenção posterior, respectivamente (para uso imediato na RT-PCR e ou congelamento em freezer a – 20°C, por até 3 dias), baseando-se nos experimentos de Lees et al., (1994) e Raina & Chandlee , (1996).

O pH específico alcalino em torno de 8,0 para os tampões TE e TE modificado, são mais efetivos do que os pH neutros ou ácidos, na preservação do RNA (Klebe et al., 1996).

A detecção de amplicons pela RT-PCR em três amostras de ostras naturalmente contaminadas, propõe um padrão de detecção diferente do estabelecido por Green et al., (1998), quando sugeriram que este tipo de detecção ocorre freqüentemente apenas na transferência por Southern blot. A não hibridação e detecção de nossas amostras por sondas construídas com base em cepas do genogrupo G2 não se mostraram relevantes, visto que Ando et al. (1995),trabalhando com sondas (SR 61 d e SR 67 d) construídas segundo a sequência de uma cepa também pertencente ao genogrupo G2, não detectaram o produto na transferência por Southern blot, e sim apenas no gel da RT- PCR. Em nosso estudo, esta ausência de detecção provou não se tratar de contaminação pela amostra controle, e a caracterização dessas amostras como sendo pertencentes ao grupo G2,

confirma seu crescente predomínio na época atual (Green et al., 1998), e de sua presença em nosso meio ambiente.

A interpretação dessa pesquisa pode não ser imediata, visto que o significado de se detectar o ácido nucleico não prova a presença da partícula infecciosa, entretanto, atualmente, este procedimento já serve como ferramenta na investigação de surtos da doença (Beller et al., 1997) para determinação da fonte de contaminação e padrão da transmissão (Cromeans, 1997), quando feita a comparação das seqüências dos vírus isolados a partir dos pacientes, com as seqüências dos vírus isolados das possíveis fontes, incluindo água de abastecimento e alimentos. Entretanto Le Guyader et al., (1994) confirmam esse significado, baseando -se na facilidade com que o RNA pode ser degradado na água marinha (Pichards & Paul, 1991). Evidências de detecção de partículas infecciosas do vírus da hepatite A em 25% de extratos de bivalves positivos pela RT-PCR, foram obtidas por Crance et al., (1995).

Estes isolamentos podem também representar modelos na construção de novas sondas para caracterização molecular desses SRSVs. A identificação de partículas virais morfológica e antigenicamente semelhantes aos SRSVs, na imunomicroscopia eletrônica (IME), comprovou a detecção molecular em uma amostra ([tabela 2](#) - [figura 4.](#))

A sensibilidade da IME está em 10^5 partículas/mL (Estes et al., 1997) e da PCR em 0,2 partículas/grama de tecido da ostra (Jaykus et al., 1996), e apesar da baixa

sensibilidade, a IME demonstrou ser de grande valia na confirmação de uma amostra positiva pela detecção molecular, além de comprovar que a metodologia inicial de extração viral, foi adequada para a obtenção do concentrado purificado.

CONCLUSÕES

. A metodologia de adsorção – eluição e precipitação por polietilenoglicol (PEG 6000) para extração e concentração das partículas virais demonstrou - se adequada , visto ter sido comprovada pelos resultados da imunomicroscopia eletrônica (IME) .

. Os procedimentos de extração e purificação do ácido nucleico foram aprovados incluindo a etapa de filtração e exclusão de compostos inibidores da reação de RT-PCR , com o uso de uma coluna spin de polissulfona .

. A detecção de genomas virais de SRSVs , pertencentes ao genogrupo G2 em ostras naturalmente contaminadas , pode contribuir para novas pesquisas em relação a esses , e a outros grupos de vírus com significado epidemiológico , quando presentes em moluscos bivalves.

REFERÊNCIAS *:

- ADAK, G.K.; CAUL, E.O.; COWDEN, J.M. Infection with small round structured viruses: England and Wales 1981-1990. **Commun. Dis. Rep.**, **13**: R141-44, 1991 apud CURRY, A., 1994, p.693.
- ADLER, J.L. & ZICKL, R. Winter vomiting disease. **J. Infect. Dis.**, **119**: 668-73, 1969.
- ANDO, T.; MULDER, M.N.; LEWIS, D.C.; ESTES, M. K.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I. Comparison of the polymerase region of small round structured virus strains previously classified in three antigenic types by solid-phase immune electron microscopy. **Arch. Virol.**, **135**: 217-26, 1994.
- ANDO, T., MONROE, S.S.; GENTSCH, J.R.; JIN, Q.; LEWIS, D.C.; GLASS, R.I. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and Southern hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 64-71, 1995.
- APPLETON, H. & PEREIRA, M.S. A possible virus aetiology in outbreaks of food-poisoning from cockles. **Lancet**, **1**: 780-81, 1977.
- APPLETON, H.; PALMER, S.R.; GILBERT, R.J. Foodborne gastroenteritis of unknown aetiology: a virus infection? **Br. Med. J.**, **282**: 1801-02, 1981.
- ATMAR, R.L.; METCALF, T.G.; NEILL, F.H.; ESTES, M.K. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**: 631-35, 1993.
- ATMAR, R.L.; NEILL, F.H.; ROMALDE, J.L.; LE GUYADER, F.; WOODLEY, C.M.; METCALF, T.G.; ESTES, M.K. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish with the PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 3014-18, 1995.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas:

NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals Indexed in Index Medicus.

Bethesda: NLM, 1997

- ATMAR, R.L.; NEILL, F.H.; WOODLEY, C.M.; MANGER, R.; FOUT, G.S.; BURKHARDT, W.; LEJA L.; Mc GOVERN, E.R.; LE GUYADER, F.; METCALF, T.G.; ESTES, M.K. Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 254-58, 1996.
- BARNETT, B. Viral gastroenteritis. **Med. Clin. North. Am.**, **67**: 1031-58, 1983 .
- BAYEVA, L.Y.; SHIRMAN, G.A.; GINEVSKAYA, V.A.; KUCHARSKÁ, Z.; DOTLACILOVÁ, L.; DANES, L.; KAZANTSEVA, V.A.; DROZDOV, S.G. Using different sorbents for the concentration of enteroviruses. **J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.**, **34**: 199-205, 1990.
- BEDFORD, A.J.; WILLIAMS, G.; BELLAMY, A.R. Virus accumulation by the rock oyster *Crassostrea glomerata*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **35**: 1012-18, 1978.
- BELLER, M.; ELLIS, A.; LEE, S.H.; DREBOT, M.A.; JENKERSON, S.A.; FUNK, E.; SOBSEY, M.D.; SIMMONS, O.D.III; MONROE, S.S.; ANDO, T.; NOEL, J.; PETRIC, M.; MIDDLEAUGH, J.P.; SPIKA, J.S. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. **J. Am. Med. Assoc.**, **278**: 563-68, 1997.
- BERKE, T.; GOLDING, B.; JIANG, X.; CUBITT, D.W.; WOLFAARDT, M.; SMITH, A.W.; MATSON, D.O. Phylogenetic analysis of the Caliciviruses. **J. Med. Virol.**, **52**: 419-24, 1997.
- BLACK, R.E.; GREENBERG, H.B.; KAPIKIAN, A.Z.; BROWN, K.H.; BECKER, S. Acquisition of serum antibody to Norwalk virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. **J. Infect. Dis.**, **145**: 483-89, 1982.
- BLACKLOW, N.R. & GREENBERG, H.B. Viral gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.**, **325**: 252-64, 1991.

