UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANDREA VASQUEZ GARCIA

Detecção de enterobactérias e vírus entéricos em frutos do mar no Estado de São Paulo

Pirassununga

2018

ANDREA VASQUEZ GARCIA

Detecção de enterobactérias e vírus entéricos em frutos do mar no Estado de São Paulo

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

VV335d Vazquez Garcia, Andrea
Detecção de enterobactérias e vírus entéricos em
frutos do mar no Estado de São Paulo / Andrea
Vazquez Garcia ; orientador ANDREZZA MARIA
FERNANDES ; coorientador RICARDO LUIZ MORO DE
SOUSA. -- Pirassununga, 2018.
164 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. astrovírus. 2. Escherichia coli. 3. mexilhões.
4. norovírus. 5. ostras. I. FERNANDES, ANDREZZA
MARIA, orient. II. MORO DE SOUSA, RICARDO LUIZ,
coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

Pirassununga, 11th January 2017

CERTIFIED

We certify that the Research "Detection of Enterobacteriaceae and enteric viruses in seafood from State of São Paulo ", protocol number CEUAX 7893261016, under the responsibility Andrezza Maria Fernandes, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University), and was approved in the meeting of day December 20, 2016.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Detecção de enterobactérias e vírus entéricos em frutos do mar no Estado de São ", protocolado sob o CEUAX nº 7893261016, sob a responsabilidade de Andrezza Maria Fernandes, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP, e foi aprovado na reunião de 20 de dezembro de 2016.

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

ATA DE DEFESA

Aluno: 74132 - 7904501 - 2 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Andrea Vasquez Garcia no Programa: Engenharia de Alimentos, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 08 dias do mês de agosto de 2018, no(a) Sala da Congregação realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Andrea Vasquez Garcia, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Detecção de enterobactérias e vírus entéricos em frutos do mar no Estado de São Paulo"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Andrea Maria Fernandes	Presidente	FZEA - USP	<u>aprovada</u>
Edison Barbieri	Titular	Externo	<u>aprovada</u>
Marta Mitsui Kushida	Titular	FZEA - USP	<u>APROVADA</u>
Ana Maria Centola Vidal	Titular	FZEA - USP	<u>aprovada</u>
Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz	Titular	Externo	<u>aprovada</u>

Resultado Final: aprovada

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz Erica Ferraz, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). Pirassununga, aos 08 dias do mês de agosto de 2018.

Edison Barbieri
Edison Barbieri

Marta Mitsui Kushida
Marta Mitsui Kushida

Ana Maria Centola Vidal
Ana Maria Centola Vidal

Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz
Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz

Andrea Maria Fernandes
Andrea Maria Fernandes
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 10.08.2018 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Engenharia de Alimentos - Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Rosemary Aparecida de Carvalho
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Prof.^a Dr.^a Rosemary Aparecida de Carvalho
Presidente da Comissão de
Pós-Graduação
FZEA/USP

*Dedico aos meus queridos pais Doris e Arcesio, pelo amor e apoio incondicional, a minha irmã Glória
Lorena, pelo amor e amizade.*

*A meu esposo Julian, pelo amor, paciência, carinho e dedicação em todos os momentos que passamos juntos
nesta nossa conquista.*

Amo muito vocês....muito obrigada!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e a força espiritual que precisei para enfrentar cada uma das minhas decisões, meus objetivos e desafios durante esta longa jornada de formação acadêmica.

A meus pais Doris Garcia e Arcesio Vasquez, por todo o amor, a força moral, pelo apoio contínuo e orientação nas decisões ao longo da minha vida. Obrigada pais, por estarem perto sem importar a distância.

A minha irmã, Gloria Lorena Vasquez Garcia pela sua amizade única, por dar-me sempre uma voz de encorajamento e apoiar-me nas decisões que marcaram cada etapa de minha vida.

Ao meu esposo, Julian Eduardo Mejia Ballesteros, por todo o amor que você dá para mim todos os dias, pela sua ajuda e conselhos e por ficar muito perto de mim.

Aos meus familiares, Adiel Garcia, Alberto Vasquez, Bernardo Mejia, Dora Vasquez, Fanny Garcia, Felipe Rodriguez, Margarita Garcia, Maria del Rosario Ballesteros, Mariela Garcia, Mauricio Rodriguez, Libia Vasquez, Lucelly Garcia, Oliva Vasquez, Olmedo Rodriguez, Zulay Garcia, pelo amor e apoio, por terem acreditado em mim, nas minhas decisões, por fazerem este processo mais fácil com cada palavra de ânimo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes, pela oportunidade de me receber como sua aluna, por me ajudar a crescer como profissional e como pessoa, pela paciência neste processo de formação. Muito obrigada por me permitir trabalhar e aprender com você.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, pela constante atenção, apoio e orientação durante o trabalho e elaboração desta tese.

Ao professor Dr. Edison Barbieri, pela colaboração, apoio na coleta das amostras e por me abrir as portas de seu laboratório.

A minha orientadora no exterior durante meu doutorado sandoval, Dra. Gloria Sanchez, muito obrigada pelos ensinamentos, pelo tempo e disposição para me explicar e ensinar.

À técnica do laboratório, Silvia Helena Seraphin de Godoy, pela colaboração e ajuda na realização do meu projeto, pela paciência, disponibilidade em me ajudar ao longo da minha estadia no laboratório e pela amizade.

Aos colegas do laboratório Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica, em especial Anna Alencar, Carolina Maria Bedoya, Euder Michelin, Marcela Jimenez, Marcelo Felisberto, Maria Fernanda Burbarelli, Marisa França, Marina Massocco, Loiane Sampaio, Samara Maganha.

A minha amiga e colega do laboratório, Thais Corrêa, muito obrigada pelo tempo e disposição que sempre teve, pela paciência para me ensinar e pela linda amizade, levo você em meu coração.

Aos funcionários do Instituto de Pesca de Cananéia, pelo auxílio técnico prestado durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas do laboratório do Instituto de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos (IATA-CSIC), Irene Falco e Walter Randazzo, pelos ensinamentos e companhia durante o período que estive lá.

À estudante de iniciação científica, Ana Paula Spranger, vinculada ao meu projeto de pesquisa, muito obrigada pela ajuda, tempo e disposição que sempre teve.

As minhas estagiárias, Andressa Ziemba, Giovanna Polizello, Nathália Mello, Sarah Trambaioli e Vanessa Marcondes, pela ajuda e disposição com meu projeto.

As minhas queridas amigas, Catalina Torres, Claudia Luna e Monica Quijano, pelo apoio e por sempre me escutarem.

Aos meus amigos colombianos Cristian Flaker, Fabian Cuellar, German Ayala, Jaiber Rodriguez, Jenny Henao, Juan Fernando Morales, Julian Muñoz, Kary Nieves, Laura Reyes, Lina Pulido, Nataly Garcia, Shirley Flores e Stephen Bonilla.

Aos meus amigos Beatriz Egerland, Diogo Sartori, Maria Zanatta, Leticia Fernandes, Loic Barbara e Viviane Correia.

A Liliana Serna, por sua confiança e amizade, por acreditar em mim, pelo incentivo em continuar com minha formação acadêmica.

A todos os professores da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos que contribuíram com meu processo de formação.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudo concedida durante meu doutorado.

A todas as pessoas que me apoiaram para alcançar esta meta.....muito obrigada.

“Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos”

El principito

“Quem está acostumado a viajar, como as ovelhas, sabe que é sempre necessário partir um
dia”

Paulo Coelho

RESUMO

VASQUEZ GARCIA, A. **Deteção de enterobactérias e vírus entéricos em frutos do mar no Estado de São Paulo**. 2018. 163 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

As bactérias patogênicas em moluscos bivalves podem ser agentes causadores de doenças como a gastroenterite e responsáveis por vários surtos de origem alimentar, representando um risco para os consumidores. Os vírus entéricos são a causa mais comum de surtos de gastroenterites não bacteriana em humanos no mundo e podem ser encontrados nas águas utilizadas no cultivo de moluscos bivalves. Este estudo teve como objetivo avaliar a contaminação de mexilhões (*Mytella falcata*) e ostras (*Crassostrea brasiliana*) provenientes do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape, Estado de São Paulo, por bactérias (coliformes totais, coliformes termotolerantes, patótipos de *Escherichia coli*), por astrovírus e norovírus humanos. Um total de 150 amostras de moluscos bivalves (75 ostras e 75 mexilhões) foram coletadas de junho de 2016 a fevereiro de 2017. A estimativa de coliformes totais nos tecidos das ostras variou de 14,1 a 154,5 número mais provável (NMP)/g e de coliformes termotolerantes de 3,0 a 48,6 NMP/g, enquanto que para as amostras de mexilhões, os coliformes totais variaram de 97,4 a 1300 NMP/g e coliformes termotolerantes de 3,6 a 927 NMP/g. *E. coli* foi detectada em 24 amostras (16%), em concentrações variando entre <3 e >927 NMP/g. Quatro amostras (17%) foram identificadas com *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), apresentando o gene *eae* por PCR (*Reação em Cadeia da Polimerase*) e RFLP (*Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição*), e os amplicons positivos foram sequenciados. As porcentagens de similaridade relativas ao gene *phoA* de *E. coli*, para as cinco amostras realizadas no estudo, apresentaram valores iguais ou superiores a 88,6%. As sequências de EPEC agruparam-se em diferentes clados com outras sequências do Brasil, Suíça e Uruguai, exibindo similaridade de 57,7 e 97,1% quando comparadas umas as outras. Quando comparadas a outras sequências de referência depositadas no GenBank, a similaridade variou entre 56,2 e 95,4%. Estes resultados são os primeiros a indicar a presença de EPEC em moluscos bivalves no Brasil. Astrovírus não foram identificados nas amostras de moluscos analisadas neste estudo. Norovírus (NoV) foi identificado em 21 (14%) das amostras, sendo 38% de mexilhões e 62% de ostras. As amostras de NoV genogrupo II (GII) foram agrupadas num clado único, juntamente com outras sequências de NoV GII, sendo mais próximas filogeneticamente de sequências originárias do Brasil, Japão e México, com similaridade de 93,8 a 96,6% do que com as outras sequências homólogas. A triagem de moluscos bivalves para coliformes, *E. coli* e presença de vírus

entéricos significativos para a saúde pode ajudar na prevenção de surtos entre os consumidores e contribuir para a melhoria do ambiente estuarino.

Palavras - chave: astrovírus, *Escherichia coli*, mexilhões, norovírus, ostras.

ABSTRACT

VASQUEZ GARCIA, A. **Detection of enterobacteria and enteric viruses in seafood in the State of São Paulo. 2018. 163 f.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

The pathogenic bacteria in bivalve molluscs are causative agents of diseases such as gastroenteritis and responsible for several food-borne outbreaks, representing a risk to consumers. Enteric viruses are the most common cause of outbreaks of non-bacterial gastroenteritis in humans in the world and can be found in waters used in the cultivation of bivalve molluscs. The objective of this study was to evaluate the contamination of mussels (*Mytella falcata*) and oysters (*Crassostrea brasiliana*) from the estuarine complex Lagunar of Cananéia-Iguape, State of São Paulo, by bacteria (total coliforms, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*) and by human astroviruses and noroviruses. A total of 150 samples of bivalve molluscs (75 oysters and 75 mussels) were collected from June 2016 to February 2017. The total coliform estimate in oyster tissues varied from 14.1 to 154.5 most probable number (MPN)/g and thermotolerant coliforms from 3.0 to 48.6 MPN/g, whereas for mussel samples, total coliforms ranged from 97.4 to 1300 MPN/g and thermotolerant coliforms from 3.6 to 927 MPN/g. *E. coli* was detected in 24 samples (16%) at concentrations ranging from <3 to >927 NMP/g. Four (17%) were identified with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), presenting the gene *eae* by PCR (Polymerase Chain Reaction) and RFLP (Restriction fragment length polymorphism), and the positive amplicons were sequenced. The percentages of similarity relative to the *phoA* gene of *E. coli*, for the five samplings carried out in the study, presented values equal or superior to 88.6%. The EPEC sequences were grouped in different clades with other sequences from Brazil, Switzerland and Uruguay, exhibiting similarity of 57.7 and 97.1% when compared to each other. When compared to other reference sequences deposited in GenBank, the similarity ranged from 56.2 to 95.4%. These results are the first to indicate the presence of EPEC in bivalve molluscs in Brazil. Astroviruses were not identified in the mollusk samples analyzed in this study. Norovirus (NoV) was identified in 21 (14%) of the samples, representing 38% of mussels and 62% of oysters. NoV genogroup II (GII) samples were clustered in a single clade, along with other NoV GII sequences, keeping phylogenetically closest to sequences originating in Brazil, Japan and Mexico, with similarity of 93.8 to 96.6% than with the other homologous sequences. The screening of bivalve molluscs for coliforms, *E. coli* and the presence of enteric viruses significant to health can help preventing outbreaks among consumers and contribute to the improvement of the estuarine environment.

Key - words: astrovirus, *Escherichia coli*, mussels, norovirus, oysters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape.....	34
Figura 2 – Visão simplificada do processo de absorção de nutrientes nos moluscos bivalves.	36
Figura 3 - Rotas de transmissão de vírus entéricos.	46
Figura 4 - Micrografia eletrônica de transmissão de vírions de norovírus.....	47
Figura 5 - Representação do genoma do norovírus.....	47
Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão de astrovírus.	49
Figura 7 - Representação do genoma de astrovírus.....	50
Figura 8 - Fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas na presente pesquisa.....	61
Figura 9 - Mapa mostrando os dois locais de amostragem dos moluscos bivalves no Município de Cananéia.....	62
Figura 10 - Fluxograma das principais etapas realizadas na detecção de astrovírus e norovírus nas amostras de moluscos bivalves.	69
Figura 11 - Médias das populações de coliformes totais e termotolerantes nos tecidos das ostras (NMP/g), analisados bimensalmente. As barras apresentam os seus respectivos desvios-padrão.....	75
Figura 12 - Médias das populações de coliformes totais e termotolerantes nos tecidos dos mexilhões (NMP/g), analisados bimensalmente. As barras apresentam os seus respectivos desvios-padrão.....	77
Figura 13 - Placa com Ágar L-EMB referente à o isolamento de <i>Escherichia coli</i> da amostra de ostra (OS-2-3).	81
Figura 14 - Testes bioquímicos da amostra de ostra (OS-2-3), (A) Teste do indol (+), (B) citrato (-) e (C) Voges-Proskauer (-).	81
Figura 15 - Fotografia do gel de agarose, corado com SYBR™ Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos a partir da técnica de PCR para o gene <i>phoA</i> , utilizando extração de DNA por lise térmica....	82
Figura 16 - Fotografia de gel de agarose, corado com SYBR™ Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos a partir da técnica de PCR para os gene <i>phoA</i> (903 pb) e <i>eae</i> (360 pb), utilizando extração de DNA por lise térmica.).	87
Figura 17 - Fotografia de gel de agarose, corado com SYBR™ Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de digestão por enzimas de restrição (<i>Hinc II</i>), para verificação dos genes <i>phoA</i> (334/559 pb) e <i>eae</i> (79 pb).	89
Figura 18 - Filograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referentes à amplificação de um fragmento de 360 pb do gene <i>eae</i> de <i>Escherichia coli</i> .93	
Figura 19 - Fotografia de gel de agarose, corado com SYBR™ Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação do fragmento de 432 pb, relativo ao gene <i>pol</i> de astrovírus, obtidos através das técnicas de RT-PCR a partir de amostras de moluscos bivalves.....	94
Figura 20 - Fotografia de gel de agarose, corado com SYBR™ Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação do fragmento de 120 pb, relativo ao RdRp de norovírus, obtidos através das técnicas de RT-PCR a partir de amostras de moluscos bivalves	101
Figura 21 - Filograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referentes à amplificação de um fragmento de 120 pb do gene RdRp do norovírus.....	107
Figura 22 - Alinhamento das sequências deduzidas de 244 aminoácidos do gene <i>phoA</i> de <i>Escherichia coli</i> para as sequências MS-1-10, MS-1-14, OS-2-3, OS-2-10, OS-2-15 e MS-2-10, detectadas no presente estudo, e de outras <i>Escherichia coli</i> recuperadas do GenBank.....	149
Figura 23 - Alinhamento das sequências deduzidas de 253 aminoácidos do gene <i>phoA</i> de <i>Escherichia coli</i> para as amostras OS-3-2, OS-3-5, OS-3-7, MS-3-2, MS-3-7 e MS-3-11 detectadas no presente estudo, e de outras <i>Escherichia coli</i> recuperadas do GenBank.	150

Figura 24 - Alinhamento das sequências deduzidas de 226 aminoácidos do gene <i>phoA</i> de <i>Escherichia coli</i> para as amostras OS-4-1, OS-4-7, MS-4-8, MS-4-9, MS-3-13, MS-4-14 e MS-4-15 detectadas no presente estudo, e de outras <i>Escherichia coli</i> recuperadas do GenBank.....	151
Figura 25- Alinhamento das sequências deduzidas de 226 aminoácidos do gene <i>phoA</i> de <i>Escherichia coli</i> para as amostras OS-5-10, OS-5-15, MS-5-1, MS-5-11 MS-5-13 e MS-5-14, detectadas no presente estudo, e de outras <i>Escherichia coli</i> recuperadas do GenBank.	152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agentes microbiológicos implicados em doenças transmitidas pelo consumo de moluscos bivalves.	39
Tabela 2 - Resultados obtidos de pesquisas de contaminação envolvendo moluscos bivalves.	52
Tabela 3 - Métodos de detecção de vírus entéricos.	54
Tabela 4 - Normas relativas aos limites microbiológicos para avaliação da qualidade microbiológica de moluscos bivalves.	57
Tabela 5 - <i>Primers</i> utilizados para identificação dos patótipos de <i>Escherichia coli</i>	67
Tabela 6 - Tamanho dos fragmentos da amplificação por PCR e por digestão enzimática.	68
Tabela 7 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR e semi – <i>nested</i> PCR para AstV e NoV.	71
Tabela 8 - Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> e genes de virulência detectados.	84
Tabela 9 - População de <i>Escherichia coli</i> em amostras de moluscos bivalves ^a pelo método do número mais provável (NMP).	85
Tabela 10 - Colônias positivas e sequenciadas de EPEC detectadas no presente trabalho, e depositadas no GenBank com seus respectivos códigos de acesso.	91
Tabela 11 - Ocorrência de astrovírus e norovírus GII em mexilhões e ostras coletadas desde o Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape durante o período 2016–2017.	99
Tabela 12 - Amostras positivas e sequenciadas de norovírus detectadas no presente trabalho, e depositadas no GenBank com seus respectivos códigos de acesso.	104
Tabela 13 - Sequências de nucleotídeos de EPEC utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do nome, origem, tipo de amostra e respectivos números de acesso no GenBank.	147
Tabela 14 - Sequências de nucleotídeos de NoV utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do genótipo, nome, origem e respectivos números de acesso no GenBank.	148

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 903 pb do gene <i>phoA</i> , entre sequências da amostragem 1 e 8 sequências da amostragem 2 detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de <i>Escherichia coli</i> recuperadas do GenBank.	153
Quadro 2 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 903 pb do gene <i>phoA</i> , entre 13 sequências da amostragem 3 detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de <i>Escherichia coli</i> recuperadas do GenBank.....	154
Quadro 3 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 903 pb do gene <i>phoA</i> , entre 13 sequências da amostragem 4 detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de <i>Escherichia coli</i> recuperadas do GenBank.....	155
Quadro 4 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 903 pb do gene <i>phoA</i> , entre 11 sequências da amostragem 5 detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de <i>Escherichia coli</i> recuperadas do GenBank.....	156
Quadro 5 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 360 pb do gene <i>eae</i> , entre 6 sequências detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de EPEC recuperadas do GenBank.....	157
Quadro 6 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 120 pb do gene RdRp, entre 8 amostras detectadas por RT-PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outros NoV recuperados do GenBank.....	158
Quadro 7 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 120 pb do gene RdRp, entre 8 amostras detectadas por RT-PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de NoV recuperadas do GenBank.	159
Quadro 8 - Valores de NMP de coliformes totais e termotolerantes em 100 g das amostras de ostras e mexilhões em NMP/g.....	160
Quadro 9 - Listagens das amostras positivas para o gene <i>phoA</i> e <i>eae</i>	162
Quadro 10 - Listagens das amostras positivas para norovírus.	164

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HAdV	Adenovírus
A/E	Attaching and affacing
APHA	American Public Health Association (Associação Americana de Saúde Pública)
AstV	Astrovírus
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centros para Controle e Prevenção de Doenças)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEE	Comunidade Econômica Europeia
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cooperostra	Cooperativa dos Produtores de Ostra de Cananéia
CT	Coliformes totais
Ct	Coliformes termotolerantes
DAEC	<i>E. coli</i> difusamente aderente
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAHEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa hemorrágica
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
EV	Enterovírus
EU SQAP	The European Union Shellfish Quality Assurance Programme
FAO	Food Agricultural Organization (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points (Análise de Perigos e Pontos de Críticos de Controle)
<i>ipaH</i>	Gene de invasão do plasmídeo
MPA	Ministério de Pesca e Aquicultura

NMP	Número Mais Provável
NoV	Norovírus
LT	Toxina termo-lábil
ORF	Open Reading Frame (Fase de leitura aberta)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PEG	Polietilenglicol
PNCMB	Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RdRp	RNA dependente polimerase
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (<i>Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição</i>)
RNA	Ribonucleic Acid (Acido Ribonucléico)
RoV	Rotavírus
RT	Reverse Transcriptase (Transcrição reversa)
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina shiga
ST	Toxina termo-estável
SRSV	Small Round Structured Viruses
TAE	Tris-Acetato/EDTA
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultravioleta
VHA	Vírus da Hepatite A
VHE	Vírus da Hepatite E
VP	Viral Protein (Proteína viral)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
kb	Quilobase
Kcal	Quilocaloria
KDa	Quilodaltons
L	Litro
>	Maior
≥	Maior o igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
mL	Mililitro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
n	Número de amostras
nt	Nucleotídeo
%	Por cento
pb	Par de base
s	Segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Degradação ambiental	27
2.2 Aspectos da produção de consumo de pescado	28
2.3 Importância dos moluscos bivalves	31
2.4 Caracterização dos moluscos bivalves	32
2.5 O Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape	33
2.6 Contaminação dos moluscos bivalves	35
2.6.1 Contaminação microbiológica em moluscos bivalves	38
2.6.2 Bactérias indicadoras de contaminação fecal em moluscos bivalves	40
2.7 <i>Escherichia coli</i>	41
2.8 <i>Escherichia coli</i> em moluscos bivalves	44
2.9 Vírus entéricos	45
2.9.1 Norovírus	46
2.9.2 Astrovírus	49
2.9.3 Pesquisas realizadas para verificar a contaminação viral em moluscos bivalves	51
2.10 Métodos de prevenção de vírus entéricos	52
2.11 Métodos de detecção de vírus entéricos em moluscos bivalves	53
2.12 Métodos de descontaminação dos moluscos bivalves	55
2.13 Legislação referente à qualidade de moluscos bivalves	56
3. OBJETIVOS	60
3.1 Objetivo geral	60
3.2 Objetivos específicos	60
4. MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1 Modelo experimental	61
4.2 Metodologia	62
4.2.1 Descrição da área de estudo	62
4.2.2 Amostragem e preparação	63
4.2.3 Análises microbiológicas	63
4.2.4 Identificação molecular dos patótipos de <i>Escherichia coli</i>	65
4.2.5 Detecção de vírus entéricos – Astrovírus e Norovírus	68
4.2.6 Sequenciamento nucleotídico	73

4.2.7	Alinhamento de sequências nucleotídicas	73
4.2.8	Análise filogenética.....	73
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	Análises microbiológicas	75
5.1.1	Contagem de coliformes totais e termotolerantes	75
5.2	Identificação e caracterização dos patótipos de <i>Escherichia coli</i>	80
5.2.1	Identificação microbiológica e bioquímica dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	80
5.2.2	Identificação molecular de <i>Escherichia coli</i>	82
5.2.3	Identificação molecular dos patótipos de <i>Escherichia coli</i>	86
5.2.4	Sequenciamento nucleotídico e alinhamento das sequências de <i>Escherichia coli</i>	90
5.2.5	Análise de similaridade das sequências de <i>Escherichia coli</i>	90
5.2.6	Análises filogenéticas e de similaridade do patótipo de <i>Escherichia coli</i>	91
5.3	Detecção de astrovírus	94
5.4	Detecção de norovírus.....	100
5.4.1	Sequenciamento nucleotídico e alinhamento das sequências.....	103
5.4.2	Análises filogenéticas e de similaridade de norovírus	105
6.	CONCLUSÕES.....	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
	APÊNDICE	147

1. INTRODUÇÃO

Para as indústrias de alimentos e outros setores ligados à segurança de alimentos, a garantia da qualidade de qualquer alimento é um ponto crítico (DI RENZO et al., 2015). A aquicultura vem emergindo como uma das culturas mais importantes pela rápida expansão e rentabilidade em termos de importância nutricional na economia mundial (DIEGO et al., 2013). No entanto, ao longo dos anos um processo de degradação ambiental ocorre no ambiente marinho e costeiro (MORESCO et al., 2012), provocado pela pressão sobre os recursos naturais e pela capacidade limitada desses ecossistemas absorverem os impactos resultantes (GRAYMORE et al., 2010).

As zonas costeiras são potencialmente afetadas por grandes fontes de água contaminada, como rios ou esgotos tratados inadequadamente (CAMPOS et al., 2017a), podendo comprometer a qualidade da água para o cultivo de moluscos bivalves (WANG; DENG, 2012). Esta situação não é notada somente em países em desenvolvimento, por exemplo, nos Estados Unidos da América foi relatado no ano 2009 pela U.S. EPA (*United States Environmental Protection Agency*) que 50% de suas praias apresentaram altas contagens de bactérias de origem fecal (MULUGETA et al., 2012). Outra consequência é a contaminação dos moluscos bivalves, que durante vários anos têm sido reconhecidos como alimentos de alto risco de veiculação de doenças infecciosas (SHIEH et al., 2000; BOXMAN et al., 2006; YILMAZ et al., 2010; POLO, et al., 2014a; RANDAZZO et al., 2018) por parte da indústria de alimentos (DIEGO et al., 2013) e das agências de saúde (CORMIER et al., 2014). Isto se deve à capacidade de filtrar e concentrar contaminantes presentes na água, incluindo bactérias e vírus patogênicos (LOWTHER et al., 2008; WALKER et al., 2017). Este risco é aumentado porque normalmente são consumidos *in natura* ou mal - cozidos (CROCI et al., 2012).

Em países como Estados Unidos da América (EUA) e Austrália, o percentual de surtos associados com moluscos bivalves é de cerca de 10 a 20%, mas esse percentual aumenta para 70% nos países em que o consumo de moluscos bivalves é maior, como por exemplo, o Japão (TERIO et al., 2010). No Brasil, a conscientização do público sobre os riscos da ingestão de moluscos bivalves crus ou levemente cozidos deve ser incentivada e dirigida para toda a população (DIEGO et al., 2013), particularmente para categorias de população como os idosos, crianças e pacientes imunocomprometidos, nos quais uma infecção pode ser mais severa (CARDEMIL et al., 2017).

A qualidade microbiológica dos moluscos bivalves é normalmente avaliada por bactérias indicadoras de contaminação fecal (SCHAEFFER et al., 2013), sendo coliformes termotolerantes (WANG; DENG, 2012; BRAKE et al., 2014) e *Escherichia coli* (*E. coli*) os indicadores mais empregados (SALAS-MASSO et al., 2018). No entanto, as bactérias não são indicadores totalmente confiáveis da presença de vírus entéricos em moluscos bivalves (LODDER-VERSCHOOR et al., 2005; DA SILVA LUZ; MIAGOSTOVICH, 2017), porque geralmente as partículas virais são mais resistentes à inativação e, quando são submetidas ao processo de depuração, estas partículas são mais lentamente removidas (POLO et al., 2014a). Portanto, para a avaliação de vírus, têm sido propostos como indicadores termotolerantes, os vírus entéricos humanos (KURODA, et al., 2015). Estes tipos de vírus são os de maior relevância encontrados em ambientes contaminados por esgoto sanitário (TEUNIS et al., 2010). Uma ampla variedade de doenças no homem pode ser causada por mais de 100 espécies de vírus presentes nestas águas (HARAMOTO et al., 2018). Estes vírus podem se multiplicar no trato gastrointestinal (LE GUYADER et al., 2010; MORESCO et al., 2012), porque são muito resistentes ao ambiente ácido do estômago, às condições básicas do intestino delgado e às enzimas proteolíticas (DE GRAAF et al., 2017) e em pessoas infectadas são eliminados em grandes quantidades pelas fezes (POLO et al., 2015) ou urina (GENG et al., 2016).

Os surtos de origem alimentar que causam gastroenterite e morte em todo o mundo estão cada vez mais sendo reconhecidos como de origem viral (HORM; D'SOUZA, 2011). Mais de um bilhão de casos de diarreia aguda gerados por estes patógenos são estimados anualmente em crianças e adultos em todo mundo (FINKBEINER et al., 2012). Um grande número de surtos associados aos moluscos bivalves, foram atribuídos a vírus entéricos, particularmente, norovírus (LE GUYADER et al., 1996; LE GUYADER et al., 2003; NG et al., 2005; LE GUYADER et al., 2006; LE GUYADER et al., 2010; IRITANI et al., 2014; LUNESTAD et al., 2016), que causaram surtos em vários países, como França, Suécia, Irlanda e EUA (LE GUYADER et al., 2008; NENONEN et al., 2009; DORE et al., 2010; WOODS et al., 2016). Nos EUA, o norovírus humano foi responsável por mais de 50% de todas as doenças de origem alimentar causadas por patógenos conhecidos, dados que foram relatados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2018). Em crianças com diarreia, estima-se que o astrovírus humano foi o responsável por 10% dos casos no mundo em 2015 (CADDY; GOODFELLOW, 2015).

O monitoramento adequado da presença de patógenos no ambiente pode melhorar a qualidade das decisões a serem tomadas no âmbito de saúde pública, ambiental e pelas indústrias de alimentos. Além disso, há poucos estudos sobre o isolamento de patótipos de *E. coli* e contaminação viral de moluscos bivalves em ecossistemas costeiros no Brasil. Diante do exposto, a presente pesquisa teve como finalidade avaliar a contaminação de mexilhões (*Mytella falcata*) e ostras (*Crassostrea brasiliana*) provenientes do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape no sul do Estado de São Paulo, por bactérias (coliformes totais, coliformes termotolerantes e patótipos de *Escherichia coli*) e vírus entéricos (astrovírus e norovírus humanos).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Degradação ambiental

Ao longo das últimas décadas, a população mundial duplicou, enquanto o consumo de água multiplicou-se por sete (DA CONCEIÇÃO DORNELLAS; CAMPOS, 2010). Tendo em vista que 97% da água existente no planeta são salgadas (mares e oceanos) e que 2% formam geleiras e calotas polares inacessíveis, resta apenas 1% de água doce, armazenada em lagos, lençóis subterrâneos e rios, distribuídos pela terra (MORAES; JORDÃO, 2002). O uso da água tem se intensificado com o desenvolvimento econômico, tanto no que se refere ao incremento da quantidade demandada para determinada utilização, quanto à variedade dessas utilizações (TORES et al., 2018).

Oceanos e seres humanos têm interagido desde a antiguidade, porque os oceanos representam uma fonte expressiva de produção de alimentos, diversidade biológica, água, oxigênio, além de outros aspectos importantes para a saúde humana (MOURA et al., 2011). No entanto, ecossistemas costeiros e marinhos danificados em decorrência de desastres naturais ou como resultado da inadequada exploração humana levaram a uma série de consequências negativas para a saúde humana (OLIVEIRA, 2016).