- BLACKLOW, N.R.; CUKOR, G.; BEDIGIAN, M.K.; ECHEVERRIA, P.; GREENBERG, H.B.; SCHREIBER, D.S.; TRIER, J.S. Immune response and prevalence of antibody to Norwalk enteritis virus as determined by radioimmunoassay. **J.Clin.Microbiol.**, **10**: 903-09,1979.
- BOHER, S. & SCHWARTZBROD, L. Study of viral purification of oysters. **Water Sci. Technol.**, **27**: 55-60,1993.
- BOHER, S.; BERIL, C.; TERVER, D.; SCHWARTZBROD, L. Comparison of two methods for the recovery of rotavirus from mussels and oysters. **Water Sci. Technol.**, **24**: 423-26, 1991.
- BONADONNA, L.; VOLTERRA, L.; AULICINO, F.A.; MANCINI, L. Accumulation power of some bivalve molluscs. **Mar. Pollut. Bull.**, **21**: 81 - 4, 1990.
- BONANNO, V.M.S.; MARTINEZ, S.C.G.L.; SATO, M.I.Z. Isolation and identification of enteroviruses from seawater samples of São Paulo beaches using cell culture. IXth National Meeting of Virology. **Virus: Rew. Res.**, **3** (suppl. 1): 99, 1998.
- BOUCHRITI, N. & GOYAL, S.M. Methods for the concentration and detection of human enteric viruses in shellfish: a review. **Microbiologica**, **16**: 105-14, 1993.
- BOUCHRITI, N.; GOYAL, S.M.; MARRAKCHI, A.E.; JELLAL, M. Comparison of three methods for the concentration of poliovirus from moroccan shellfish. **J. Food Prot.**, **57**: 996-1000, 1994.
- BRONDUM, J.; SPITALNY, K.C.; VOGT, R.L.; GODLEWSKI, K.; MADORE, H.P.; DOLIN, R. Snow Mountain agent associated with an outbreak of gastroenteritis in Vermont. **J. Infect. Dis.**, **152**: 834-37, 1985.
- CANDEIAS, J.M.G. Modelo experimental de captura e eliminação de rotavirus por ostras: avaliação de métodos de concentração de rotavirus SA-11. São Paulo, 1993, 126 p.(Dissertação de Mestrado-Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo).

- CARTER, M.J. Transcription of feline calicivirus RNA. **Arch. Virol.**, **114** : 143-52, 1990.
- CARTER, M.J. & CUBITT, W.D. Norwalk and related viruses. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, **8**: 403-09, 1995.
- CARTER, M.J.; MILTON, I.D.; MEANGER, J.; BENNETT, M.; GASKELL, R.M.; TURNER, P.C. The complete nucleotide sequence of a feline calicivirus. **Virology**, **190**: 443-48, 1992.
- CAUL, E.O. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part II. The epidemiological perspective. **J. Clin. Pathol.**, **49**: 959-64, 1996.
- CAUL, E.O. & APPLETON, H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. **J. Med. Virol.**, **9**: 257-65, 1982.
- CAUL, E.O.; ASHLEY, C.; PETHER, J.V.S. "Norwalk"-like particles in epidemic gastroenteritis in the U.K. **Lancet**, **2**: 1292, 1979.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Viral agents of gastroenteritis: public health importance and outbreak management. **MMWR**, **39**: 1-24, 1990.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of oysters-Apalachicola Bay, Florida, December 1994-January 1995. **MMWR**, **44**: 37-9, 1995.
- CHADWICK, P.R. & McCANN, R. Transmission of a small round structured virus by vomiting during a hospital outbreak of gastroenteritis. **J. Hosp. Infect.**, **26**: 251-59, 1994.
- CHALMERS, J.W.T. & McMILLAN, J.H. An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. **Epidemiol. Infect.**, **115**: 163-67, 1995.

- CHAMPSAUR, H. Gastro-enterites virales. **Encycl. Med. Chir. Maladies Infectieuses**, **8055a**, **4**: 1-13, 1989
apud SCHWARTZBROD, L. & BOHER, S., 1993, p. 313.
- CHANG, J.C.H.; OSSOFF, S.F.; LOBE, D.C.; DORFMAN, M.H.; DUMAIS, C.M.; QUALLS, R.G.; JOHNSON, J.D. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, **49**: 1361-65, 1985.
- CHOMCZYNSKY, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, **162**: 156-59, 1987.
- CHRISTENSEN, M.L. Human viral gastroenteritis. **Clin. Microbiol. Rev.**, **2**: 51-89, 1989.
- CLIVER, D.O. Viral infections. IN: Riemann, H.; Bryan, F.L. (Eds.). Food-borne infection and intoxications. San Diego: Academic Press, 1979. p. 299-342.
- CLIVER, D.O. Viral foodborne disease agents of concern. **J. Food Prot.**, **57**: 176-78, 1994a.
- CLIVER, D.O. Epidemiology of viral foodborne disease. **J. Food Prot.**, **57**: 263-66, 1994b.
- CLIVER, D.O.; ELLENDER, R.D.; SOBSEY, M.D. Methods for detecting viruses in foods: background and general principles. **J. Food Prot.**, **46**: 248-59, 1983a.
- CLIVER, D.O.; ELLENDER, R.D.; SOBSEY, M.D. Methods to detect viruses in foods: testing and interpretation of results. **J. Food Prot.**, **46**: 345-57, 1983b.
- CRANCE, J.M.; APAIRE-MARCHAIS, V.; LEVEQUE, F.; BERIL, C.; LE GUYADER, F.; JOUAN, A.; SCHWARTZBROD, L.; BILLAUDEL, S. Detection of hepatitis A virus in wild shellfish. **Mar. Pollut. Bull.**, **30**: 372-75, 1995.

- CROCI, L.; DE MEDICI, D.; DIVIZIA, M.; GABRIELI, R.; TOTI, L.; PANA, A. Recovery of poliovirus type 1 from experimentally contaminated shellfish: evaluation of different methods. **Water Sci. Technol.**, **27**: 45-8, 1993.
- CROMEANS, T.L. Understanding and preventing virus transmission via foods. **Food Technol.**, **51**: 20, 1997.
- CROUSE, J. & AMORESE, D. Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. **Focus**, **19**: 13-6, 1997.
- CUBITT, W.D. Diagnosis, occurrence and clinical significance of the human "candidate" caliciviruses. **Progr. Med. Virol.**, **36**:103-19, 1989.
- CUBITT, W.D.; BLACKLOW, N.R.; HERRMANN, J.E.; NOWAK, N.A.; NAKATA, S.; CHIBA, S. Antigenic relationships between human caliciviruses and Norwalk virus. **J. Infect. Dis.**, **156**: 806-14, 1987.
- CUBITT, W.D.; JIANG, X.J.; WANG, J.; ESTES, M.K. Sequence similarity of human caliciviruses and small round structured viruses. **J. Med. Virol.**, **43**: 252-58, 1994.
- CUBITT, D.; BRADLEY, D.W.; CARTER, M.J.; CHIBA, S.; ESTES, M.K.; SAIF, L.J.; SCHAFFER, F.L.; SMITH, A.W.; STUDDERT, M.J.; THIEL, H.J. *Caliciviridae*. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Arch. Virol.**, (suppl. 10): S359-S63, 1995.
- CUKOR, G.; BLACKLOW, N.R.; ECHEVERRIA, P.; BEDIGIAN, M.K.; PURUGGAN, H.; BASACA-SEVILLA, V. Comparative study of the acquisition of antibody to Norwalk virus in pediatric populations. **Infect. Immun.**, **29**: 822-23, 1980.
- CURRY, A.; CHADWICK, P.R.; CAUL, E.O. Small round viruses and gastroenteritis. **Lancet**, **344**: 693-94, 1994.