Podemos inferir como consequências negativas as alterações climáticas, as condições meteorológicas extremas, os eventos naturais, a acidificação do oceano, a proliferação de algas nocivas, os microrganismos patogênicos, a resistência aos antibióticos, os produtos químicos, os plásticos marinhos e os nanomateriais e como fatores benéficos e oportunidades, a aquicultura, a biodiversidade, a biotecnologia marinha sustentável, as comunidades costeiras sustentáveis, a energia marinha renovável, a pesca sustentável, os produtos naturais e farmacêuticos, a recreação ao ar livre e a saúde (FLEMING et al., 2006).

Assim, torna-se clara a relação que existe entre o homem e os ecossistemas aquáticos para a obtenção de alimentos e para fins recreativos. Contudo, a contaminação microbiana por bactérias, fungos e vírus, relacionada direta e indiretamente à atividade humana por causa de fatores urbanos, industriais e resíduos agrícolas é evidente. Esta contaminação pode impactar o ambiente aquático produzindo componentes poluentes que podem entrar na cadeia alimentar humana e ocasionar problemas de saúde (EREGNO et al., 2018). De fato, a contaminação metálica em ambientes aquáticos tem recebido grande preocupação devido a sua toxicidade (NAIFAR et al., 2018).

A obtenção de alimentos de origem marinha tem sido afetada pela poluição das áreas costeiras. Destacando a produção e emissão de poluentes, desenvolvimento da infraestrutura, atividades agrícolas, desenvolvimento industrial, urbanização e turismo. Mas, o maior volume de resíduos descarregados para o ambiente marinho é de esgoto, que contém resíduos industriais, urbanos, restos de animais, abatedouros e resíduos domésticos (ALVARENGA, 2016).

Atualmente, 24,6% da população brasileira vive em municípios litorâneos, respondendo por 4,1% da área total do país (IBGE, 2011). A extensão da costa brasileira, a rápida industrialização e o desenvolvimento econômico nas regiões costeiras resultam na utilização dos estuários para despejo de efluentes urbanos e industriais, os quais contêm poluentes. Esse fato representa uma contínua introdução desses poluentes em ambientes estuarinos e costeiros oriundos de rios, lixiviação, escoamento das águas de regiões industrializadas, com consequente contaminação dos organismos marinhos e do ser humano que os consome (DA SILVA FERREIRA et al., 2013). Esse impacto da concentração populacional e o desenvolvimento de várias atividades econômicas nos ecossistemas costeiros são notáveis devido ao baixo planejamento ambiental e territorial e à falta de infraestrutura, especialmente saneamento (FONTENELLE et al., 2015).

2.2 Aspectos da produção de consumo de pescado

Segundo a *Food and Agricultural Organization*, a produção pesqueira mundial total, agrupando os produtos obtidos por pesca extrativa e a aquicultura no ano de 2016 atingiu a marca de 170,9 milhões de toneladas, das quais cerca de 151,2 milhões foi destinada ao consumo humano. A melhoria nos canais de distribuição e o crescimento constante da produção de pescado proporcionaram um considerável aumento no fornecimento de alimentos da pesca e aquicultura nas últimas cinco décadas, com uma taxa média de crescimento de 3,2% no período compreendido entre 1961-2013, superando o índice de crescimento da população de 1,6% (FAO, 2018).

Esse contínuo incremento da produção de pescado indica não só o crescimento da população, mas também aumento do consumo de pescado pela população ao longo dos últimos anos. O consumo mundial per capita de pescado registrou um aumento médio de 9,9 kg em 1960 para 14,4 kg na década de 1990, 19,7 kg em 2013 e 20,1 em 2014 (FAO, 2016).

O consumo ainda é baixo, mesmo tendo aumentado nos últimos anos para 9,5 kg habitante/ano (Associação Brasileira de Piscicultura, 2018), valor ainda abaixo do mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (WHO), que é de 12 kg por habitante por ano (ROCHA et al., 2013). Todos os produtos derivados da pesca e o pescado são considerados como alimentos nutritivos e diversificados que representam uma importante fonte de proteínas de alta qualidade e micronutrientes essenciais para uma nutrição equilibrada e boa saúde. Em 2013, o pescado representou cerca de 17% do consumo de proteínas de origem animal pela população mundial e de 6,7% de todas as proteínas consumidas (FAO, 2018).

Os produtos derivados dos animais aquáticos têm seu consumo recomendado em virtude de suas características nutricionais (FAUCONNEAU, 2002) e entre os possíveis benefícios da ingestão de uma ou duas porções de peixe por semana, estão a redução do risco de acidente vascular cerebral, do mal de Alzheimer e de morte por doença cardíaca (DE OLIVEIRA SARTORI; AMANCIO, 2012).

Uma mudança nos padrões alimentares vem ocorrendo, buscando uma alimentação mais saudável e gerando um aumento na demanda de pescado e produtos à base de pescado a cada ano (ROCHA et al., 2013). Sendo assim, o consumo per capita de pescado será cada vez mais dependente da disponibilidade dos produtos da aquicultura; por isso a aquicultura deve se adequar às exigências do consumidor, porque quase metade da produção de pescado já é originada desta forma de produção, que deve superar a pesca extrativa em alguns anos (FAO, 2010).

Desde meados dos anos 1990, a produção de pesca extrativa tem se estabilizado e vem se mantendo, com valores em torno de 90 milhões de toneladas, enquanto a aquicultura tem apresentado um crescimento na produção pesqueira mundial total, com valores de 13,4% em 1990, 25,7% em 2000 e 42,2% em 2012 (FAO, 2016). Esta mudança no panorama se deve ao fato que os estoques de pescado de pesca extrativa vêm mostrando um declínio nas últimas décadas. Esta tendência pode ser atribuída à exploração dos estoques marinhos pelo livre acesso, falta de fiscalização e técnicas predatórias (SODRÉ et al., 2008).

Por estes motivos, a aquicultura desponta como o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo, sendo praticada em vários países como China, Indonésia, Estados Unidos de América, Rússia, Japão e Peru. O Brasil possui grande potencial para a aquicultura devido a seu clima favorável, a sua dimensão territorial (8,5 milhões de km²), extensão costeira

de aproximadamente 8.000 quilômetros, disponibilidade de água doce renovável do planeta, diversidade de biomas e imensa biodiversidade. Essa exploração dos recursos naturais poderá gerar alimentos de alto valor biológico, novos empregos e renda (ROCHA et al., 2013).

A produção em aquicultura pode ser dividida em duas categorias principais: aquicultura continental e maricultura. A produção mundial de pescado comestível obtida a partir de aquicultura continental e maricultura apresentava o volume de 2,35 milhões toneladas em 1980. No entanto, o crescimento da aquicultura continental desde então tem sido superior ao crescimento da maricultura, com taxas de crescimento médias anuais de 9,2% e 7,6%, respectivamente (FAO, 2014).

A produção de moluscos bivalves é uma cultura de retorno financeiro em muitas partes do mundo (SAPKOTA et al., 2008). Em 2012, a maricultura (24,7 milhões de toneladas) foi dominada pelos moluscos (malacocultura), com uma participação de 60,3% (14,9 milhões de toneladas), na sua maioria são representados por ostras, mexilhões, berbigões e outros (FAO, 2014). No ano de 2017, a produção de moluscos foi estimada em 16 milhões de toneladas (FAO, 2017).

A malacocultura é considerada uma atividade ambientalmente sustentável, que promove a preservação dos recursos naturais marinhos, provê uma coleta sustentável de alimentos de alta qualidade e valor econômico e proporciona a fixação de comunidades tradicionais em seus locais de origem, gerando empregos e desenvolvimento social (BARBIERI et al., 2014). No Brasil, o seu desenvolvimento deve seguir as orientações do Código de Conduta para o Desenvolvimento Sustentável e Responsável da Malacocultura Brasileira do ano 2009 atendendo às recomendações referentes à seleção de áreas e instalação das fazendas de moluscos, padrão de equipamentos e construção, destinação de resíduos sólidos e líquidos, impacto visual, controle das incrustações e odores desagradáveis, uso de embarcações, veículos, estruturas e equipamentos de cultivo, uso e armazenamento de combustíveis, lubrificantes e outros produtos químicos, segurança na navegação, controle ambiental e sanitário da produção, coleta de sementes do ambiente marinho.

Na América do Sul, o Brasil ocupa o segundo lugar na produção de moluscos, superado apenas pelo Chile. No Brasil, a produção de moluscos bivalves é significativa nos Estados de Santa Catarina, Espírito Santo e São Paulo (RISTORI et al., 2007). No ano de 2015, o Estado de Santa Catarina teve uma produção de 17.000 toneladas de mexilhões e 3.000 toneladas de

ostras (SCARDUA et al., 2017), representando quase o total da produção nacional. No entanto, nas regiões Sudeste e Sul, foi observado um incremento de 19% e 21% na produção de moluscos, respectivamente. A produção de mexilhões aumentou pelos baixos custos de produção, representando uma importante alternativa para pescadores, que vêm sendo afetados pela falta de perspectivas para a pesca tradicional e que migraram para a malacocultura como atividade principal de geração de renda (OSTRENSKY et al., 2007).

2.3 Importância dos moluscos bivalves

O termo marisco engloba os seguintes animais: os moluscos bivalves e gastrópodes (amêijoas, berbigões, caracóis, mexilhões e ostras) e os crustáceos (camarão, caranguejo e lagosta) (COSTA, 2013). As propriedades nutritivas de moluscos bivalves têm sido amplamente estudadas por muitos anos (FAJARDO et al., 2014) e eles são vistos como parte importante de uma dieta saudável e equilibrada (RITTENSCHÖBER et al., 2013). Como alimento, são caracteristicamente macios, facilmente digeridos, sem aditivos e minimamente processados (OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, são importantes fontes de proteína e a incorporação destas proteínas em algumas populações (jovens e idosos) que requerem um fornecimento equilibrado de aminoácidos essenciais é muito interessante (FAUCONNEAU, 2002). São considerados uma boa fonte de minerais como cálcio, iodo, magnésio, selênio e zinco (RITTENSCHÖBER et al., 2013). Também, têm um bom conteúdo de aminoácidos essenciais e presença de antioxidantes como o tocoferol (IKIZ et al., 2016). Finalmente, estes produtos são uma fonte de vitaminas A, B₁₂, C e D (BOSCH et al., 2017).

As ostras são importantes fontes de proteína, vitamina A, vitamina B₁₂ e zinco (CHEN et al., 2016), e lipídios benéficos à saúde, principalmente relacionados com a prevenção e proteção contra doenças cardiovasculares, como os ácidos graxos ômega-3 e minerais, além de seu reduzido valor calórico quando comparados a outras carnes (PARISENTI et al., 2010). O mexilhão é uma fonte proteica de reduzido conteúdo lipídico (1,1 g/100g) e calórico (72,7 Kcal/100g), isto é, um alimento conveniente para o padrão de vida, que devido à tendência sedentária, exige uma menor ingestão calórica diária (FURLAN et al., 2007).

O cultivo de moluscos bivalves se desenvolve principalmente em ambientes estuarinos e regiões costeiras, sendo que os sistemas mais comuns são do tipo suspenso, que pode ser fixo do tipo “varal” ou sistema flutuante de tipo espinhel (*long line*) (STROHMEIER et al., 2005). Em locais com profundidades inferiores a três metros, com mar calmo, de fundo areno-lodoso e próximo à costa, é utilizado o sistema suspenso-fixo. O sistema suspenso flutuante é, de

maneira geral, utilizado em locais com profundidades superiores a três metros e que apresentam baixas e médias velocidades de corrente (OSTRENSKY et al., 2007).

2.4 Caracterização dos moluscos bivalves

Mexilhão (*Mytella falcata*): pertence à família dos mitilídeos (CEUTA; BOEHS, 2012), identificado por possuir duas valvas (POTASMAN et al., 2002; PEREIRA et al., 2003). Suas brânquias são órgãos-chave envolvidos na absorção de nutrientes, digestão e respiração (DAVID et al., 2008). É um bivalve tropical cuja distribuição nativa se estende da América Central até América do Sul (DORNELLES et al., 2018). Habita as zonas intermareais, associados às raízes do mangue-vermelho (*Rhizophora mangle*) (CEUTA; BOEHS, 2012) e é usado em todo o mundo como um bioindicador efetivo para avaliar o estado dos ecossistemas estuarinos (MARQUES et al., 2014). No Brasil, é popularmente conhecido como "sururu" (PEREIRA; GRAÇA-LOPES, 1995), é amplamente consumido no nordeste brasileiro, principalmente no Estado de Alagoas (SANTOS et al., 2014). O mexilhão é comercialmente explorado como alimento (MAIOLI et al., 2010) e às vezes é a única fonte de proteína de comunidades de baixa renda (DAVID et al., 2008), mas tem excelente aceitação na culinária, além de fácil localização e captura (SANTOS et al., 2014). Esta espécie apresentou em 2011 produção nacional de cerca de 2.100 toneladas, com um aumento de 0,8% em relação a 2010 (PALMEIRA et al., 2016).

Ostra (*Crassostrea brasiliana*): também conhecida como ostra do mangue é um dos mais importantes recursos da pesca artesanal do Complexo Estuário Lagunar de Cananéia-Iguape/SP. Desde a década de 1940, é explorada comercialmente no estuário, inicialmente para a subsistência e, após a década de 1950, comercialmente (MACHADO et al., 2011). É encontrada desde o sul do Caribe até o Uruguai, incluindo o litoral brasileiro (LUZ; BOEHS, 2015). No Brasil, se desenvolve basicamente nas regiões Sul e Sudeste, registrando-se uma taxa de incremento de 23% na região Sul, responsável por 98% da produção total da espécie, e uma queda de 2,3% na região Sudeste, em 2004 (OSTRENSKY et al., 2007). Habita principalmente as raízes do mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) (LUZ; BOEHS, 2015), baías e estuários (BRANDAO et al., 2013). O maior produtor da *Crassostrea* em bancos naturais é o Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape, que se encontra no sul do litoral paulista (RUPP et al., 2008). O Brasil destaca-se na América Latina como o primeiro produtor de ostras e outros moluscos bivalves, sendo que 97% da ostra (*Crassostrea gigas*) consumida no país é proveniente de fazendas de cultivo (PARISENTI et al., 2010). A *Crassostrea* se reproduz

durante todo o ano, mas com maior intensidade de junho até metade de dezembro, coincidindo com o aumento na temperatura da água, fator que atua em conjunto com a disponibilidade de alimentos (GONZALEZ et al., 2011).

2.5 O Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape

Um estuário é um corpo de água que tem entrada de água do rio no limite terrestre e uma conexão aberta ao mar (LEUVEN et al., 2016). Os estuários estão sujeitos a flutuações intensas de fatores ambientais como aquecimento global, nutrientes, turbidez, salinidade, mudança de uso do solo, ciclones tropicais, secas e nível do mar (WETZ; YOSKOWITZ, 2013). O aumento da intensidade das atividades humanas nas áreas costeiras aumentou a pressão sobre estes recursos costeiros estuarinos, muitas vezes com efeitos adversos no meio ambiente e na sociedade (LONSDALE et al., 2018).

Em áreas de estuário pode-se encontrar o manguezal, característico das regiões tropicais e subtropicais, um ecossistema costeiro que normalmente se encontra entre ambientes terrestres e marinhos (DA COSTA SOUZA et al., 2014). O manguezal representa uma área de aproximadamente 20 milhões de hectares em todo o mundo, com grandes extensões em países como Malásia, Índia, Brasil, Venezuela, Nigéria e Senegal (OTERO et al., 2006). Os manguezais representam locais importantes para o ciclo de vida de diversas espécies, incluído os moluscos bivalves (PALMEIRA et al., 2016). Os manguezais brasileiros compreendem principalmente as seguintes espécies: *Avicennia* sp., *Laguncularia racemosa* e *Rhizophora mangle* (CASTRO et al., 2018).

O complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape compreende os municípios de Cananéia, Iguape e Ilha Comprida, localizado no sul do Estado de São Paulo, Brasil (Figura 1) (SAITO et al., 2006; BARBIERI et al., 2012) e é considerado uma das áreas úmidas mais importantes da costa brasileira em termos de biodiversidade e produtividade primária (BARROS; BARBIERI, 2012), reconhecido pela UNESCO (*United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*) como o terceiro ecossistema mais produtivo do Atlântico Sul, em função de suas características bem preservadas. A grande Bacia do Ribeira abrange uma área de 24.980 km², dos quais 61% correspondem ao Estado de São Paulo e 39% pertencem ao Estado do Paraná (BARROS; BARBIERI, 2012). Consiste em uma rede complexa de canais estuarinos e lagunares que estão conectados diretamente com o rio Ribeira de Iguape através do canal artificial Valo Grande (TRAMONTE et al., 2018), limitado pelas quatro principais ilhas (Cananéia, do Cardoso, Comprida e Iguape) e com duas conexões para o Oceano Atlântico

(MIYASHITA; CALLIARI, 2014). A água fresca que entra ao estuário procede da drenagem continental de vários rios pequenos, principalmente do rio Ribeira de Iguape, o principal rio desta região (NISHIGIMA et al., 2001).

Figura 1 - Localização do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape.

Fonte: Adaptado de SAITO et al. (2006). A model of recent sedimentation in the Cananéia–Iguape estuary, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**. v. 8, p. 419-430, 2006.

O rio Ribeira de Iguape descarrega cerca de 60% de seu volume através dos canais internos do estuário, causando uma crescente sedimentação dos canais pela deposição de sedimentos lamacentos em suspensão transportados pela drenagem do Ribeira de Iguape. Assim, o material continental é transferido para o sistema marítimo no litoral sul do Estado de São Paulo, não só na foz do rio Ribeira de Iguape, mas também na foz do estuário (SAITO et al., 2006).

Existem recursos vivos abundantes nesta região, explorados há muitas décadas e que constituem uma atividade econômica importante, principalmente para a comunidade de pescadores artesanais locais (MENDONÇA; KATSURAGAWA, 2001). Possui condições propícias para a formação de bancos naturais de moluscos bivalves (BALLESTEROS et al., 2016) e para a implantação de engorda e extração da ostra (*Crassostrea* sp.), sendo esta região responsável pela maior produção de ostras do Estado de São Paulo (DOI et al., 2015). Em Cananéia, as ostras são produzidas pelo sistema de engorda em tabuleiros de forma artesanal e em pequena escala, envolvendo os moradores das próprias comunidades, o que permite a estes o desenvolvimento de uma atividade de vocação natural, estimulando a fixação das populações

no litoral. Além disso, contribui para o fortalecimento das comunidades tradicionais e valorização da cultura regional. Outros benefícios são a diversificação das atividades do setor pesqueiro, preservação dos ambientes aquáticos e aumento das opções ao turismo através do turismo gastronômico (BARBIERI et al., 2014).

Em 1999, foi fundada a Cooperativa dos Produtores de Ostra de Cananéia (Cooperostra), que comercializava ostras provenientes de viveiros de engorda localizados no complexo estuarino (BALLESTEROS et al., 2016). A Cooperostra foi formada por vários membros de famílias, que representam a produção de 30-32 mil dezenas de ostras no ano 2013 (DIEGO et al., 2013). Cerca de 90% da produção era vendida pela Cooperativa ao longo da costa norte e sul de São Paulo e na capital do Estado.

Dentre as comunidades que exploram comercialmente a ostra, se destaca a comunidade Mandira, que está localizada na parte continental do município de Cananéia e é composta por cerca de 70 pessoas, que exploram o cultivo de ostras como sua principal fonte de renda, desde os anos 70. No ano de 2002, cerca de 1.200 hectares de mangue, utilizados pela comunidade Mandira, foram transformados em Reserva Extrativista (Resex do Mandira), isto é, uma unidade de conservação de uso sustentável, com utilização permitida às populações extrativistas tradicionais, cuja subsistência baseia-se no extrativismo ou em outras atividades de baixo impacto para o meio ambiente e visa assegurar os meios de vida destas populações e o uso sustentável dos recursos naturais (MACHADO et al., 2013).

2.6 Contaminação dos moluscos bivalves

As preocupações com a contaminação dos ambientes aquáticos têm aumentado, principalmente devido à escassez de água potável em todo o mundo (MORESCO et al., 2012). Os moluscos bivalves representam espécimes interessantes por terem contato direto com a contaminação e sedimentos aquáticos que se encontram na água contaminada (SAPONE et al., 2016). Uma vez que muitos são alimentados por filtração, possuem potencial de bioacumulação de contaminantes (SAUVE et al., 2002; KELLER et al., 2013). A taxa de filtração é de aproximadamente 4 a 20 litros por hora (SEO et al., 2014), podendo acumular vírus, bactérias, parasitos (FAUCONNEAU, 2002; SOUZA et al., 2017) e metais pesados no intestino (EL NEMR et al., 2016), mucosas das brânquias e outros tecidos (BIGORAJ et al., 2014). Problemas de saúde humana associados a moluscos bivalves são reconhecidos internacionalmente e foram registrados desde os tempos medievais (LEES, 2000).

O processo de absorção dessas partículas pelos moluscos bivalves se dá quando os animais captam o material particulado em suspensão na água que flui atrás da cavidade do manto pelas brânquias, as quais se apresentam pregueadas, alongadas e ciliadas, capazes de concentrar o material particulado. A seleção se dá por tamanho (tipicamente entre 1 - 7 μm dependendo da espécie de molusco) e também por critérios bioquímicos e de palatabilidade. A seleção das partículas durante a alimentação ocorre paralelamente em diferentes órgãos e começa pela retenção nas brânquias, seguida da triagem nas mesmas ou nos palpos labiais, que rejeitam as partículas não selecionadas, via pseudofeces e, finalmente, a partícula é absorvida no estômago (BEECHAM, 2008; GALVÃO et al., 2010).

Figura 2 – Visão simplificada do processo de absorção de nutrientes nos moluscos bivalves.

Fonte: Adaptado de BEECHAM, (2008). Literature Review on Particle Assimilation by Molluscs and Crustaceans. **CEFAS Environment Report**, 2008.

Os perigos representados pela bioacumulação de microrganismos nocivos são agravados pelo consumo tradicional de certas espécies de moluscos crus ou apenas mal - cozidos (LA ROSA et al., 2012; PADOVAN et al., 2017) e pelo consumo de todo o animal, incluindo vísceras (LEES, 2000). Essas circunstâncias são únicas em moluscos bivalves, representando, portanto, um caso especial entre os riscos microbianos associados a estes alimentos (CAMPOS et al., 2015). Neste contexto, a alimentação com moluscos bivalves representa uma fonte importante para a transmissão de doenças, pela capacidade de acumular e concentrar agentes patogênicos, especialmente quando são cultivados nas zonas costeiras contaminadas por esgoto (LE GUYADER et al., 2009; DORE et al., 2010).

O lançamento de esgotos em águas costeiras causa modificações físicas, químicas e biológicas, promovendo o aumento da turbidez, diminuição do oxigênio dissolvido e do pH, afetando diretamente a qualidade da água (BARBIERI et al., 2012). A descarga direta ou indireta de resíduos de origem fecal, como esgoto tratado ou sem tratamento, causa a contaminação das águas do litoral por bactérias, vírus, metais pesados e outros contaminantes

(CAMPOS et al., 2017b), interrompendo assim o equilíbrio microbiológico dos ambientes marinhos e impactando na água utilizada para fins recreativos, pesca e para o cultivo de moluscos bivalves (MORESCO et al., 2012). Os moluscos bivalves cultivados em águas poluídas tendem a bioacumular vírus entéricos ambientalmente estáveis, como o Norovírus, (NoV), vírus da Hepatite A (VHA) (ATMAR et al., 1995) e o enterovírus (EV) (MESQUITA et al., 2011).

O controle do risco de doenças associadas a moluscos bivalves requer monitoramento dos Pontos de Críticos de Controle (APPCC) em conjunto com o gerenciamento da qualidade do meio ambiente aquático de crescimento, áreas de coleta e pós-coleta que possam envolver depuração e/ou tratamento térmico quando apropriado, seguindo recomendações da WHO (*World Health Organization*) (REES, 2010). A incidência de doenças transmitidas por alimentos não é bem conhecida, porque a informação compilada no mundo todo pelos sistemas de vigilância varia dependendo do tipo de doença e o país, não permitindo a comparação numérica dos dados encontrados (OLIVEIRA et al., 2011). A comissão do *Codex Alimentarius* publicou diretrizes sobre princípios gerais de higiene alimentar para controlar vírus em alimentos, com o Anexo I focado especificamente no controle de NoV e VHA em mariscos (WHO, 2008). Recomendou que os países monitorem os NoV e VHA em moluscos bivalves após surtos de doenças transmitidas por mariscos e eventos de alto risco (TOROK et al., 2018).

Quando os moluscos bivalves são comparados a outros alimentos como aves, carnes, ovos e derivados lácteos, representam um veículo importante de doenças transmitidas por alimentos (ROCOURT et al., 2003). Desde 1973 até 2006, crustáceos foram associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos no Estados Unidos da América; e dois deles registraram a presença de *E. coli* enteroagregativa e *E. coli* enterohemorrágica como agente etiológico (COSTA, 2013). Surtos de toxi-infecção pela toxina paralítica de molusco bivalves ocorreram em Massachusetts e no Alasca em junho de 1990 e esta doença foi apresentada por seis pescadores a bordo de um barco de pesca, sendo que o início da doença ocorreu depois que os homens comeram mexilhões azuis (*Mytilus edulis*), sendo estes dados reportados pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) (CDC, 1991a). Durante meados da década de 1990, o NoV genogrupo II (GII) foi o principal genogrupo causador de surtos de infecção em todo o mundo (ATMAR; ESTES, 2006). No Havaí, ocorreu um surto de gastroenterite pelo consumo de ostras e amêijoas, e as pessoas afetadas apresentaram manifestações clínicas como diarreia, cólicas abdominais ou vômito (CDC, 1991a; CDC, 1991b). Surtos de gastroenterite

associados ao consumo de ostras congeladas importadas e semi-descascadas ocorreram na Singapura entre dezembro de 2003 e janeiro de 2004. Foram notificados 305 casos com sintomas clínicos de diarreia (94%), cólicas abdominais (72%), vômito (69%) e febre (54%) (NG et al., 2005). Outro surto foi reportado ligado ao consumo de ostra envolvendo um grupo de mais de 200 pessoas na Itália e 127 pessoas na França (LE GUYADER et al., 2006). A literatura científica entre 1980 e 2012 reportou 368 surtos ocasionados por vírus transmitidos pela ingestão de alimentos associados a moluscos bivalves (BELLOU et al., 2013). Os agentes patogênicos virais mais comuns envolvidos foram NoV (83,7%) e VHA (12,8%) e as ostras foram o marisco mais frequentemente consumido associado a os surtos (58,4%) (HODGSON et al., 2017). Infecção por *Vibrio parahaemolyticus* foi associado ao consumo de moluscos bivalves de várias áreas de coleta da costa atlântica dos Estados Unidos da América em 2013, com 104 casos de isolamentos, em 13 Estados, com seis hospitalizações e sem óbitos (CDC, 2013).

2.6.1 Contaminação microbiológica em moluscos bivalves

Os microrganismos que podem ser considerados um risco para a saúde humana, associados à ingestão de moluscos bivalves são bactérias, protozoários, fungos e vírus (BRANDAO et al., 2013). As bactérias envolvidas são: *Aeromonas* spp. (COLAKOGLU et al., 2006; LATIF-EUGENIN et al., 2016), *Bacillus cereus* (FELDHUSEN, 2000), *Campylobacter* spp. (FELDHUSEN, 2000; MOORE et al., 2003), *Clostridium botulinum* (FELDHUSEN, 2000; LALITHA; GOPAKUMAR, 2001), *Clostridium perfringens* (GONZALEZ et al., 2011), *Escherichia coli* (BALIERE et al., 2015a), *Escherichia coli* O157 produtora da toxina Shiga (FELDHUSEN, 2000; BENNANI et al., 2011), *Listeria monocytogenes* (POTASMAN et al., 2002; IKIZ et al., 2016), *Salmonella* spp. (FELDHUSEN, 2000; YANG et al., 2015), *Shigella* spp. (VANTARAKIS et al., 2000; COVA et al., 2015), *Staphylococcus aureus* (AYULO et al., 1994; ZHANG et al., 2016), *Vibrio* spp. (FAJARDO et al., 2014; BANERJEE; FARBER, 2017), *Yersinia* spp. (FELDHUSEN, 2000; DIEGO et al., 2013). Os vírus são: adenovírus (KARAMOKO et al., 2005; RIGOTTO et al., 2005), NoV (NISHIDA et al., 2007; TERIO et al., 2010; CAMPOS et al., 2015; WOODS et al., 2016), rotavírus (RoV) (BAGORDO et al., 2013; KITTIGUL et al., 2015), vírus da hepatite E (LEES, 2000) e VHA (ATMAR et al., 1995; POLO et al., 2015). A Tabela 1 resume alguns agentes microbiológicos veiculados por moluscos bivalves e as principais características das doenças transmitidas por alimentos.

Tabela 1 - Agentes microbiológicos implicados em doenças transmitidas pelo consumo de moluscos bivalves.

Microrganismo	Período de incubação	Período de duração	Quadro clínico	Sintomas característicos	Referência
<i>Campylobacter jejuni</i>	2 -5 dias	2 - 10 dias	-	Diarreia, febre, vômito, cólicas.	Feldhusen, (2000)
<i>E. coli</i> enterotoxigênica	1 - 3 dias	3 - 7 dias	-	Diarreia aquosa, cólicas abdominais, febre, vômito.	Saxena et al. (2015)
<i>Listeria monocytogenes</i>	9 - 48 h	Variável	Listeriose, septicemia, infecções do sistema nervoso central, gastroenterite, Endocardite, artrite, encefalite, Infecções pulmonares.	Febre, dores musculares, náuseas, diarreia, dor de cabeça violenta ou explosiva e convulsões.	Calame et al. (2016)
<i>Salmonella</i> spp.	1 - 3 dias	4 - 7 dias	Gastroenterite e febre entérica (febre tifoide).	Diarreia, febre, vômito, cólicas abdominais.	Herrero-Fresno e Olsen, (2018)
<i>Shigella</i> spp.	24 - 48 h	4 - 7 dias	-	Diarreia, febre, vômito.	Puzari et al. (2018)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 - 6 h	24 - 48 h	-	Náuseas, vômito, cólicas abdominais, febre.	Oliveira et al. (2018)
<i>Vibrio vulnificus</i>	1 - 7 dias	2 - 8 dias	Infecções por feridas, septicemia, gastroenterite.	Vômito, diarreia, dor abdominal.	Elmahdi et al., (2016)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2 - 48 h	2 - 5 dias	Infecções por feridas, septicemia, gastroenterite.	Náuseas, cólicas abdominais, diarreia aquosa, vômito.	Banerjee e Farber, (2017)
<i>Vibrio cholera</i>	24 - 72 h	3 - 7 dias	Gastroenterite epidêmica e não epidêmica.	Diarreia aquosa profusa, vômito e desidratação causando a morte em horas	Clemens et al. (2017)
Adenovírus	10 - 70 h	2 - 9 dias	-	Náuseas, vômito, dor abdominal, mal-estar, dor de cabeça, febre.	Arnold e MacMahon, (2017)
Astrovírus	1 - 5 dias	2 - 3 dias	-	Diarreia aquosa, dor de cabeça, febre, dor abdominal e menos comumente vômitos	Bosch et al. (2014)
Enterovírus	10 - 70 h	2 - 9 dias	-	Náuseas, vômito, dor abdominal, mal-estar, dor de cabeça, febre.	Harvala et al. (2018)
Vírus da Hepatite A	15 – 50 dias	2 semanas até 3 meses	-	Diarreia, urina escura, sintomas gripais.	Thuener, (2017)
Norovírus	1 - 3 dias	24 – 60 h	-	Náuseas, vômito, grande volume de diarreia aquosa.	Woods et al., 2016

Fonte: Própria autoria.