- DE LEON, R.; PAYNE, H.A.; GERBA, C.P. Development of a method for poliovirus detection in freshwater clams. **Food Microbiol.**, **3**: 345-49, 1986.
- DE LEON, R.; MATSUI, S.M.; BARIC, R.S.; HERRMANN, J.E.; BLACKLOW, N.R.; GREENBERG, H.B.; SOBSEY, M.D. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 3151-57, 1992.
- DEL SAL, G.; MANFIOLETTI, G.; SCHNEIDER, C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. **BioTechniques**, **7**: 514-20, 1989.
- DIENSTAG, J.L.; LUCAS, C.R.; GUST, I.D.; WONG, D.C.; PURCELL, R. H. Mussel-associated viral hepatitis, type A: serological confirmation. **Lancet**, **7959**: 561-64, 1976.
- DIGIROLAMO, R.; LISTON, J.; MATCHES, J.R. Survival of virus in chilled, frozen and processed oysters. **Appl. Microbiol.**, **20**: 58-63, 1970.
- DI GIROLAMO, R.; LISTON, J.; MATCHES, J. Uptake and elimination of poliovirus by West Coast oysters. **Appl. Microbiol.**, **29**: 260-64, 1975.
- DI GIROLAMO, R.; LISTON, J.; MATCHES, J. Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. **Appl. Environ. Microbiol.**, **33**: 19-25, 1977.
- DIMITROV, D.H.; DASHTI, S.A.H.; BALL, J.M.; BISHBISHI, E.; ALSAEID, K.; JIANG, X.; ESTES, M.K. Prevalence of antibodies to human caliciviruses (HuCVs) in Kuwait established by ELISA using baculovirus-expressed capsid antigens representing two genogroups of HuCVs. **J. Med. Virol.**, **51**: 115-18, 1997.
- DINGLE, K.E.; LAMB DEN, P.R.; CAUL, E.O.; CLARKE, I.N. Human enteric *Caliciviridae* : the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. **J. Gen. Virol.**, **76**: 2349-55, 1995.

- DIVIZIA, M.; MORACE, G.; GABRIELI, R.; PISANI, G.; PANÀ, A. Application of the PCR technique to the detection of hepatitis A virus in the environment. **Water Sci. Technol.**, **27**: 223-25, 1993.
- DIX, A. B. & JAYKUS, L. A. Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams. **J. Food Prot.**, **61**:458-65, 1998.
- DOLIN, R.; BLACKLOW, N.R.; DuPONT, H.; BUSCHO, R.F.; WYATT, R.G.; KASEL, J.A.; HORNICK, R.; CHANOCK, R.M. Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **140**: 578-83, 1972.
- DOLIN, R.; REICHMAN, R.C.; ROESSNER, K.D.; TRALKA, T.S.; SCHOOLEY, R.T.; GARY, W.; MORENS, D. Detection by immune electron microscopy of the Snow Mountain agent of acute viral gastroenteritis. **J. Infect. Dis.**, **146**: 184-89, 1982.
- ERLICH, H.A; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, **252**: 1643-51, 1991.
- ESTES, M.K. & HARDY, M.E. Norwalk virus and other enteric caliciviruses. IN: Blaser, M. ; Smith, R.; Ravdin, J.; Greenberg, H.; Guerrant, R.(Eds.) Infections of the gastrointestinal tract. New York : Raven, apud METCALF, T.G., 1995, p. 475.
- ESTES, M.K.; ATMAR, R.L.; HARDY, M.E. Norwalk and related diarrhea viruses. IN: Richman, D.D.; Whitley, R.J.; Hayden, F.G. (Eds.). Clinical virology. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 1073- 95.
- GABBAY, Y.B.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S.; CARCAMO, C.; ESTES, M.K.; MASCARENHAS, J.D.P.; LINHARES, A.C. Prevalence of antibodies to Norwalk virus among Amerindians in isolated Amazonian communities. **Am. J. Epidemiol.**, **139**: 728-33, 1994.
- GAILLOT, D.; TERVER, D.; FINANCE, C.; SCHWARTZBROD, L. Improved method for contamination of mussels by poliovirus. **Int. J. Food Microbiol.**, **6**: 333-39, 1988.

- GALTSOFF, P.S. IN : Ruppert , E.E. & Barnes , R.D. (Eds.). Zoologia dos invertebrados . São Paulo : Roca, 1996, p.439.
- GANTZER, C.; DUBOIS, E.; CRANCE, J.M.; BILLAUDEL, S.; KOPECKA, H.; SCHWARTZBROD, L.; POMMEPUY, M.; LE GUYADER, F. Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. **Oceanol. Acta**, **21**: 983-92, 1998.
- GARY, G.W. Jr .; KAPLAN, J.E.; STINE, S.E.; ANDERSON, L.J. Detection of Norwalk virus antibodies and antigen with a biotin-avidin immunoassay. **J. Clin. Microbiol.**, **22**: 274-78, 1985.
- GERBA, C.P. Viral disease transmission by seafoods . **Food Technol.**, **42**: 99-103, 1988.
- GERBA, C.P. & GOYAL , S.M. Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: a review. **J. Food Protect.**, **41**: 743-54, 1978.
- GERBA, C.P.; ROSE, J.B.; SINGH, S.N. Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. **CRC Crit. Rev. Environ. Control**, **15**: 213-36, 1985.
- GILL, O.N.; CUBITT, W.D.; McSWIGGAN, D.A.; WATNEY, B.M.; BARTLETT, C.L.R. Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. **Br. Med. J.**, **287**: 1532 - 34, 1983.
- GOSWAMI, B.B.; KOCH, W.H.; CEBULA, T.A. Detection of hepatitis A virus in *Mercenaria mercenaria* by coupled reverse transcription and polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**: 2765-70, 1993.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C.; ESTES, M.K. Identification of Norwalk virus in artificially seeded shellfish and selected foods. **J. Virol. Methods**, **48**: 177-87, 1994.
- GOYAL, S.M. Viral pollution of the marine environment. **CRC Crit. Rev. Environ. Control**, **14**: 1-32, 1984.

- GOYAL, S.M.; GERBA, C.P.; MELNICK, J.L. Human enteroviruses in oysters and their overlying waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **37**: 572-81, 1979.
- GRABOW, W.O.K.; IDEMA, G.K.; COUBROUGH, P.; BATEMAN, B.W. Selection of indicator systems for human viruses in polluted seawater and shellfish. **Water Sci. Technol.**, **21**: 111-17, 1989.
- GREEN, J.; NORCOTT, J.P.; LEWIS, D.; ARNOLD, C.; BROWN, D.W.G. Norwalk-like viruses: demonstration of genomic diversity by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 3007-12, 1993.
- GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; NORCOTT, J.P.; LEWIS, D.; BROWN, D.W.G. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. **J. Med. Virol.**, **47**: 392-98, 1995.
- GREEN, J.; HENSHILWOOD, K.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W.G.; LEES, D.N. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**: 858-63, 1998.
- GREEN, S.M.; DINGLE, K.E.; LAMBDEN, P.R.; CAUL, E.O.; ASHLEY, C.R.; CLARKE, I.N. Human enteric *Caliciviridae* : a new prevalent small round-structured virus group defined by RNA-dependent RNA polymerase and capsid diversity. **J. Gen. Virol.**, **75**: 1883-88, 1994.
- GREENBERG, H.B. & KAPIKIAN, A.Z. Detection of Norwalk agent antibody and antigen by solid-phase radioimmunoassay and immune adherence hemagglutination assay. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **173**: 620-23, 1978.
- GREENBERG, H.B.; WYATT, R.G.; VALDESUSO, J.; KALICA, A.R.; LONDON, W.T.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z. Solid-phase microtiter radioimmunoassay for detection of the Norwalk strain of acute nonbacterial, epidemic gastroenteritis virus and its antibodies. **J. Med. Virol.**, **2**: 97-108, 1978 .