2.6.2 Bactérias indicadoras de contaminação fecal em moluscos bivalves

As avaliações da qualidade sanitária de moluscos bivalves têm sido realizadas através de programas de monitoramento de microrganismos indicadores. Estes são utilizados para detectar o possível risco da presença de organismos patogênicos (DORE et al., 2010). Segundo Bosch (1998), um bom microrganismo indicador de contaminação fecal deve estar ausente nas áreas não poluídas e associado à fonte de patógenos, ocorrer em densidades mais elevadas que os patógenos, ter ao menos a mesma resistência à inativação natural e artificial que os patógenos, ser detectado por procedimentos simples, rápidos e baratos e não ser patogênico. Os microrganismos indicadores mais frequentemente utilizados para avaliar a qualidade das águas de cultivo e os moluscos bivalves são os coliformes, *E. coli* (KURODA, KEISUKE et al., 2015) e *Enterococcus* (HERNROTH; BADEN, 2018).

Os coliformes são um grupo heterogêneo de bactérias, que podem ser encontrados em animais de sangue quente, solos, vegetais ou qualquer efluente contendo matéria orgânica (HODGSON et al., 2017). O grupo de coliformes totais é caracterizado por bactérias na forma de bastonetes, Gram negativos, não formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de desenvolver na presença de sais biliares, oxidase-negativos, podem apresentar atividade da enzima β -galactosidase e que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a 35 - 37°C em 24 - 48 horas. Um subgrupo dos coliformes totais é o dos coliformes termotolerantes, anteriormente chamado coliformes fecais, formado por bactérias que, além das características do grupo coliformes totais, podem ser caracterizadas pela capacidade de fermentar a lactose, com produção de gás na temperatura de 44,5°C em 24 horas, tendo como principal representante a *E. coli* (SILVA et al., 2010).

As metodologias mais utilizadas para detecção de indicadores bacterianos em amostras ambientais e de alimentos, são as que se baseiam na contagem de células viáveis. Estas metodologias se fundamentam na habilidade da multiplicação celular em meio de cultura líquido (Caldo Triptose Lauril Sulfato, Caldo Verde Brilhante, Caldo *E. coli*) ou sólido (Ágar MacConkey) ou membrana filtrante. Estas metodologias podem ser divididas em método de tubos múltiplos, método de membrana filtrante e método do substrato definido (WALKER et al., 2017).

O método de tubos múltiplos, também conhecido como o método do Número Mais Provável (NMP) é uma técnica padrão internacional que se baseia na inoculação de tubos triplicados de meio líquido com o alimento em cada uma das séries de diluições consecutivas

em dez vezes (SILVA et al., 2010). Após a subcultura e os testes bioquímicos confirmatórios, a contagem de coliformes totais e termotolerantes por grama ou por mililitro é calculada usando tabelas estatísticas (OWEN et al., 2010).

2.7 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia*, que recebeu o nome do pediatra alemão Theodor Escherich (FRIEDMANN, 2006), é composto por bacilos Gram negativos (CHANDRASEKARAN et al., 2015) anaeróbios facultativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (GOMES et al., 2016). *E. coli* são parte da microbiota do intestino de humanos e outros animais (ROSA et al., 2016). De fato, a maioria das *E. coli* é considerada inofensiva e comensal para humanos (CROXEN; FINLAY, 2010). Os isolados de *E. coli* são caracterizados como microrganismos com 1,1 - 1,5 µm de diâmetro e 2 - 6 µm de comprimento (BAKER et al., 2016). No entanto, algumas cepas podem ser patogênicas e infectar a área intestinal, causando doenças severas (CLEMENTS et al., 2012).

As doenças diarreicas são um grave problema de saúde pública e uma grande causa de morbidade e mortalidade em bebês e crianças menores de 5 anos (HU; TORRES, 2015). Os países de baixa e média renda como Áfricanos, Latino Americanos e Asiáticos são as regiões mais afetadas com doenças diarreicas que ocorrem mais frequentemente com resultados letais principalmente devido a condições de vida precárias (abastecimento de água inadequada, falta de higiene ambiental, menor nível de saúde e saneamento e educação insuficiente) (GOMES et al., 2016; WHO, 2017).

As cepas de *E. coli* envolvidas em doenças diarreicas estão entre os mais importantes agentes etiológicos da diarreia, sendo que as cepas evoluíram devido à aquisição de fatores de virulência através da transferência horizontal, de um conjunto específico de características que persistiram com sucesso no hospedeiro (KAPER et al., 2004). Elas são classificadas de acordo com seus mecanismos de virulência, sintomas clínicos e consequências: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC) (VAN et al., 2008; GOMEZ-ALDAPA et al., 2016).

A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) coloniza o epitélio intestinal, causando lesões do tipo *attaching and efacing* (A/E). Esta lesão é iniciada pela adesão da bactéria aos enterócitos,

levando à perda das microvilosidades intestinais, que é o mecanismo central de patogenicidade da EPEC (ZHUANG et al., 2017). Essas mudanças ultraestruturais limitam a capacidade de absorção das células intestinais, levando à diarreia (BHATT et al., 2016). A EPEC é definida pela presença do gene *eae* (BERALDO et al., 2014), o qual codifica uma proteína denominada adesina intimina, que é requerida para a A/E (ROCHA et al., 2017). Atualmente, a EPEC é subdividida em EPEC típicas (tEPEC) e EPEC atípicas (aEPEC). Linhagens que possuem o plasmídeo pEAF (*adherence factor plasmid*) são chamadas de tEPEC e as que não possuem são chamadas aEPEC (BALIERE et al., 2016). O gene *bfp* contido no plasmídeo EAF codifica um fator de adesão denominado *bundle-forming pili* (BFP), sendo que o plasmídeo EAF também possui genes necessários para a expressão da adesina intimina (HU; TORRES, 2015). Este patógeno extracelular é transmitido de hospedeiro a hospedeiro via fecal-oral (BALIERE et al., 2015a), através da ingestão de alimentos, águas e superfícies contaminadas (YEN et al., 2016), sua dose infecciosa é 10^8 - 10^{10} organismos (SAXENA et al., 2015).

Todos os anos no mundo, ocorrem quase 1,7 bilhão de casos de doença diarreica (YANG et al., 2017). A EPEC é considerada um dos agentes causadores predominantes de diarreia humana (GAYTÁN et al., 2016). Provoca diarreia prolongada moderada a severa, acompanhada de febre leve e às vezes de vômito (KOTLOFF et al., 2013). Atualmente, a EPEC causa diarreia severa nos países em desenvolvimento (BEHIRY et al., 2011; HU; TORRES, 2015), como Brasil, Chile, México e Peru (OCHOA et al., 2008).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) foi descoberta inicialmente em seres humanos na década de 1950 (ISIDEAN et al., 2011). O principal mecanismo de patogenicidade da ETEC é a síntese de uma ou ambas as proteínas (enterotoxinas) denominadas toxina termo-lábil (LT) e toxina termo-estável (ST). Essas proteínas presentes na superfície das bactérias são capazes de reconhecer receptores específicos na superfície de células epiteliais ou eritrócitos, permitindo a colonização da mucosa do intestino delgado pela bactéria (ZHANG et al., 2018). Este processo pode ser mediado por um ou mais fatores de colonização (CFs), que geralmente têm estrutura fimbrial ou fibrilar e são designados por CFA (antígeno de fator de colonização), CS (antígeno de superfície), PCF (fator de colonização pontual) (MIRHOSEINI et al., 2018).

A doença causada pela ETEC é propagada por uma dose infectante de 10^6 a 10^{10} organismos (MIRHOSEINI et al., 2018). Este patotipo é a causa mais comum de diarreia na infância e do viajante nos países em desenvolvimento (SAXENA et al., 2015). Anualmente, estima-se que a ETEC causa 200 milhões de episódios de diarreia e aproximadamente 380.000

mortes (ISIDEAN et al., 2011). Aproximadamente 10 milhões de casos de diarreia do viajante foram relatados em todo o mundo anualmente (MIRHOSEINI et al., 2018).

A *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) é a cepa que causa disenteria bacilar em seres humanos, invadindo e se multiplicando dentro das células epiteliais da mucosa do cólon. Isto resulta em uma intensa resposta inflamatória caracterizada por abscessos e ulcerações que danificam a integridade do revestimento epitelial do cólon (GIBOTTI et al., 2004), causando uma infecção similar à gerada por *Shigella* sp. (RAGUPATHI et al., 2018). As proteínas envolvidas na invasão celular são codificadas no operon *Ipa* (*invasion plasmid antigens*) (*ipaA*; *ipaB*; *ipaC*; *ipaD*) localizado no plasmídeo de invasão 140-MDa (pINV) (SAXENA et al., 2015). Sua dose infecciosa é 10^6 – 10^{10} organismos (SAXENA et al., 2015). Os sintomas característicos em pessoas afetadas pela EIEC são diarreia aquosa, com sangue e dor abdominal, mas alguns casos somente apresentam diarreia.

A *E. coli* enteroagregativa (EAEC) foi identificada em 1987, por Nataro et al. (1987) que descreveram formações bacterianas únicas e de tipo tijolos empilhados, fenômeno conhecido como aderência agregativa (AA), mediado pelos genes que se encontram no plasmídeo *pAA*. O primeiro isolamento foi em culturas de tecidos e células de amostras retiradas de um caso pediátrico de diarreia aguda na América do Sul.

EAEC é um grupo de bactérias que abrange sorogrupos de *E. coli*, os quais aderem a linhagens celulares *in vitro*, tais como células HEp-2 (OCHOA et al., 2008), formando agregados bacterianos localizados na superfície celular e em regiões da lamínula livre de células (KONG et al., 2015). O desenho em forma de “pilha de tijolos” é considerado uma condição obrigatória para o padrão típico de (AA) (ANDRADE et al., 2011). Sua dose infecciosa é 10^6 – 10^{10} organismos (SAXENA et al., 2015). É reconhecida como um enteropatógeno emergente, especialmente em países em desenvolvimento (REGUA-MANGIA et al., 2009). A EAEC se adere à mucosa intestinal e a coloniza, produzindo um efeito citotóxico que causa diarreia tipo aquosa com febre e com secreção de muco (ELVIRA FARFAN-GARCIA et al., 2016). Os mecanismos de virulência das EAEC não estão completamente esclarecidos e o papel dos vários fatores descritos ainda requer investigação (ANDRADE et al., 2011). Os mecanismos patogênicos que foram descobertos são: adesão bacteriana, enterotoxinas, estimulação da inflamação da mucosa e secreção de citotoxinas, mas as infecções extraintestinais severas continuam em grande parte sendo desconhecidas (KONG et al., 2015).

As cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) produzem uma ou mais toxinas shigoides ou verotoxinas (MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006). O período de incubação é normalmente de 48 a 72 horas, mas pode também demorar de 1 a 10 dias. Os sintomas podem incluir câibras abdominais e diarreia sanguinolenta; podem ainda surgir febre e/ou vômito (GOMES et al., 2016). A maioria dos pacientes recupera-se dentro de 10 dias, mas, em alguns casos mais graves, podem evoluir para a síndrome hemolítico-urêmica (SHU), caracterizada por uma falha renal aguda, anemia hemolítica e um número baixo de plaquetas, que pode desencadear a morte (CARLSON-BANNING; SPERANDIO, 2018).

Com relação à *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), o termo toxina Shiga (Stx) foi adotado devido à similaridade da toxina gerada pelo gene *stx1* da toxina shiga (Stx) produzida por *Shigella dysenteriae* (FARFÁN-GARCÍA et al., 2016). Além de Stx1, a STEC pode possuir a toxina Stx2, bem como várias variantes Stx1 e/ou Stx2 (BAKER et al., 2016). A família deste patótipo é muito diversa e as cepas pertencem a uma ampla gama de sorotipos O:H (BENNANI et al., 2011). STEC é capaz de causar doença gastrointestinal severa (colite hemorrágica), insuficiência renal aguda e sequelas crônicas pós-infecção ou morte (FRANZ et al., 2014). Uma fonte de cepas STEC é o esgoto gerado no tratamento das águas residuais (BENNANI et al., 2011). A ocorrência da STEC tem sido reportada em vários produtos como carne, frango, pescado e porco (SANATH KUMAR et al., 2001). *Escherichia coli* O157: H7 tem sido associada a surtos pelo consumo de hambúrgueres contaminados nos Estados Unidos da América (GOURMELON et al., 2006).

O patótipo *E. coli* que adere difusamente (DAEC) está associado em alguns estudos com diarreia; porém, sua patogenia não é definida com consistência. O termo *E. coli* difusamente aderente foi inicialmente utilizado para se referir a qualquer *E. coli* que se adere às células HEp-2 e He-La que não forme microcolônias típicas de EPEC. Com a descoberta da *E. coli* enteroagregativa, autores reconhecem a DAEC como uma categoria independente, potencialmente causadora de diarreia. Como se trata de uma categoria de *E. coli* ainda não muito estudada, pouco se sabe sobre sua patogênese (MINAGAWA, 2017). Causa diarreia aguda em crianças menores de 5 anos (CLEMENTS et al., 2012).

2.8 *Escherichia coli* em moluscos bivalves

A ocorrência de patótipos de *E. coli* em mariscos foi relatada em diferentes partes do mundo: em caracóis, na Índia (SANATH KUMAR et al., 2001), em ostras (*Pinctada imbricata*) e caracóis (*Arca zebra*) na Venezuela (MARTÍNEZ; VILLALOBOS, 2005), em mexilhões

(*Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*) e berbigão (*Cerastoderma edule*) no Marrocos (BENNANI et al., 2011), amêijoas, ostras e mexilhões na França (BALIERE et al., 2015a; BALIERE et al., 2016). Gourmelon et al. (2006) sugeriram que os moluscos bivalves capturados em ambientes litorâneos podem servir como um veículo para a transmissão de *E. coli* produtora da toxina Shiga. Estes autores analisaram amostras de mexilhões (*Mytilus edulis* e *Mytilus galloprovincialis*), ostras (*Crassostrea gigas*) e berbigão (*Cerastoderma edule*) colhidas em ambientes costeiros e estuarinos, realizando o primeiro isolamento de cepas ETEC *stx1d* na França. Considerando a contaminação de moluscos bivalves no Brasil, Forcelini et al. (2009) analisaram ostras comercializadas no Mercado Municipal de Guaratuba, Paraná, entre os meses de novembro de 2005 e março de 2006 e verificaram valores máximos de *E. coli* de 11,946 NMP/g. A detecção de *E. coli* nas amostras de mexilhão (*Mytella guyanensis*) ao longo de todo o período de monitoramento (fevereiro 2008 – março 2009) no Estado do Espírito Santo teve uma média geométrica de $1,86 \times 10^4$ NMP/100g (KELLER et al., 2013). Apesar de não ser muito comum o isolamento de patotipo de *E. coli* em moluscos bivalves, temos um estudo no Brasil reportado por Ayulo et al. (1994) que avaliaram 175 amostras de peixes e filetes de peixe (*Cynoscion leiarchus*), caudas de camarão (*Peneaus paulensis*), ostras (*Brasiliensis Anomalocardia* e *Metilus edulis*) e caranguejo (*Callinectes sapidus*). De 317 estirpes de *E. coli* testadas para as toxinas ST e LT II, apenas um (isolado a partir da ostra) produziu a toxina ST e nenhum produziu a toxina LT II.

2.9 Vírus entéricos

O termo “vírus entérico” compreende todos os grupos de vírus que estão presentes no trato gastrointestinal humano e que, após transmissão por via fecal-oral, podem causar infecções ou enfermidades em indivíduos suscetíveis (DE MORAES TAVARES et al., 2005), sendo excretados em grande número nas fezes de indivíduos infectados (sintomáticos e assintomáticos), alcançando concentrações em torno de 10^5 - 10^{13} partículas virais por gramas de fezes (BOSCH et al., 2008). Os vírus entéricos são amplamente distribuídos no ambiente, incluindo alimentos e água (Figura 3) (BARCLAY et al., 2014; BIGORAJ et al., 2014).

Figura 3 - Rotas de transmissão de vírus entéricos.

Fonte: Adaptado de BARCLAY et al. (2014) Infection control for norovirus. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 20, n. 8, Agosto 2014.

Os vírus entéricos humanos de interesse da saúde pública incluem Adenovírus, Astrovírus, Enterovírus, Hepatite A, Hepatite B, Norovírus, Rotavírus e Sapovírus (D'SOUZA, 2014) e são responsáveis por diversas doenças que afetam o ser humano, tais como gastroenterites, meningites, miocardites e hepatites infecciosas (LEES, 2000). Os alimentos que podem ser contaminados por meio da água incluem moluscos bivalves, peixes, frutos e vegetais cultivados em solos irrigados com águas contaminadas pelo esgoto (FUMIAN et al., 2009).

2.9.1 Norovírus

O primeiro surto de norovírus humano (HuNoV) foi reportado em Norwalk, Ohio, EUA em 1968 (KAPIKIAN et al., 1972). Pertencem ao gênero *Norovirus*, família *Caliciviridae* (BALDRIDGE et al., 2016; KITTIGUL et al., 2016) e foram previamente chamados de *Norwalk-like virus* (DICAPRIO, ERIN et al., 2013). Também são conhecidos como *Small Round Structured Viruses* (SRSV) devido a sua morfologia (Figura 4) (WHITE et al., 2016; SHAH; HALL, 2018). Medem cerca de 27 a 35 nm de diâmetro (MORILLO; TIMENETSKY, 2011; WHITE, 2014), não possuem envoltório (GROVE et al., 2006; SUMMA et al., 2012) e até o momento não têm sido cultivados em sistemas de células animais com êxito (TURNAGE; GIBSON, 2017). O nucleocapsídeo é arredondado e exibe simetria icosaédrica (CORTES-PENFIELD et al., 2017). O genoma viral consiste em uma molécula linear de RNA fita simples de polaridade positiva de 7,5 a 7,7 kb (CASTILHO et al., 2006; ROTH; KARST, 2016).

Figura 4 - Micrografia eletrônica de transmissão de vírions de norovírus.

Fonte: WHITE et al. (2016). Infectious Diarrhea Norovirus and Clostridium difficile in Older Adults. **Clinics Geriatric Medicine.** v. 32, p. 509–522, 2016a.

A extremidade 5' do genoma apresenta a proteína VPg, que tem papel essencial na infectividade viral e na tradução inicial; na extremidade 3', após a síntese do gene ocorre a adição da cauda poli A, com função de dar estabilidade à molécula e ajudar na tradução (MORILLO; TIMENETSKY, 2011). As três fases de leitura abertas (ORFs – *open reading frames*) codificam os genes estruturais e não estruturais, como pode ser observado na Figura 5 (KARST et al., 2014; BOZKURT et al., 2015).

A ORF1 codifica uma poliproteína não estrutural que é clivada pela protease viral 3C em sete proteínas (NS1 a NS7), incluindo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Assim, a extremidade 5' do genoma codifica um precursor de proteínas, envolvidas na transcrição e replicação viral (KARST et al., 2014). A ORF2 codifica a proteína estrutural principal do capsídeo (VP1) com papel importante na replicação do vírus (KAUFMAN et al., 2014). A terceira ORF considera a região mais variável do genoma, codifica a proteína básica (VP2) de 23 KDa e que interage como o RNA genômico quando ocorre a formação do vírion (DICAPRIO et al., 2013).

Figura 5 - Representação do genoma do norovírus.

Fonte: Adaptado de KARST et al. (2014). Advances in Norovirus Biology. **Cell Host & Microbe.** v. 15, June 11, 2014.

Eles são geneticamente classificados em sete genogrupos (GI-GVII) (DA SILVA POLÓ et al., 2016; OUÉDRAOGO et al., 2016), dos quais GI e GII são responsáveis pela maioria de doenças em seres humanos, enquanto que o genogrupo GIV é raramente detectado como causa de doenças epidêmicas ou esporádicas (VINJÉ, 2015). Os NoV são a causa mais comum de surtos de gastroenterites não bacterianas em humanos (KOO et al., 2010; DA SILVA POLÓ et al., 2016). Anualmente, cerca de 212.000 pessoas morrem devido à infecção por NoVs, por isso esse agente continua sendo um grande problema de saúde pública em todo o mundo e os custos das infecções por NoVs foram recentemente estimados em US\$ 60 bilhões/ano (ROCHA-PEREIRA et al., 2016).

O modo de transmissão mais importante e mais comum deste vírus é rota fecal-oral (SHAH; HALL, 2018). A transmissão infecciosa através de vômitos ou fezes por contaminação direta (por contato manual e/ou boca) ou indiretamente (por aerossolização) também pode explicar a transmissão rápida do vírus em locais fechados (MARKS et al., 2003). No entanto, numerosos exemplos ilustram que são eficientemente transmitidos por alimentos, água ou superfícies contaminadas (BARCLAY et al., 2014; LOUTREUL et al., 2014; PARK et al., 2015). Alguns alimentos implicados nos surtos incluem alimentos prontos para consumo (STALS et al., 2011a), saladas (GALLIMORE, et al., 2005; MAKARY et al., 2009), framboesas congeladas (LE GUYADER et al., 2004; SARVIKIVI et al., 2012), alface (ETHELBERG et al., 2010), morangos congelados (BERNARD et al., 2014) e moluscos bivalves (NG et al., 2005; LE GUYADER et al., 2006; IRITANI et al., 2014). Também pode ser encontrado em água como potável (HARAMOTO et al., 2018), residual (KATAYAMA et al., 2008) e de esgoto (CAMPOS et al., 2016).

Estes vírus são ambientalmente estáveis, podendo sobreviver no meio ambiente por semanas ou meses (KELLER et al., 2013) e possuem uma resistência viral a desinfetantes (BALDRIDGE et al., 2016). Estima-se que as fezes de um indivíduo com uma infecção ativa de NoV possam espalhar até 100 bilhões de partículas de vírus por grama de fezes (CDC, 2011). São extremamente infecciosos e requer-se um pequeno inóculo para provocar a doença (10 a 100 partículas virais) (BAERT et al., 2007; DE MENEZES et al., 2010).

Os sintomas mais comuns da infecção podem incluir diarreia, vômitos, (BERNARD et al., 2014; WANG; DENG, 2016), náuseas, calafrios, dor abdominal, dor muscular, desidratação, dor de cabeça e febre (BOZKURT et al., 2015). O vírus tem um período de incubação de 1 a 3 dias, mas os sintomas podem se desenvolver rapidamente de 12 a 24 h (PREDMORE et al.,

2015). Os NoVs causam infecção ao longo do ano, embora haja um pico de incidência durante os meses de clima frio (ATMAR; ESTES, 2006; SUFFREDINI et al., 2012).

Surtos normalmente ocorrem em qualquer área em que um grande número de pessoas estejam em contato próximo entre si, como: restaurantes (HARRIS et al., 2017), piscinas (PODEWILS et al., 2007), cruzeiros (ROCHA-PEREIRA et al., 2016), hospitais (HARRIS et al., 2010), lares de idosos (PETRIGNANI et al., 2015), escolas (LUCERO; VIDAL, 2017), creches (LOPMAN et al., 2012), hotéis (DESSELBERGER, 2017) e prisões (CARDEMIL et al., 2017). Nos EUA, mais de 60% de todos os surtos de NoV ocorrem em instalações de cuidados prolongados; resultados semelhantes foram relatados na Europa e Japão (BARCLAY et al., 2014).

2.9.2 Astrovírus

O Astrovírus (AstV) foi identificado pela primeira vez em 1975 por microscopia eletrônica em fezes de bebês com diarreia numa unidade de maternidade no Reino Unido (APPLETON; HIGGINS, 1975). São a terceira causa mais comum de gastroenterites em humanos (PANKOVICS et al., 2015). Estes vírus são pequenos, não envelopados (LIAO et al., 2015), o nucleocapsídeo é arredondado e exibe simetria icosaédrica de aproximadamente 28 nm de diâmetro (CARTER, 2005; LIZASOAIN et al., 2015), com bordas bem definidas, apresentando, caracteristicamente, uma configuração de estrela de cinco ou seis pontas (Figura 6) (OLUWAYELU et al., 2012; PERCIVAL, 2013; KRISHNAN, 2014).

Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão de astrovírus.

Fonte: Adaptado de PERCIVAL (2013). **Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks**. Academic Press; 1 edition (July 21) 2004.

Esta estrutura é claramente diferente dos outros vírus e serve como um recurso de diagnóstico (SEYMOUR; APPLETON, 2001; PERCIVAL, 2013; KRISHNAN, 2014). O genoma do AstV é composto por uma fita de RNA, de polaridade positiva (Figura 7) (DE MORAES TAVARES et al., 2005; YOKOYAMA et al., 2012; BOSCH et al., 2014), contendo uma cauda poliadenilada na extremidade 3' (cauda Poli A) da fita, segmentos não codificantes (UTR) nas porções 3' e 5' contém três fases de leitura aberta (ORF1a, ORF1b e ORF2) (GUIX et al., 2002).

Figura 7 - Representação do genoma de astrovírus.

Fonte: Adaptado de YOKOYAMA et al. (2012). Adaptive Immunity Restricts Replication of Novel Murine Astroviruses. **Journal of Virology**. v. 86, n. 22, p. 12262–12270, 2010.

O comprimento do genoma pode variar de 6.8 – 7.9 Kb, sem contar a cauda poliadenilada (DE BENEDICTIS et al., 2011). As ORF1a e ORF1b, localizadas no extremo 5' do genoma, codificam as proteínas virais não estruturais que parecem estar envolvidas na replicação e transcrição do RNA (VU et al., 2017), enquanto a ORF2, localizada no extremo 3', codifica as proteínas do capsídeo (MARTELLA et al., 2012).

A família *Astroviridae* está dividida em dois gêneros *Mamastrovirus* e *Avastrovirus*. *Mamastrovirus* incluem astrovírus isolados de humanos, porcos, gatos, cachorros e gado (KRISHNAN, 2014; CADDY; GOODFELLOW, 2015). *Avastrovirus* incluem os vírus que infectam aves, particularmente patos, perus e galinhas (JEONG et al., 2012). Estão distribuídos pelo mundo todo e são considerados como um dos principais agentes virais de gastroenterite aguda, especialmente em crianças de 2 anos de idade (FUENTES et al., 2012; ZHOU et al., 2014). Em adultos, os AstV afetam principalmente pacientes imunocomprometidos e idosos. No primeiro grupo, os AstV podem causar sintomas digestivos mais severos e de maior duração, bem como infecções disseminadas (WUNDERLI et al., 2011).

A infecção por AstV em humanos é caracterizada por uma gastroenterite aguda com dois a três dias de duração (SIQUEIRA et al., 2017), com sintomas típicos, por exemplo diarreia aquosa, dor de cabeça, febre, dor abdominal e menos comumente vômitos (JACOBSEN et al.,

2018). O pico da infecção é observado nos meses de inverno, em regiões de clima temperado (WHITE et al., 2016), e na estação de chuvas em regiões de clima tropical (KRISHNAN, 2014). A sazonalidade das infecções por AstV é controversa e parece variar por região geográfica (KRISHNAN, 2014). Estudos demonstraram que 34 de 60% dos casos de diarreia entre crianças nos Estados Unidos, França e Finlândia têm um agente causador viral que aparece no final das estações do inverno e na primavera (JEONG et al., 2012). Diversos estudos sugeriram que a taxa máxima de detecção de AstV foi em crianças de 2 a 4 anos de idade, com as maiores taxas de infecção nos meses de inverno em climas temperados (DE BENEDICTIS et al., 2011).

São transmitidos pela via fecal-oral, principalmente por contato pessoa a pessoa, mas também podem ocorrer pela transmissão alimentar ou pela água (MENDENHALL et al., 2017). O AstV pode ser eliminado em números muito elevados, atingindo até 10^{13} partículas virais por grama nas fezes de indivíduos infectados. Uma vez que as práticas de tratamento de águas residuais não garantem a remoção completa de agentes patogênicos virais, o AstV presente nas águas residuais tratadas e não tratadas é descarregado no ambiente e pode se tornar um contaminante das águas marinhas, águas doces e águas subterrâneas (BOSCH et al., 2014). Embora os AstVs estejam tipicamente envolvidos em casos esporádicos de gastroenterite e embora a maioria dos surtos de gastroenterite viral em todo o mundo sejam causados por NoV, surtos por AstV também foram descritos em vários países. No entanto, AstV foi implicado em 0,5% de todos os surtos agudos de gastroenterite relatados de 1994 a 2005, na Holanda (VU et al., 2017).

AstVs têm demonstrado ser suficientemente estáveis no ambiente para serem encontrados em água para consumo humano (ABAD et al., 1997), água doce (MIAGOSTOVICH et al., 2008) ou marinha (AW; GIN, 2011). Eles podem ser encontrados em águas residuais (PINTO et al., 2001; AW; GIN, 2010; HELLMER et al., 2014), lodo (CHAPRON et al., 2000) e, como outros vírus, não são completamente eliminados das águas residuais após o tratamento (EL-SENOUSY et al., 2007; PREVOST et al., 2015). Os AsVts também têm sido isolados de moluscos bivalves (LE GUYADER et al., 2000; MING et al., 2013; IRITANI et al., 2014).

2.9.3 Pesquisas realizadas para verificar a contaminação viral em moluscos bivalves

Diversos trabalhos têm sido realizados em todo o mundo ao longo dos anos a fim de verificar a contaminação viral em moluscos bivalves, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos de pesquisas de contaminação envolvendo moluscos bivalves.

Referência e local	Resultados obtidos
Bosch et al. (1994) Espanha	Detecção de Virus da Hepatis A e rotavírus em 56% e 40%, respectivamente, das amostras de moluscos analisadas.
Green e Lewis, (1999) Nova Zelândia	Identificação de Virus da Hepatis A, Enterovírus e rotavírus em ostras, águas residuais e sedimento.
Boxman et al. (2006) Holanda	Determinação de norovírus em 21 amostras de ostras provenientes de fazendas holandesas e em 6 amostras de moluscos bivalves importados para a Holanda, sendo 1 amostra de ostra e 5 amostras de mexilhões. Das 10 sequências detectadas nas amostras positivas, 7 pertenciam ao GI e 3 pertenciam ao GII.
Terio et al. (2010) Itália	Investigação da presença de norovírus em mexilhões (95), amêijoas (11) e ostras de varejo (10). Foi detectado norovírus em 12,1% das amostras, com menor frequência observada em amostras obtidas a partir de hipermercados (8,1%) do que nas amostras de mercados ao ar livre (17,6%) e peixarias (16,2%).
Diego et al. (2013) Brasil	Avaliação de protozoários, vírus e bactérias em ostras (<i>Crassostrea brasiliensis</i>), antes e após o tratamento de depuração UV. Norovírus GI e GII foram detectados em dois lotes de ostras antes do tratamento e em onze lotes depois da depuração.
Polo et al. (2015) Espanha	Estudaram a presença do Virus da Hepatitis A e norovírus em 168 amostras de mexilhões, moluscos e amêijoas. Norovírus GI foi o genogrupo mais prevalente (32,1%), seguido por norovírus GII (25,6%) e Virus da Hepatitis A (10,1%).

Fonte: Própria autoria.

2.10 Métodos de prevenção de vírus entéricos

A prevenção baseia-se em evitar a contaminação de alimentos e água, desinfecção de áreas contaminadas por vírus e lavagem das mãos por prestadores de serviços da saúde e pacientes afetados (ATMAR; ESTES, 2006). Os pacientes suspeitos ou confirmados de infecção com vírus entéricos devem ser isolados. Os visitantes devem ser reduzidos ao mínimo e a pessoa infectada não deve voltar ao trabalho até pelo menos 48 a 72 horas após ao desaparecimento completo dos sintomas (WHITE et al., 2016).

Durante os surtos, as mãos devem ser lavadas com sabão e água corrente por mínimo 20 s após fornecer cuidados aos pacientes com infecção suspeita ou confirmada (BARCLAY et al., 2014). Os desinfetantes de mão à base de álcool 70%, podem ser utilizados quando o sabão e a água não estiverem disponíveis, mas não devem ser substituídos pela lavagem adequada devido a evidências conflitantes (SHAH; HALL, 2018). Equipamentos de proteção pessoal (jaleco e luvas) são recomendados para pessoas que entram na área de atendimento ao paciente. Se houver riscos antecipados de salpicos na rostro, como com os pacientes que estão vomitando,

o uso de uma máscara cirúrgica ou um escudo facial completo pode ser considerado (CARDEMIL et al., 2017).