- GREENBERG, H.B.; VALDESUSO, J.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M.; WYATT, R.G.; SZMUNESS, W.; LARRICK, J.; KAPLAN, J.; GLIMAN, R.H.; SACK, D.A. Prevalence of antibody to the Norwalk virus in various countries. **Infect. Immun.**, **26**: 270-73, 1979a.
- GREENBERG, H.B.; WYATT, R.G.; KAPIKIAN, A.Z. Norwalk virus in vomitus. **Lancet**, **1**: 55, 1979b.
- GREENBERG, H.B.; VALDESUSO, J.R.; KALICA, A.R.; WYATT, R.G.; McAULIFFE, V.J.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. The proteins of Norwalk virus. **J. Virol.**, **37**: 994-99, 1981.
- GROHMANN, G.S.; GREENBERG, H.B.; WELCH, B.M.; MURPHY, A.M. Oyster-associated gastroenteritis in Australia: the detection of Norwalk virus and its antibody by immune electron microscopy and radioimmunoassay. **J. Med. Virol.**, **6**: 11-9, 1980.
- GROHMANN, G.S.; MURPHY, A.M.; CHRISTOPHER, P.J.; AUTY, E.; GREENBERG, H.B. Norwalk virus gastroenteritis in volunteers consuming depurated oysters. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, **59**: 219-28, 1981.
- GUEST, C.; SPITALNY, K.C.; MADORE, H.P.; PRAY, K.; DOLIN, R.; HERRMANN, J.E.; BLACKLOW, N.R. Foodborne Snow Mountain agent gastroenteritis in a school cafeteria. **Pediatrics**, **79**: 559-63, 1987.
- GUNN, R.A.; JANOWSKI, H.T.; LIEB, S.; PRATHER, E.C.; GREENBERG, H.B. Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. **Am. J. Epidemiol.**, **115**: 348-51, 1982.
- GUZEWICH, J.J. & MORSE, D.L. Sources of shellfish in outbreaks of probable viral gastroenteritis: implications for control. **J. Food Prot.**, **49**: 389-94, 1986.
- HÄFLIGER, D.; GILGEN, M.; LÜTHY, J.; HÜBNER, P. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. **Int. J. Food Microbiol.**, **37**: 27-36, 1997.

- HALE, A.D.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G. Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. **J. Virol. Methods**, **57**: 195-201, 1996.
- HALE, A.D. Recent advances in the diagnosis of small round structured viruses. **Rev. Med. Microbiol.** **8**: 149-55, 1997.
- HARDY, M.E. & ESTES, M.K. Completion of the Norwalk virus genome sequence. **Virus Genes** , **12**: 287-90, 1996 apud ESTES, M.K., 1997, p. 1079.
- HEDBERG, C.W. & OSTERHOLM, M.T. Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6**: 199-210, 1993.
- HEDSTRÖM, C.E. & LYCKE, E. An experimental study on oysters as virus carriers. **Am. J. Hyg.**, **79**: 134-42, 1964.
- HEJKAL, T.W.; GERBA, C.P.; RAO, V.C. Reduction of cytotoxicity in virus concentrates from environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **43**: 731-33, 1982.
- HELLER, D.; GILL, O.N.; RAYNHAM, E.; KIRKLAND, T.; ZADICK, P.M.; STANWELL-SMITH, R. An outbreak of gastrointestinal illness associated with consumption of raw depurated oysters. **Br. Med. J.**, **292**: 1726-27, 1986.
- HERRMANN, J.E. & BLACKLOW, N.R. Gastroenteritis viruses. IN: Lennette, E.H.; Lennette, D.A.; Lennette, E.T.(Eds.). Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. Washington: American Public Health Association, 1995, p.313-26.
- HERRMANN, J.E.; BLACKLOW, N.R.; MATSUI, S.M.; LEWIS, T.L.; ESTES, M.K.; BALL, J.M.; BRINKER, J.P. Monoclonal antibodies for detection of Norwalk virus antigen in stools. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 2511-13, 1995.
- HERZ, R. Manguézais do Brasil . São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 1991.

- HIERHOLZER, J.C.; HALONEN, P.E.; DAHLEN, P.O.; BINGHAM, P.G.; McDONOUGH, M.M. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 1886-91, 1993.
- HOFF, J.C. & BECKER, R.C. The accumulation and elimination of crude and clarified poliovirus suspensions by shellfish. **Am. J. Epidemiol.**, **90**: 53-61, 1969.
- ICMSF – INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. IN: James & James Ltd. (Co-eds.). Microorganisms in foods 5 – microbiological specifications of food pathogens. London: Blackie Academic & Professional, 1996. p.440-57.
- IDEMA, G.K ; BATEMAN, B.W.; KFIR, R.; GRABOW, W.O.K. A comparison of methods for the isolation of a wide range of viruses from shellfish. **Water Sci. Technol.**, **24** : 427-30, 1991.
- IVERSEN, A.M.; GILL, M.; BARTLETT, C.L.R.; CUBITT, W.D.; McSWIGGAN, D.A. Two outbreaks of foodborne gastroenteritis caused by a small round structured virus: evidence of prolonged infectivity in a food handler. **Lancet** , **2** : 556-58, 1987.
- JAYKUS, L.A.; DE LEON, R.; SOBSEY, M.D. Application of RT-PCR for the detection of enteric viruses in oysters. **Water Sci. Technol.**, **27**: 49-53, 1993.
- JAYKUS, L.A.; DE LEON, R.; SOBSEY, M.D. Development of a molecular method for the detection of enteric viruses in oysters. **J. Food Prot.**, **58**: 1357-62, 1995.
- JAYKUS, L.A.; DE LEON, R.; SOBSEY, M.D. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 2074-80, 1996.

- JIANG, X.; GRAHAM, D.Y.; WANG, K.; ESTES, M.K.
Norwalk virus genome cloning and characterization.
Science, **250**: 1580-83, 1990.
- JIANG, X.; WANG, J.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K.
Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain
reaction. **J. Clin. Microbiol.**, **30**: 2529-34, 1992a.
- JIANG, X.; WANG, M.; GRAHAM, D.Y.; ESTES, M.K.
Expression, self-assembly, and antigenicity of the
Norwalk virus capsid protein. **J. Virol.** **66**: 6527-32,
1992b.
- JIANG, X.; WANG, M.; WANG, K.; ESTES, M.K. Sequence
and genomic organization of Norwalk virus. **Virology**,
195: 51-61, 1993.
- JIANG, X.; MATSON, D.O.; VELAZQUEZ, F.R.; CALVA,
J.J.; ZHONG, W.M.; HU, J.; RUIZ-PALACIOS, G.M.;
PICKERING, L.K. Study of Norwalk-related viruses in
Mexican children. **J. Med. Virol.**, **47**: 309-16, 1995a.
- JIANG, X.; WANG, J.; ESTES, M.K. Characterization of
SRSVs using RT-PCR and a new antigen ELISA. **Arch.**
Virol., **140**: 363-74, 1995b.
- JIANG, X.; MATSON, D.O.; CUBITT, W.D.; ESTES, M.K.
Genetic and antigenic diversity of human caliciviruses
(HUCVs) using RT-PCR and new EIAs. **Arch. Virol.**
Suppl., **12** : S251-S62, 1996.
- JOHANSEN, K.S. & GRINDE, B. Sensitive detection of
human *Caliciviridae* by RT-PCR. **J. Med. Virol.**, **50** :
207-13, 1996.
- JOTHIKUMAR, N.; CLIVER, D.O.; MARIAM, T.W.
Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration
and detection of hepatitis A virus from environmental
samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**: 504-08, 1998.
- KAPIKIAN, A.Z. Norwalk and Norwalk-like viruses. IN:
Kapikian, A.Z. (Ed). Viral infections of the
gastrointestinal tract. New York : Marcell Dekker,
1994. p. 471-518.