2.11 Métodos de detecção de vírus entéricos em moluscos bivalves

A detecção de partículas virais em amostras ambientais de água requer técnicas sensíveis, devido ao baixo número de partículas virais em grandes volumes de água (RUTJES et al., 2005). Em amostras alimentares também é difícil quantificar, devido às baixas densidades do vírus no alimento, à impossibilidade de cultivo celular (GENTRY-SHIELDS; JAYKUS, 2015) e à presença de substâncias que inibem a detecção e quantificação do material genômico (STALS et al., 2011b).

No entanto, para resolver este problema, métodos de concentração – eluição para a extração de agentes patogênicos virais de produtos alimentícios já foram descritos e avaliados por Love et al. (2008) e Stals et al. (2011a). Essas metodologias desenvolvidas baseiam-se em algumas características observadas em partículas virais tais como sua polaridade, que possibilita sua adsorção em uma variedade de matrizes, e seu peso molecular, que permite a concentração por técnicas de ultrafiltração ou ultracentrifugação (WYN-JONES; SELLWOOD, 2001). Estes métodos de concentração - eluição envolvem duas etapas principais: a adsorção em um substrato e sua eluição por uma solução. Procedimentos como eluição por adsorção de ácido (JAYKUS et al., 1996; BAERT et al., 2007) ou eluição com tampão de glicina (GENTRY, VINJE, et al., 2009), Cat-Floc (RICHARDS et al., 1982; HUSMAN et al., 2007), Pro-Cipitate (CHUNG et al., 1996), membranas carregadas eletricamente (KANG; CANNON, 2015) ou polietilenoglicol (LOWTHER et al., 2017) são utilizados para a precipitação do vírus em moluscos bivalves.

Após a etapa de concentração - eluição, métodos sensíveis de detecção viral devem ser utilizados. Existe uma grande variedade de técnicas como a PCR, RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa) (DUNBAR et al., 2014), ensaios quantitativos RT-qPCR em tempo real (BRUGGINK et al., 2013), imunoenaios enzimáticos (DUNBAR et al., 2014) e ensaios imunocromatográficos (HYUN et al., 2014), que podem ser empregados para a detecção ou quantificação dos vírus. Entre estes testes, a RT-PCR e RT-PCR em tempo real são atualmente considerados os métodos padrões de detecção e quantificação dos vírus em hospitais, alimentos e amostras ambientais (BUTOT et al., 2010; HYUN et al., 2014). Um resumo dos métodos de detecção é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Métodos de detecção de vírus entéricos.

Métodos de detecção	Comentários	Referência
RT-PCR	Padrão ouro para detecção de vírus entéricos.	Pang e Lee (2015)
RT-qPCR	Detecção mais rápida que RT-PCR; menor chance de contaminação; geralmente mais sensível; ensaio quantitativo; equipamentos e reagentes mais caros.	Shah e Hall (2018)
RT multiplex PCR	Temperaturas de reconhecimento semelhantes sugeridas para os primeiros conjuntos; resultados potencialmente falsos para alvos com um número inicial de cópias baixo.	Morillo e Timenetsky (2011)
RT-nested PCR	Risco de contaminação por transição; sensibilidade aumentada (em comparação com RT-PCR), aumento de 10.000 vezes em sensibilidade.	DiCaprio et al. (2013)
RT-nested, real-time PCR	Risco de contaminação por transição.	Banyai et al. (2018)
Imunoensaio enzimático	Baixa sensibilidade, alta especificidade.	Felice et al. (2016)
Microscopia eletrônica	Detecção multiplex de patógenos virais, baixa sensibilidade.	Felice et al. (2016)

Fonte: Própria autoria.

Outros métodos tradicionais para a detecção e quantificação dos vírus entéricos, como o cultivo celular, são reconhecidos como uma técnica padrão-ouro (HARAMOTO et al., 2018). No entanto, o cultivo celular é uma técnica laboriosa, muito intensiva em mão de obra, e não possui a capacidade de diferenciar tipos específicos de vírus entéricos em amostras ambientais (WONG et al., 2012).

Na Europa, um grupo de trabalho CEN/TC275/WG6/TAG4 desenvolveu um padrão para detecção de NoV e VHA em alimentos, incluindo moluscos bivalves, frutas, vegetais e água engarrafada (ISO TS/15216). Adicionalmente, no Canadá, métodos padronizados já estão publicados *on-line* no compêndio de métodos analíticos de saúde do Canadá (BAERT et al., 2011).

Estes procedimentos permitem disponibilizar dados sobre a prevalência de produtos contaminados no mercado de diferentes países, visto que ainda não foi criado nenhum regulamento em relação à contaminação viral de alimentos (SCHAEFFER et al., 2013).

2.12 Métodos de descontaminação dos moluscos bivalves

Os regulamentos sanitários dependem de indicadores bacterianos de contaminação por esgoto para classificar as águas de coleta de moluscos bivalves e estimar a eficiência dos métodos de purificação (OLIVEIRA et al., 2011). Esses procedimentos de purificação, utilizados para reduzir a produção antropogênica ou contaminação microbiana natural de moluscos bivalves, foram usados desde a década de 1920 e agora são amplamente utilizados em todo o mundo (LEES, 2000). Moluscos bivalves contaminados podem ser descontaminados quando transferidos para leitos de mariscos naturais limpos *relaying* (depuração natural) ou para tanques de depuração (LE GUYADER et al., 2012). A depuração natural consiste em transferir moluscos bivalves colhidos em áreas contaminadas para áreas mais limpas, permitindo autopurificação no ambiente natural por períodos mais longos (CIULLI et al., 2017), pelo menos dois meses para moluscos bivalves com valores maiores a 46×10^3 NMP/100 g de *E. coli*. A depuração artificial consiste num sistema de fluxo ou recirculação, realizada em tanques com água purificada quimicamente (cloro, ozônio, iodóforos e oxigênio ativado) ou fisicamente (irradiação UV); então, a água desinfetada permite a purificação sob condições controladas (RICHARDS et al., 2010). Este processo geralmente ocorre durante 24 a 48 horas (DORE et al., 2010).

Os processos de purificação baseiam-se no pressuposto de que, se pela filtração de água poluída o molusco bivalve pode se tornar contaminado, eles também podem eliminar os contaminantes através da filtração de água limpa. Portanto, a depuração microbiana diminui o risco de infecções potenciais devido ao consumo de moluscos bivalves (POLO et al., 2014b).

As duas técnicas, depuração natural e artificial, apresentam bons resultados para a contaminação bacteriana (LOVE et al., 2010), mas em geral insuficientes para a eliminação dos vírus entéricos (RICHARDS et al., 2010). É sabido que os NoVs, VHA e adenovírus humanos (HAdV) persistem nos tecidos dos moluscos bivalves em condições de depuração (POLO et al., 2014b; POLO, ALVAREZ, VILARINO, et al., 2014). Diego et al. (2013) sugerem que o cenário ideal para minimizar os riscos de saúde associados com o consumo de moluscos bivalves deve ser a utilização de sistemas de depuração, combinados com uma tecnologia de desinfecção disponível, visto que nenhum processo garante a eliminação de 100% de bactérias

e vírus. É importante conhecer a carga de contaminação inicial, porque disso vai depender a eficiência da depuração em moluscos bivalves, sendo que os mais contaminados exigem mais tempo de depuração (OLIVEIRA et al., 2011). Em alguns casos, moluscos bivalves depurados têm sido associados a surtos ocasionados por vírus entéricos (LE GUYADER et al., 2003; LE GUYADER et al., 2006; LE GUYADER et al., 2008).

2.13 Legislação referente à qualidade de moluscos bivalves

A qualidade microbiológica dos moluscos bivalves é abordada em diferentes legislações de acordo com o país ou região na qual são cultivados, mas no geral avalia-se a água de cultivo/extração ou a carne (Tabela 4). Na Europa, todos os países seguem os padrões recomendados pela EU SQAP (*The European Union Shellfish Quality Assurance Programme*) (LODDER-VERSCHOOR et al., 2005; DABROWSKI et al., 2014), que classifica as águas de cultivo dos moluscos bivalves em três classes: A, B e C, de acordo com o NMP de *E. coli* em 100 g de carne de moluscos bivalves e de líquido intravalvar (DORE et al., 2010). Classe A pode ir para o consumo humano direto (<230 NMP/100g), as da classe B devem ser tratadas termicamente ou depuradas para atender aos requisitos da classe A (<4.600 NMP/100g) e na classe C (<46.000 NMP/100g) devem ser depuradas por 2 meses para atender aos requisitos da classe A ou classe B, e também podem ser tratadas termicamente. Apesar destas medidas de controle, os surtos de doenças entéricas associadas com o consumo de molusco bivalves continuam ocorrendo (LODDER-VERSCHOOR et al., 2005). Esta legislação demonstrou preocupação com a presença de vírus entéricos, estabelecendo que na falta de técnicas de rotina para a pesquisa de vírus e de fixação de normas virológicas, o controle baseia-se na contagem de bactérias de origem fecal. Estes níveis são estabelecidos nos Regulamentos (CE) n.º 853/2004 e 854/2004 (anexo III, seção VII) do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004.

Nos Estados Unidos da América, em 2007, foi elaborado um guia, o *National Shellfish Sanitation Program*, pela FDA (*Food and Drug Administration*), para o controle do crescimento, processamento e transporte de moluscos bivalves. Neste guia, os critérios utilizados para o controle de áreas de extração/cultivo/depuração de moluscos bivalves, estão baseados na densidade bacteriológica de coliformes totais e termotolerantes em 100 mL da água do cultivo e está dividido em três áreas: área A, define as áreas de cultivo mais limpas a partir das quais os moluscos podem ser colhidos e essas áreas são classificadas como “autorizadas”. Áreas de cultivos de moluscos bivalves que não cumprem critérios satisfatórios, ou sem

classificação devido à falta de pesquisas sanitárias, não podem ser colhidas para consumo humano e são definidas como “restritas”. A restrição de coleta também pode ser empregada por curtos períodos de tempo como resultado de poluição previsível ou esporádica. Tais áreas são classificadas como “condicionalmente aprovadas” ou “condicionalmente restritas”. Estas áreas necessitam de um plano de manejo para se adequarem às normas exigidas para a produção de moluscos. A produção de moluscos provenientes de áreas classificadas como restritas deve, obrigatoriamente, passar por um sistema de purificação ou ser transportada para áreas de qualidade microbiológica superior, previamente a sua introdução no mercado, e por último a área proibida, onde a retirada é proibida (FDA, 2013).

Tabela 4 - Normas relativas aos limites microbiológicos para avaliação da qualidade microbiológica de moluscos bivalves.

Norma	Categoria	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes	<i>E. coli</i> (NMP/100 g)
Legislações baseadas na água de cultivo (100 mL)				
CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005)	Classe 1	NA	<43 ou <88 (p90)	NA
NSSP/FDA (FDA, 2007)	Aprovada	<70	<14	NA
	Restrita	<700	<88	
	Proibida	>700	<88	
Legislações baseadas na carne do molusco bivalve (100 g)				
RDC 12/2001* (BRASIL, 2001)	NA	NA	5000	NA
PNCMB, 2013	Classe A	NA	NA	<230
	Classe B			≥230 a ≤46.000
	Classe C			>46.000
Diretiva 853-854/2004 (CEE, 2004)	Classe A	NA	NA	<230
	Classe B	NA	NA	<4.600
	Classe C	NA	NA	< 46.000

NA: Não Aplicável

p - percentil

*Esta resolução apresenta o valor para 1g de carne cozida (50 Ct/g), que foi alterado para 100g para comparação com a legislação europeia.

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente, NSSP/FDA: *National Shellfish Sanitation Program/Food Drug Administration*, PNCMB: Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves.

Fonte: Própria autoria.

No Brasil, a legislação referente ao controle de contaminação microbiológica em moluscos bivalves possui ramos em diferentes órgãos. No RIISPOA (Regulamento da Inspeção

Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal) que institui as normas que regulam, em todo o território nacional, a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, os critérios para avaliar a contaminação dos moluscos bivalves são pouco citados.

A resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) n°. 357 de 2005, versa sobre a classificação e qualidade de água, fixando águas salinas e águas salobras destinadas à aquicultura e à atividade de pesca na Classe 1. Nesta classe, para o cultivo de moluscos bivalves destinados à alimentação humana, a média geométrica de coliformes termotolerantes, de um mínimo de 15 amostras coletadas no mesmo local, não deverá exceder 43 por 100 mL, e o percentual de 90% não deverá ultrapassar 88 coliformes termotolerantes por 100 mL e esses índices deverão ser mantidos em monitoramento anual com um mínimo de 5 amostras (BRASIL, 2005).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, que versa sobre padrões microbiológicos de alimentos no mercado, os moluscos bivalves *in natura*, resfriados ou congelados, não consumidos crus devem ser negativos para *Salmonella* spp. em 25 g e apresentar limites máximos permitidos de estafilococos coagulase positivo de até 10^3 UFC/g. Contudo, não é estabelecido limite para coliformes termotolerantes, que são limitados somente para os moluscos bivalves cozidos, temperados e não industrializados, resfriados ou congelados, em 50 coliformes por grama (BRASIL, 2001).

De acordo com Barreto et al. (2008), a Portaria n°451 de 1997, que foi revogada e substituída pela resolução supracitada, especificava limites de NMP para coliformes de 10^2 por grama para pescados consumidos crus. Os moluscos bivalves se enquadrariam porque geralmente são consumidos sem nenhum tipo de tratamento. Por este fato, a resolução RDC n°12 da ANVISA possui caráter limitado e dificulta a avaliação da qualidade microbiológica do alimento em questão.

No entanto, no ano de 2012, foi publicada a Instrução Normativa Interministerial n°. 7 de 2012, que envolve a atuação do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que estabelece o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). O documento é dividido em dois anexos: o Anexo I estabelece as diretrizes para o monitoramento e controle de microrganismos contaminantes e biotoxinas marinhas em moluscos bivalves; e o Anexo II estabelece os

requisitos dos estabelecimentos de processamento de moluscos bivalves (requisitos de instalação, áreas de manipulação, equipamentos e utensílios, higiene dos estabelecimentos e controle da qualidade) (SOUZA et al., 2014).

De acordo com o estabelecido na legislação, o monitoramento de microrganismos contaminantes em bivalves deve ser realizado pela estimativa da densidade média de *E. coli* em 100 g da parte comestível dos molusco bivalves (NMP/100g). Os resultados desse monitoramento devem orientar a retirada dos bivalves, que passaram a ser definidos como liberados para o consumo (NMP de *E. coli* em <230 NMP/100g); liberados sob condição (NMP de *E. coli* em ≥ 230 e ≤ 46.000 NMP/100g) e suspensos quando verificado (NMP de *E. coli* em >46.000) (PNCMB, 2013). Até a presente data, os vírus não estão enquadrados em quaisquer destas legislações aplicáveis a moluscos bivalves ou águas para cultivo de moluscos. Assim, o monitoramento adequado da presença de patógenos pode melhorar a qualidade das decisões a serem tomadas no âmbito de saúde pública, ambiental e de segurança de alimentos. Além disso, há poucos estudos sobre a contaminação viral em ecossistemas costeiros e moluscos bivalves no Brasil, especialmente no que se refere à ocorrência de AstV.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a contaminação de moluscos bivalves provenientes do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia no sul do Estado de São Paulo por bactérias e vírus entéricos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar, por meio de bioindicadores de poluição fecal: coliformes totais e coliformes termotolerantes mexilhões (*Mytella falcata*) e ostras (*Crassostrea brasiliana*) de bancos naturais do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia no sul do Estado de São Paulo;
- Identificar e caracterizar os patótipos de *Escherichia coli*;
- Detectar e caracterizar astrovírus e norovírus;
- Caracterizar os fragmentos genômicos obtidos através de sequenciamento nucleotídico e análise filogenética, incluindo sequências homólogas de outras variantes de astrovírus e norovírus depositadas em banco de dados pertinente e/ou descritas na literatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo experimental

A coleta das amostras do presente estudo foi iniciada em junho de 2016 e concluída em fevereiro de 2017 e compreendeu a coleta das amostras, as análises microbiológicas, isolamento de *E. coli*, identificação molecular de patótipos de *E. coli* e análises virais (astrovírus e norovírus), seguindo o fluxograma apresentado na Figura 7.