- KAPIKIAN, A.Z.; WYATT, R.G.; DOLIN, R.; THORNHILL, T.S.; KALICA, A.R.; CHANOCK, R.M. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **J. Virol.**, **10**: 1075-81, 1972.
- KAPIKIAN, A.Z.; FEINSTONE, S.M.; PURCELL, R.H.; WYATT, R.G.; THORNHILL, T.S.; KALICA, A.R.; CHANOCK, R.M. Detection and identification by immune electron microscopy of fastidious agents associated with respiratory illness, acute non-bacterial gastroenteritis, and hepatitis A. **Perspect. Virol.**, **9**: 9-47, 1975.
- KAPIKIAN, A.Z.; GREENBERG, H.B.; CLINE, W.L.; KALICA, A.R.; WYATT, R.G.; JAMES, H.D. Jr.; LLOYD, N.L.; CHANOCK, R.M.; RYDER, R.W.; KIM, H.W. Prevalence of antibody to the Norwalk agent by a newly developed immune adherence hemagglutination assay. **J. Med. Virol.**, **2**: 281-94, 1978.
- KAPIKIAN, A.Z., ESTES, M.K.; CHANOCK, R.M. Norwalk group of viruses. IN: Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.). Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven , 1996. P. 783-810.
- KAPLAN, J.E.; GOODMAN, R.A.; SCHONBERGER, L.B.; LIPPY, E.C.; GARY, G.W. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. **J. Infect. Dis.**, **146**: 190-97, 1982.
- KATZENELSON, E.; FATTAL, B.; HOSTOVESKY, T. Organic flocculation : an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **32**: 638-39, 1976.
- KAWAMOTO, H.; HASEGAWA, S.; SAWATARI, S.; MIWA, C.; MORITA, O.; HOSOKAWA, T.; TANAKA, H. Small, round-structured viruses (SRSVs) associated with acute gastroenteritis outbreaks in Gifu, Japan. **Microbiol. Immunol.**, **37**: 991-97, 1993.

- KESWICK, B.H.; SATTERWHITE, T.K.; JOHNSON, P.C.; DuPONT, H.L.; SECOR, S.L.; BITSURA, J.A.; GARY, G.W.; HOFF, J.C. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. **Appl. Environ. Microbiol.**, **50**: 261-64, 1985.
- KHAN, A.S.; MOE, C.L.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S.; ESTES, M.K.; CHAPMAN, L.E.; JIANG, X.; HUMPHREY, C.; PON, E.; ISKANDER, J.K.; SCHONBERGER, L.B. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii : comparison and application of molecular method-based assays. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 318-22, 1994.
- KISIELIUS, J.J.; UEDA, M.; TANAKA, H.; RÁCZ, M.L. Standardization of immune electron microscopy in agar for astrovirus detection. **Acta Microscopica**, **6**(suppl.B-1): S170-S171, 1997.
- KLEBE, R.J.; GRANT, G.M.; GRANT, A.M.; GARCIA, M.A.; GIAMBERNARDI, T.A.; TAYLOR, G.P. RT-PCR without RNA isolation. **BioTechniques**, **21**:1094-100, 1996.
- KOHN, M.A.; FARLEY, T.A.; ANDO, T.; CURTIS, M.; WILSON, S.A.; JIN, Q.; MONROE, S.S.; BARON, R.C.; McFARLAND, L.M.; GLASS, R.I. An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. **J. Am. Med. Assoc.**, **273**: 466-71, 1995.
- KONOWALCHUK, J. & SPEIRS, J.I. Enterovirus recovery from laboratory-contaminated samples of shellfish. **Can. J. Microbiol.**, **18**: 1023-29, 1972.
- KURITSKY, J.N.; OSTERHOLM, M.T.; GREENBERG, H.B.; KORLATH, J.A.; GODES, J.R.; HEDBERG, C.W.; FORFANG, J.C.; KAPIKIAN, A.Z.; McCULLOUGH, J.C.; WHITE, K.E. Norwalk gastroenteritis: a community outbreak associated with bakery product consumption. **Ann. Intern. Med.**, **100**: 519-21, 1984.
- KURTZ, J.B. & LEE, T.W. Astrovirus: human and animal. **Ciba Found. Symp.**, **128**: 92-107, 1987 apud GERBA, C.P., 1988, p. 100.

- LAMBDEN, P.R. & CLARKE, I.N. Genome organization in the Caliciviridae. **Trends Microbiol.**, **3**: 261-65, 1995.
- LAMBDEN, P.R.; CAUL, E.O.; ASHLEY, C.R.; CLARKE, I.N. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. **Science**, **259**: 516-19, 1993.
- LAMBDEN, P.R.; CAUL, E.O.; ASHLEY, C.R.; CLARKE, I.N. Human enteric caliciviruses are genetically distinct from small round structured viruses. **Lancet**, **343**:666-67, 1994.
- LANDRY, E.F.; VAUGHN, J.M.; VICALE, T.J.; MANN, R. Inefficient accumulation of low levels of monodispersed and feces-associated poliovirus in oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **44**: 1362-69, 1982.
- LARA, J.L.C.; VICENTE, S.P.; SENA, F.J.R.; PÉREZ, M.R.; SAMANES, C.S.; MARTÍNEZ, I.C. Brote de gastroenteritis asociado al consumo de agua, posiblemente producido por virus tipo Norwalk o semejantes. **Rev. Esp. Salud Públ.**, **69**: 243-54, 1995.
- LLE GUYADER, F.; DUBOIS, E.; MENARD, D.; POMMEPUY, M. Detection of hepatitis A, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60** : 3665-71, 1994.
- LLE GUYADER, F.; NEILL, F.H.; ESTES, M.K.; MONROE, S.S.; ANDO, T.; ATMAR, R.L. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in a outbreak of acute gastroenteritis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **62**: 4268-72, 1996.
- LEES, D.N.; HENSHILWOOD, K.; DORÉ, W.J. Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 2999-3005, 1994.
- LEES, D.N.; HENSHILWOOD, K.; GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W.G. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **61**: 4418-24, 1995.

- LEW, J.F.; PETRIC, M.; KAPIKIAN, A.Z.; JIANG, X.; ESTES, M.K.; GREEN, K.Y. Identification of minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. **J. Virol.**, **68**: 3391-96, 1994.
- LEWIS, D. Norwalk agent and other small-round structured viruses in the U.K. **J. Infect.**, **23**: 220-22, 1991.
- LEWIS, D.C.; LIGHTFOOT, N.F.; PETHER, J.V.S. Solid-phase immune electron microscopy with human immunoglobulin M for serotyping of Norwalk-like viruses. **J. Clin. Microbiol.**, **26**: 938-42, 1988.
- LEWIS, D.; ANDO, T.; HUMPHREY, C.D.; MONROE, S.S.; GLASS, R.I. Use of solid-phase immune electron microscopy for classification of Norwalk-like viruses into six antigenic groups from 10 outbreaks of gastroenteritis in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 501-04, 1995.
- LEWIS, G.D. & METCALF, T.G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, **54**: 1983-88, 1988.
- LIEW, P.F. & GERBA, C.P. Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment. **Appl. Environ. Microbiol.**, **40**: 305-08, 1980.
- LINCO, S.J. & GROHMANN, G.S. The Darwin outbreak of oysters-associated viral gastroenteritis. **Med. J. Aust.**, **1**: 211-13, 1980.
- LIU, B.L.; CLARKE, I.N.; CAUL, E.O.; LAMBDEN, P.R. Human enteric caliciviruses have a unique genome structure and are distinct from the Norwalk-like viruses. **Arch. Virol.**, **140**: 1345-56, 1995.
- LIU, O.C.; SERAICHEKAS, H.R.; MURPHY, B.L. Viral pollution of shellfish. 1. Some basic facts of uptake. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **123**: 481-87, 1966.

- LIU, O.C.; SERAICHEKAS, H.R.; MURPHY, B.L. Viral depuration of the Northern quahog. **Appl. Microbiol.**, **15**: 307-15, 1967.
- LO, S.V.; CONNOLLY, A.M.; PALMER, S.R.; WRIGHT, D.; THOMAS, P.D.; JOYNSON, D. The role of the pre-symptomatic food handler in a common source outbreak of food-borne SRSV gastroenteritis in a group of hospitals. **Epidemiol. Infect.**, **113**: 513-21, 1994.
- LOEFFELHOLZ, M.S. PCR test for Norwalk-like viruses causing gastroenteritis. The University of Iowa-Hygienic Laboratory. Eletronic Bulletin Board **34**: 1-2, 1996. Available in 14-mar-97 from: http://www.uhl.uiowa.edu/Publications/Hotline/1996_04/pcr.html.
- MACKOWIAK, P.A.; CARAWAY, C.T.; PORTNOY, B.L.; Oyster-associated hepatitis: lessons from the Louisiana experience. **Am. J. Epidemiol.**, **103**:181-91, 1976.
- MADORE, H.P.; TREANOR, J.J.; PRAY, K.A.; DOLIN, R. Enzyme-linked immunosorbent assays for Snow Mountain and Norwalk agents of viral gastroenteritis. **J. Clin. Microbiol.**, **24**: 456-59, 1986.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. IN: Maniatis, T.; Fritsch, E.F. ; Sambrook, J. (Eds.). Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989. p.7.3.
- MARQUES, E. & MARTINS, M.T. Enterovirus isolation from seawater from beaches of Baixada Santista. IN: Latin American Congress for Microbiology, 9th . Sao Paulo, Brazil , 1983 .
- MARTINS, M.T.; SOARES, L.A. ; MARQUES, E.; MOLINA, A.G. Human enteric viruses isolated from influents of sewage-treatment plants in Sao Paulo, Brazil. **Water Sci. Technol.**, **15**: 69-73, 1983.

- MATSON, D.O.; ZHONG, W.M.; NAKATA, S.; NUMATA, K.; JIANG, X.; PICKERING, L.K.; CHIBA, S.; ESTES, M.K. Molecular characterization of a human calicivirus with sequence relationships closer to animal caliciviruses than other known human caliciviruses. **J. Med. Virol.**, **45**: 215-22, 1995.
- MATSUI, S.M.; KIM, J.P.; GREENBERG, H.B.; SU, W.; SUN, Q.; JOHNSON, P.C.; DuPONT, H.L.; OSHIRO, L.S.; REYES, G.R. The isolation and characterization of a Norwalk virus-specific cDNA. **J. Clin. Invest.**, **87** : 1456-61, 1991.
- MELNICK, J.L. Etiologic agents and their potential for causing waterborne virus disease. IN: Melnick, J.L. (Ed.). **Enteric viruses in water**. Basel: Karger, 1984, , p.1-16. (Monographs in virology, 15).
- MESQUITA, M.M.F. Effects of seawater contamination level and exposure period on the bacterial and viral accumulation and elimination processes by *Mytilus edulis*. **Water Sci. Technol.**, **20**: 265-70, 1988.
- METCALF, T.G. & STILES, W.C. The accumulation of enteric viruses by the oyster *Crassostrea virginica*. **J. Infect. Dis.**, **115**: 68-76 , 1965.
- METCALF, T.G.; MULLIN, B.; ECKERSON, D.; MOULTON, E.; LARKIN, E.P. Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. **Appl. Environ. Microbiol.**, **38**: 275-82, 1979.
- METCALF, T.G.; MOULTON, E.; ECKERSON, D. Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. **Appl. Environ. Microbiol.**, **39**: 141-52, 1980.
- METCALF, T.G.; MELNICK, J.L.; ESTES, M.K. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology - a trip of over 50 years. **Annu. Rev. Microbiol.**, **49**: 461-87, 1995.

- MEYERS, G.; WIRBLICH, C.; THIEL, H.J. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. **Virology**, **184**: 677-86, 1991.
- MITCHELL, J.R.; PRESNELL, M.W.; AKIN, E.W.; CUMMINS, J.M.; LIU, O.C. Accumulation and elimination of poliovirus by the eastern oyster. **Am. J. Epidemiol.**, **84**: 40-50, 1966.
- MOE, C.L.; GENTSCH, J.; ANDO, T.; GROHMANN, G.; MONROE, S.S.; JIANG, X.; WANG, J.; ESTES, M.K.; SETO, Y.; HUMPHREY, C.; STINE, S.; GLASS, R.I. Application of PCR to detect Norwalk virus in fecal specimens from outbreaks of gastroenteritis. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 642-48, 1994.
- MONROE, S.S.; STINE, S.E.; JIANG, X.; ESTES, M.K.; GLASS, R.I. Detection of antibody to recombinant Norwalk virus antigen in specimens from outbreaks of gastroenteritis. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 2866-72, 1993.
- MORENS, D.M.; ZWEIGHAFT, R.M.; VERNON, T.M.; GARY, G.W.; ESLIEN, J.J.; WOOD, B.T.; HOLMAN, R.C.; DOLIN, R. A waterborne outbreak of gastroenteritis with secondary person-to-person spread: association with a viral agent. **Lancet**, **1**: 964-66, 1979.
- MORSE, D.L.; GUZEWICH, J.J.; HANRAHAN, J.P.; STRICOF, R.; SHAYEGANI, M.; DEIBEL, R.; GRABAU, J.C.; NOWAK, N.A.; HERRMANN, J.E.; CUKOR, G.; BLACKLOW, N.R. Widespread outbreaks of clam - and oyster - associated gastroenteritis: role of Norwalk virus. **N. Engl. J. Med.**, **314**: 678-81, 1986.
- MURPHY, A. Aetiology of viral gastroenteritis: a review. **Med. J. Aust.**, **2**: 177-82, 1981.
- MURPHY, A.M.; GROHMANN, G.S.; CHRISTOPHER, P.J.; LOPEZ, W.A.; DAVEY, G.R.; MILLSOM, R.H. An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. **Med. J. Aust.**, **2**: 329-33, 1979.

- NEILL, J.D. & MENGELING, W.L. Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells. **Virus Res.**, **11**: 59-72, 1988 apud ESTES, M.K., 1997, p. 1081.
- NOAH, N.D. Airbone transmission of a small round structured virus . **Lancet**, **343**: 608-09, 1994.
- OKADA, S.; SEKINE, S.; ANDO, T.; HAYASHI, Y.; MURAO, M.; YABUUCHI, K.; MIKI, T.; OHASHI, M. Antigenic characterization of small, round-structured viruses by immune electron microscopy. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 1244-48, 1990.
- PERKINS, F.O.; HAVEN, D.S.; MORALES-ALAMO, R.; RHODES, M.W. Uptake and elimination of bacteria in shellfish. **J. Food Prot.**, **43**: 124-26, 1980.
- PICHARDS, S.L. & PAUL, J.H. Detection of gene expression in genetically engineered microorganisms and natural phytoplankton populations in the marine environment by mRNA analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57**: 1721-27, 1991.
- PIETRI, C.; HUGUES, B.; CRANCE, J.M.; PUEL, D.; CINI, C.; DELOINCE, R. Hepatitis A virus levels in shellfish exposed in a natural marine environment to the effluent from a treated sewage outfall. **Water Sci. Technol.**, **20**: 229-34, 1988.
- POWER, U.F. & COLLINS, J.K. Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. **Appl. Environ. Microbiol.**, **56**: 803-07, 1990.
- PRASAD, B.V.; HARDY, M.E.; JIANG, X.; ESTES, M.K. Structure of Norwalk virus. **Arch. Virol. Suppl.**, **12**: S237-S42, 1996.
- RAINA, K. & CHANDLEE, J.M. Recovery of genomic DNA from a fungus (*Sclerotinia homoeocarpa*) with high polysaccharide content. **BioTechniques**, **21**: 1030-32, 1996.

- REGAN, P.M.; MARGOLIN, A.B.; WATKINS, W.D.
Evaluation of microbial indicators for the determination
of the sanitary quality and safety of shellfish. **J.
Shellfish Res.**, **12**: 95-100, 1993.
- RICHARDS, G.P. Outbreaks of shellfish-associated enteric
virus illness in the United-States: requisite for
development of viral guidelines. **J. Food Prot.**, **48**:
815- 23, 1985.
- RICHARDS, G.P. Shellfish-associated enteric virus illness
in the United States, 1934–1984. **Estuaries**, **10**: 84-5,
1987 apud ROMALDE, J.L., 1996, p. 549.
- RICHARDS, G.P.; GOLDMINTZ, D; GREEN, D.L.;
BABINCHACK, J.A. Rapid methods for extraction and
concentration of poliovirus from oyster tissues. **J.
Virol. Methods**, **5**: 285-91, 1982.
- ROMALDE, J.L. New molecular methods for the detection
of hepatitis A and Norwalk viruses in shellfish.
Microbiologia, **12**: 547-56, 1996.
- ROMALDE, J.L.; ESTES, M.K.; SZÜCS, G.; ATMAR, R.L.;
WOODLEY, C.M.; METCALF, T.G. In situ detection of
hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues.
Appl. Environ. Microbiol., **60**: 1921-26, 1994.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.;
HORN, G.T.; ERLICH, A.; ARNHEIM, N. Enzymatic
amplification of beta-globin genomic sequences and
restriction site analysis for diagnosis of sickle cell
anemia. **Science**, **230**: 1350-54, 1985.
- SEKINE, S.; OKADA, S.; HAYASHI, Y.; ANDO, T.;
TERAYAMA, T.; YABUUCHI, K.; MIKI, T.; OHASHI, M.
Prevalence of small round structured virus infections in
acute gastroenteritis outbreaks in Tokyo. **Microbiol.
Immunol.**, **33**: 207-17, 1989.
- SCHMID, A.W.; STEWIEN, K.E.; CANDEIAS, J.A.N.
Evidenciação de vírus patogênicos humanos em filés de
peixe. **Rev. Saúde Públ., S.Paulo**, **11**: 405-09, 1977.

- SCHWAB, K.J.; DE LEON, R.; BARIC, R.S.; SOBSEY, M.D. Detection of rotaviruses, enteroviruses, and hepatitis A virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction. In: *Advances in Water Analysis and Treatment*, AWWA Proceedings, Orlando, FL , pp. 475-91, 1991 apud SHIEH, Y.-S.C. , 1995, p. 63.
- SCHWARTZBROD, L. & BOHER, S. Viruses and shellfish. **Water Sci. Technol.**, **27**: 313-19, 1993.
- SCHWARTZBROD, L.; MONTANIÉ, H.; LAMBERT, C. Comparison of two methods for virus recovery from mussels and oysters. **Water Sci. Technol.**, **21**: 291-93, 1989.
- SHIEH, Y.-S.C.; WAIT, D.; TAI, L.; SOBSEY, M.D. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, **54**: 51-66, 1995.
- SHUVAL, H.I. Studies on viruses in the water environment in Israel. IN: Melnick, J.L. (Ed.). **Enteric viruses in water**. Basel: Karger, 1984, p.59-60 (Monographs in virology, 15).
- SIMMS, D.; CIZDZIEL, P.E.; CHOMCZYNSKI, P. TRIzol™: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. **Focus**, **15** :99-102, 1993/94.
- SOBSEY, M.D.; CARRICK, R.J.; JENSEN, H.R. Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. **Appl. Environ. Microbiol.**, **36**: 121-28, 1978.
- SOBSEY, M.D.; OGLESBEE, S.E.; WAIT, D.A. Evaluation of methods for concentrating hepatitis A from drinking water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **50**:1457-63, 1985.
- SOCKETT, P.N.; WEST, P.A.; JACOB, M. Shellfish and public health. **PHLS, Microbiol. Digest.**, **2**: 29-35, 1985 apud SCHWARTZBROD & BOHER, 1993, p.317.
- STAFFORD, R.; STRAIN, D.; HEYMER, M.; SMITH, C.; TRENT, M.; BEARD, J. An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis following consumption of oysters. **Commun. Dis. Intell.**, **21**: 317-20, 1997.

- STEWIEN, K.E.; DURIGON, E.L.; TANAKA, H.; GILIO, A.E.; BALDACCI, E.R. Ocorrência de astrovírus humanos na cidade de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ., S. Paulo**, **25**: 157-58, 1991.
- SUGIEDA, M.; NAKAJIMA, K.; NAKAJIMA, S. Outbreaks of Norwalk-like virus-associated gastroenteritis traced to shellfish: coexistence of two genotypes in one specimen. **Epidemiol. Infect.**, **116**: 339-46, 1996.
- TANAKA, H.; KISIELIUS, J.J.; UEDA, M.; GLASS, R.I.; JOAZEIRO, P.P. Intrafamilial outbreak of astrovirus gastroenteritis in São Paulo, Brazil. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, **12**: 219-21, 1994.
- TANAKA, H.; KISIELIUS, J.J.; UEDA, M.; ROCHA, M.; TIMENETSKY, M.C.S.T.; CARMONA, R.C. Norwalk-like virus – associated gastroenteritis outbreak in São Paulo state – Brazil . IN: International congress for tropical medicine and malaria, XIVth . Nov. 17 - 22, Nagasaki, Japan. Abstracts , 1996, p.388. P-03-35.
- TAYLOR, J.W.; GARY, G.W. Jr; GREENBERG, H.B. Norwalk-related viral gastroenteritis due to contaminated drinking water. **Am. J. Epidemiol.**, **114**: 584-92, 1981.
- TERASHIMA, H.; CHIBA, S.; SAKUMA, Y.; KOGASAKA, R.; NAKATA, S.; MINAMI, R.; HORINO, K.; NAKAO, T. The polypeptide of a human calicivirus. **Arch. Virol.**, **78**: 1-7, 1983.
- THORNHILL, T.S.; WYATT, R.G.; KALICA, A.R.; DOLIN, R.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z. Detection by immune electron microscopy of 26-to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. **J. Infect. Dis.**, **135**: 20-7, 1977.
- TIERNEY, J.T.; SULLIVAN, R.; PEELER, J.T.; LARKIN, E.P. Persistence of polioviruses in shellstock and shucked oysters stored at refrigeration temperature. **J. Food Prot.**, **45**: 1135-37, 1982.

- TIMENETSKY, M.C.S.T.; ANDO, T.; TANAKA, H.; NOEL, J.S.; PERET, T.; KISIELLIUS, J.J.; UEDA, M.; CARMONA, R.C.C.; GLASS, R. Characterization of small round structured viruses detected in Brazil by reverse transcription-PCR and Southern hybridization. IN: International congress for tropical medicine and malaria, XIVth. Nov. 17 – 22 , Nagasaki , Japan. Abstracts, 1996 , p.382. P-03-11.
- TRUMAN, B.I.; MADORE, H.P.; MENEGUS, M.A.; NITZKIN, J.L.; DOLIN, R. Snow Mountain agent gastroenteritis from clams. **Am. J. Epidemiol.**, **126**: 516-25, 1987.
- TSAI, Y.-L.; SOBSEY, M.D.; SANGERMANO, L.R.; PALMER, C.J. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polimerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, **59**: 3488-91, 1993.
- TSAI, Y.-L.; TRAN, B.; SANGERMANO, L.R.; PALMER, C.J. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, **60**: 2400-07, 1994.
- UEDA, M.; KISIELIUS, J.J.; ROCHA, M.; TIMENETSKY, M.C.S.T.; TANAKA, H. Small round structured virus – SRSV, genogroup G2 in Baixada Santista (SP) – virus identification by IEM. IN: Encontro nacional de virologia, VIII. São Lourenço. Resumos, 1996, p.147.
- UEDA, M.; TANAKA, H.; KISIELIUS, J.J.; PIRES, M.F.; WEIGL, D.R. Importance of electron microscopy and its contribution to viral diagnosis. **Virus: Rev. Res.**, **3**: 9-36, 1998.
- VINJÉ, J.; ALTENA, S.A.; KOOPMANS, M.P.G. The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. **J. Infect. Dis.**, **176**: 1374-78, 1997.

- WAKAMATSU, T. A ostra de Cananéia e seu cultivo. São Paulo, Sudelpa, 1973 . 141 p.
- WANG, J.; JIANG, X.; MADORE, H.P.; GRAY, J.; DESSELBERGER, U.; ANDO, T.; SETO, Y; OISHI, I.; LEW, J.F.; GREEN, K.Y.; ESTES, M.K. Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. **J. Virol.**, **68**: 5982-90, 1994.
- WHITE, K.E.; OSTERHOLM, M.T.; MARIOTTI, J.A.; KORLATH, J.A.; LAWRENCE, D.H.; RISTINEN, T.L.; GREENBERG, H.B. A foodborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis: evidence for post-recovery transmission. **Am. J. Epidemiol.**, **124**: 120-26, 1986.
- WILLCOCKS, M.M.; SILCOCK, J.G.; CARTER, M.J. Detection of Norwalk virus in the UK by the polymerase chain reaction. **FEMS Microbiol. Lett.**, **112**: 7-12, 1993.
- WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**:3741-51, 1997.
- WOLFAARDT, M.; MOE, C.L.; GRABOW, W.O.K. Detection of small round structured viruses in clinical and environmental samples by polymerase chain reaction. **Water Sci. Technol.**, **31**: 375-82, 1995.
- WYATT, R.G.; DOLIN, R.; BLACKLOW, N.R.; DuPONT, H.L.; BUSCHO, R.F.; THORNHILL, T.S.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. **J. Infect. Dis.**, **129**: 709-14, 1974.
- WYATT, R.G.; GREENBERG, H.B.; DALGARD, D.W.; ALLEN, W.P.; SLY, D.L.; THORNHILL, T.S.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z. Experimental infection of chimpanzees with the Norwalk agent of epidemic viral gastroenteritis. **J. Med. Virol.**, **2**: 89-96, 1978.
- YOUNG, D.C. & SHARP, D.G. Poliovirus aggregates and their survival in water. **Appl. Environ. Microbiol.**, **33**: 168-77, 1977.

ZHOU, Y-J.; ESTES, M.K.; JIANG, X.; METCALF, T.G.
Concentration and detection of hepatitis A virus and
rotavirus from shellfish by hybridization tests. **Appl.**
Environ. Microbiol., **57**: 2963-68, 1991.

ABREVIATÖES E SIGLAS

bp	: " base pairs " (pares de bases)
°C	: graus Celsius
CH Cl ₃	: clorofórmio
C ₂ H ₅ NO ₂	: glicina
C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃	: citrato de sódio
CTAB	: brometo de cetil-trimetil-amônio
c DNA	: ácido desoxirribonucleico complementar
d NTP	: desoxinucleotídeo trifosfato
DEPC (C ₆ H ₁₀ O ₅)	: dietil pirocarbonato
DIG	: digoxigenina
EDTA	: ácido etileno diamino tetracético
EIA	: "enzyme immunoassay" (ensaio imunoenzimático)
ELISA	: "enzyme linked immunosorbent assay "
Etd Br	: brometo de etídio
g	: grama
h	: horas
H Cl	: ácido clorídrico
H ₃ BO ₃	: ácido bórico
IAHA	: "immune adherence hemagglutination assay " (ensaio de hemaglutinação por imunoadesância)

IME	:	imunomicroscopia eletrônica
kb	:	kilo base
kDa	:	kilo Dalton
L	:	litro
M	:	molar
MED	:	microscopia eletrônica direta
Mg Cl ₂	:	cloreto de magnésio
mm	:	milímetro
mg	:	miligrama
min	:	minuto
mL	:	mililitro
mM	:	milimolar
mRNA	:	RNA mensageiro
Na Cl	:	cloreto de sódio
Na OH	:	hidróxido de sódio
Na ₂ HPO ₄	:	fosfato de sódio bibásico
(NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂)	:	acetato de amônio
nm	:	nanômetro
PBS	:	" phosphate buffer solution " (solução tampão fosfato)
PCR	:	" Polymerase Chain Reaction " (Reação em Cadeia por Polimerase)
PFU	:	" plaque formed unit " (unidade formadora de placa)
pmol	:	picomol

RIA	:	" radioimmunoassay " (ensaio imunoradioativo)
RNA	:	ácido ribonucleico
SPIEM	:	" solid - phase immune electron microscopy " (imunomicroscopia eletrônica em fase sólida)
SDS	:	" sodium dodecyl sulphate " (dodecil sulfato de sódio)
SSC	:	" sodium - sodium citrate " (tampão de transferência)
TBE	:	tris-borato-EDTA
TE	:	tris-EDTA
Tris	:	tris (hidroximetil) aminometano
μ	;	micra
μL	:	microlitro
μg	:	micrograma
vol	:	volume

PRANCHA 1 A . Mapa de localização da região de Peruíbe (SP) e respectivo estuário do Rio Preto, com a presença do mangue nas delimitações listradas (Herz , 1991).

PRANCHA 3 A. Mapa de localização da região de Cananéia (SP) e respectivas regiões de estuários, com a presença de mangue nas delimitações listradas (Herz, 1991).

PRANCHA 4 A . Ostra *Crassostrea virginica* - Diagrama da valva esquerda e localização de seus tecidos, incluindo o estômago com seus divertículos (Galtsoff , 1964).

CONCHA ESQUERDA

CONCHA DIREITA

PRANCHA 5 A . *Ostra Crassostrea* spp. Fig. superior - corte longitudinal com a localização dos divertículos digestivos que envolvem o estômago . A figura inferior mostra detalhes das duas conchas abertas (Wakamatsu , 1973).

BIVALVES DO GÊNERO *Crassostrea* spp. DE DISTINTAS REGIÕES DO
LITORAL DO EST. DE S. PAULO

BERTIOGA

CANANÉIA

PERUIBE

SONY

PRANCHA 6 A . Tipos de espécimes de moluscos bivalves do gênero *Crassostrea* spp. (origem : Bertioga e Peruíbe) e da espécie *Crassostrea rhizophorae* (origem : Cananéia) nos quais foram detectados SRSVs pela PCR (nos três tipos) e por IME (espécime semelhante ao do centro da figura) - (escala 1 : 1.7).

Abstract

The Small Round Structured Viruses (SRSVs) have been associated with gastroenteritis in humans, and were detected in extracts of oysters *Crassostrea spp.*, by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT – PCR). Thirteen lots of samples, originated from different regions of the State of São Paulo, were processed for viral particles extraction. The samples, containing 10 g of stomach and diverticula, were extracted by adsorption – elution and polyethylene glycol (PEG 6000) precipitation, and fluorocarbon (Freon, Dupont Co.) was used for purification and previous elimination of RT – PCR inhibitors. For the viral nucleic acid extraction, guanidine isothiocyanate – phenol mixture (Trizol®, Gibco) and chloroform were used, followed by a polysulfone spin column (Millipore, Corp.) purification. The RT–PCR was done in one step, using the “Super Script ONE-STEP RT–PCR System”® (Gibco). The enzymatic amplification reaction run in 2% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide, revealed 123 bp products in 3 (23%) of the 13 lots of samples collected during the summer of 1998. One of these three samples was positive for SRSV particles by Immune Electron Microscopy (IEM). These 3 products were classified in the Genogroup G2 (Snow Mountain and others viruses). The application of this methodology made it possible to detect, in a molecular basis, the first cases of SRSVs in environmentally contaminated oysters in Brazil.