Figura 8 - Fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas na presente pesquisa.

Fonte: Própria autoria.

4.2 Metodologia

4.2.1 Descrição da área de estudo

Este estudo foi realizado em bancos naturais do Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia, localizado no município de Cananéia, ao sul do Estado de São Paulo, sudeste do Brasil, entre as latitudes 24° 40'S e 25° 05'S e longitudes 47° 25'W e 48° 00'W (TRAMONTE et al., 2018). O clima é caracterizado como super-úmido sem estação seca e excessiva chuva no verão (DE OLIVEIRA; HANAZAKI, 2011). A temperatura média anual é cerca de 23,8 °C (MIYASHITA; CALLIARI, 2014) e a precipitação anual média é cerca de 2.300 mm (FAVERO; DIAS, 2015). A coleta das amostras no Estuário de Cananéia (Figura 9) (OSHIMA e SANTOS et al., 2016). foi realizada em dois locais: local 1, Itapanhoapina, amostragem 1 em junho de 2016 e amostragem 2 em agosto de 2016; local 2, Resex do Mandira (Reserva Extrativista do Mandira) amostragem 3 em outubro de 2016 e amostragem 4 em dezembro de 2016 e amostragem 5 em fevereiro de 2017, somando (cinco amostragens) ao final do experimento. A área da Resex do Mandira é o local onde se concentra a maior parte da produção do município, enquanto Itapanhoapina é o ponto de coleta que possui exploração comercial.

Figura 9 - Mapa mostrando os dois locais de amostragem dos moluscos bivalves no Município de Cananéia.

Fonte: Adaptado de OSHIMA e SANTOS et al. (2016). Guiana dolphin home range analysis based on 11 years of photo-identification research in a tropical estuary. *Journal of Mammalogy*, 97 v. 2, p 599–610, 2016.

Fonte: Própria autoria.

4.2.2 Amostragem e preparação

O pessoal do Instituto de Pesca de Cananéia tiraram para cada amostragem foram pelos menos 375 unidades de mexilhões (*Mytella falcata*) e 150 unidades de ostras (*Crassostrea brasiliana*) de bancos naturais. Cada amostragem foi composta por 15 *pools* de amostras de mexilhões e 15 *pools* de amostras de ostras, resultando em 30 amostras por amostragem. O *pool* de amostras foi composto por aproximadamente 25 unidades de mexilhões e 10 unidades de ostras. No final do experimento, o número de moluscos bivalves analisados foi de 150 amostras ($n=150$), constituídas por 75 amostras de mexilhões e 75 amostras de ostras. Sendo assim, no total, foram analisados 1.875 unidades de mexilhões e 750 unidades de ostras. Cada amostra foi identificada com o tipo de amostra mexilhões (MS) ou ostras (OS), seguido do número da amostragem (1) e, finalmente, o número da amostra, dentro dessa amostragem (1-15), como por exemplo: MS-1-2, que corresponderia à amostra de mexilhão da amostragem 1 e número da amostra, neste caso 2. Os moluscos bivalves foram acondicionados em sacos de malha plástica vazada e em caixa isotérmica de isopor, contendo gelo de água potável, e imediatamente transportados para o Laboratório do Instituto de Pesca-Cananéia, onde foi realizado o processamento inicial das amostras. O processamento inicial das amostras ocorreu sempre em um período não superior a 24 horas contados do momento da coleta.

Assim, as ostras e os mexilhões vivos e com as valvas firmemente fechadas foram submetidos à lavagem externa com água corrente e limpos para a remoção de organismos incrustantes e sedimentos aderidos na parte externa. A abertura foi realizada com auxílio de uma faca higienizada com álcool 70% entre as amostragens; com remoção de suas conchas e deposição em placa de Petri. Foram então dissecados com auxílio de um bisturi e uma pinça para remoção de todos os tecidos e a obtenção da porção gastrointestinal (estômago e divertículos digestivos) dos animais. Para as análises bacteriológicas, foi reunido um *pool* de 25 g de tecido, que foi refrigerado até seu processamento, e 2 g de *pool* do hepatopâncreas, para análises virais, que foi congelado até seu processamento.

4.2.3 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microbiologia e no Laboratório de Higiene Zootécnica, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA-USP.

A contagem de coliformes totais e termotolerantes foi determinada como descrito no capítulo 8 da quarta edição do *Compendium of Methods for Microbiological Examination of*

Foods, seguindo as orientações e recomendações da American Public Health Association (APHA, 2001). As amostras foram analisadas pelo método do Número Mais Provável (NMP), descrito. Uma alíquota de 25 gramas do tecido foi diluída em 225 mL de Água peptonada a 0,1% (H₂O_p) (Merck®, Alemanha) e homogeneizados manualmente durante aproximadamente 2 min. Depois, foram realizadas diluições seriadas até 10⁻³ em 9 mL de Água peptonada a 0,1%. Em seguida, foi realizado o teste presuntivo no qual 1 mL das diluições em série em Água peptonada foi inoculada em nove tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) (Merck®, Alemanha) (três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose da diluição 10⁻¹, três tubos da diluição 10⁻² e três tubos da diluição 10⁻³) com tubos de Durham. Este caldo contém um sal que é um agente surfactante aniônico, conferindo seletividade ao meio, uma vez que inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos e, assim, a presença de coliformes (Gram negativos) é evidenciada. Após incubação a 35°C durante 24 horas, os tubos que apresentaram crescimento e produção de gás foram considerados presumidamente positivos para coliformes. Em seguida, foi realizado o teste confirmativo para coliformes totais. Para isso foi transferida uma alçada dos tubos com crescimento e produção de gás no caldo LST para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile a 2% (VB) (Merck®, Alemanha). Após a incubação a 35°C durante 24 horas, os tubos com crescimento bacteriano e produção de gás foram confirmados e realizada a contagem de coliformes totais (NMP/g). Para a realização do teste confirmativo para coliforme termotolerantes, foi transferida uma alçada dos tubos com crescimento e produção de gás em VB para o Caldo *Escherichia coli* (EC) (Merck®, Alemanha) e incubados durante 24 horas a 44,5°C. Os tubos que apresentaram crescimento e produção de gás foram considerados positivos e realizada a contagem de coliformes termotolerantes (NMP/g). Os níveis de coliformes totais e termotolerantes foram calculados utilizando as tabelas de NMP descritas no Manual Bacteriológico Analítico (APHA, 2001).

Todos os tubos positivos para turbidez e produção de gás em Caldo EC foram semeados por esgotamento em Ágar Levine Eosin Methylene Blue (L-EMB) (Oxoid, Reino Unido) e incubados durante 24 h a 35°C. Foram escolhidas cinco colônias típicas de *E. coli* e transferidas para tubos com Caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Merck®, Alemanha) e incubados durante 24 horas a 35°C. Logo, foi realizada uma série bioquímica, composta pelas seguintes análises:

Teste do citrato: com uma alça estéril, foi inoculada cada uma das colônias típicas de *E. coli* em tubos de Caldo Citrato de Koser e incubadas a 35°C, durante 96 h. O resultado foi interpretado assim conforme a seguir indicado:

- Resultado positivo: meio de cultura apresenta cor azul.
- Resultado negativo: meio de cultura apresenta cor verde (cor inicial).

Teste Voges-Proskauer: com uma alça estéril, foi inoculada cada uma das colônias típicas de *E. coli* em Caldo VM-VP e incubadas a 35°C, durante 48 h. Foram adicionadas a cada um dos tubos, gotas de alfa naftol a 5% em etanol absoluto e agitadas cuidadosamente. Posteriormente, adicionadas gotas de uma solução aquosa de Hidróxido de potássio (KOH) a 40% e agitados cuidadosamente de forma a arejar a cultura. Finalmente, foram incubados por um período de 15 a 60 min.

- Resultado positivo: o resultado é positivo se for detectada a presença de acetoína no meio. Neste caso, desenvolve-se uma cor vermelha na superfície da cultura.
- Resultado negativo: a cultura mantém uma cor homogênea castanha.

Teste do Indol: com uma alça estéril, foi inoculada cada uma das colônias típicas de *E. coli* em tubos de Caldo Triptona 1% e incubadas a 37°C, durante 24 h. Transcorrido esse tempo, foi adicionado 0,5 mL de reagente de Kovacs ao meio de cultura e agitado suavemente. A interpretação dos resultados foi feita da seguinte forma:

- Resultado positivo (presença de indol) - composto vermelho / violeta.
- Resultado negativo (ausência de indol) - reagente de Kovacs não altera a sua cor.

Todas as cepas confirmadas bioquimicamente como *E. coli* foram semeadas em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Merck®, Alemanha), incubadas a 37°C durante 24 h, e mantidas a 3-5 °C até sua análise subsequente por PCR.

4.2.4 Identificação molecular dos patotipos de *Escherichia coli*

Todas as cepas de *E. coli* isoladas e confirmadas por testes bioquímicos foram analisadas utilizando duas reações de PCR multiplex para identificar genes de virulência associados com a *E. coli*, como descrito previamente por KONG et al. (1999) e ORLANDI et al. (2006). As colônias foram submetidas à extração de DNA bacteriano pela técnica de lise térmica, de acordo com os procedimentos descritos por Chapman et al. (2001). Cada cepa foi inoculada em Caldo BHI e incubada a 37°C durante 24 horas. Culturas de caldo (100 µL) foram centrifugadas a 15.000 x g durante 10 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi resuspendido em 100 µL de água livre de nucleases e o tubo aquecido a 95°C durante 10 min. Os tubos foram centrifugados a 15.000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e

utilizado como o DNA template nos ensaios de PCR. Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C até o uso.

A primeira PCR multiplex foi realizada para identificar os fragmentos correspondentes aos genes responsáveis pela produção de fosfatase alcalina (*phoA*) presente em todas as *E. coli*, toxina termolábil 1 (*LT1*) e toxina termolábil 2 (*LT2*) e toxina termoestável (*ST1*) para ETEC, verotoxina (*VT*) para EHEC, o gene que codifica a adesina intimina (*eae*) para EPEC e EHEC. As reações de PCR foram realizadas utilizando GoTaq™ Colorless Master Mix (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, 1 µL de DNA (<250 ng) foi misturado com 25 µL de GoTaq™ Colorless Master Mix 2X, 0,75 µL de 10 µM de cada *primer* específico, senso e antisenso (Invitrogen, EUA), 1,5 µL de formamida (≥99,5%) (Thermo Scientific, EUA) e 13,5 µL de água livre de nucleases (Promega, EUA). O perfil de amplificação para os fragmentos foi desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido por 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C durante 1 min, e extensão a 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 5 min, em um Swift™ MaxPro Thermal Cyclor (Esco Technologies Inc., EUA). Os produtos de reação esperados para estes *primers* são fragmentos de 903, 275, 720, 175, 520 e 360 pb para os genes *phoA*, *LT1*, *LT2*, *ST1*, *VT* e *eae*, respectivamente (KONG et al., 1999). As sequências dos *primers* utilizados e os respectivos tamanhos dos produtos amplificados estão descritos na Tabela 5.

A segunda PCR multiplex utilizou um par de *primers Einv*, os quais detectam o gene de invasão do plasmídeo (*ipaH*) para EIEC e um par de *primers Eagg*, que detecta o gene (*aaTa*) do plasmídeo *pAA* da aderência agregativa para EAEC. As amplificações foram conduzidas em um volume de 25 µL contendo 7,5 µL de água livre de nucleases (Promega, EUA), 1,0 µL de 10 µM de cada *primer* específico, senso e antisenso (Invitrogen, EUA), 12,5 µL de GoTaq™ Colorless Master Mix 2X (Promega, EUA) e 1 µL de DNA (<250 ng). As amplificações foram realizadas por desnaturação inicial 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 1 min e 72°C durante 1 min e extensão final de 72°C durante 10 min (ORLANDI et al., 2006). Os produtos de reação esperados para estes *primers* são fragmentos de 140 e 194 pb para o gene *aaTa* e *ipaH*, respectivamente. As sequências dos *primers* utilizados e os respectivos tamanhos dos produtos amplificados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - *Primers* utilizados para identificação dos patótipos de *Escherichia coli*.

Patotipo	Primer	Orientação	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Autor
EC	phoA	Senso	GTGACAAAAGCCCGGACACCATAAATGCCT	903	Kong et al. (1999)
		antissenso	TACACTGTCATTACGTTGCGGATTGGCGT		
	LT1	Senso	TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA	275	
		antissenso	GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC		
ETEC	LT2	Senso	ATATCATTTTCTGTTTCAGCAAA	720	
		antissenso	CAATAAAATCATCTTCGCTCATG		
	ST1	Senso	CTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	175	
		antissenso	TAACATGGAGCACAGGCAGG		
EHEC	VT	Senso	GAACGAAATAATTTATATGTG	520	
		antissenso	CCTGATGATGGCAATTCAGTA		
EPEC	eae	Senso	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG	360	
EHEC		antissenso	CGAAGCCATTTGCTGGGCGCTC		
EIEC	Einv	Senso	TGGAAAACTCAGTGCCTCTGCGG	140	Orlandi et al. (2006)
		antissenso	TTCTGATGCCTGATGGACCAGGAG		
EAEC	Eagg	Senso	AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC	194	
		antissenso	ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC		

Fonte: Própria autoria.

Para as duas reações de PCR multiplex foram utilizados controles positivos das cepas ETEC, EHEC, EPEC, EIEC e EAEC, doados pela FIOCRUZ-INCQS (*Fundação Oswaldo Cruz-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde*) e como controles negativos o DNA foi substituído por água livre de nucleases.

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X) (Promega, EUA), num volume de 8,0 µL por amostra, adicionado de um volume de 2,0 µL de uma solução contendo 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,3% (w/v) de azul de bromofenol e 65% (p/v) de sacarose, pH=7,5, (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Life Technologies, EUA). Os géis foram corados com SYBR™ Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA) durante 20 min e visualizados à luz UV, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e software L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil). Os tamanhos dos produtos foram determinados pela comparação ao padrão de migração eletroforética de um marcador de peso molecular de 100 pb (GE Healthcare, EUA).

Para as amostras positivas ao PCR foi realizada a purificação enzimática do produto com ExoSAP-IT™ de USB (USB - Affymetrix), segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, 5,0 µL do produto da PCR selecionada foram misturados com 2,0 µL da ExoSAP-IT™, totalizando 7,0 µL. Depois, foram incubados a 37°C durante 15 min, para degradar os *primers* e nucleotídeos restantes. Finalmente, incubados a 80°C por 15 min, para inativar a ExoSAP-

ITTM. O produto foi armazenado até o momento em que foi encaminhado para o sequenciamento a -20°C.

4.2.4.1 Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição - RFLP

Para confirmação dos amplicons obtidos na PCR, foi realizada a digestão enzimática pela técnica PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) utilizando a endonuclease *Hinc II*, de acordo com Kong et al. (1999) com algumas modificações. A digestão se deu num volume de 20 µL, contendo 13,5 µL de água livre de nucleases (Promega, EUA), 2,0 µL de 10x Buffer tango (Thermo Scientific, EUA), 0,5 µL de *Hinc II* (10U/µL) (Thermo Scientific, EUA) e 4,0 µL de cada PCR selecionado, cujas bandas identificadas foram evidentes e como controle negativo o DNA foi substituído por água livre de nucleases. A mistura foi inoculada a 37°C por 4 horas e depois inativada por 20 min a 65°C. Os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, após coloração com SYBRTM Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA) e visualizados em transiluminador UV (BioAgency). Os tamanhos dos produtos foram determinados pela comparação ao padrão de migração eletroforética de um marcador de tamanho molecular de 50 pb (GE Healthcare, EUA). A Tabela 6 apresenta os tamanhos dos fragmentos gerados pela digestão de cada *primer* pela enzima *Hinc II*.

Tabela 6 -Tamanho dos fragmentos da amplificação por PCR e por digestão enzimática.

<i>Primer</i>	Tamanho dos produtos de PCR (pb)	Tamanho dos produtos por digestão (pb)	Referência
phoA	903	344/559	Kong et al. (1999)
LT1	275	201/74	
LT2	720	473/213/32	
ST1	175	22/153	
VT	520	33/158/332***	
Eae	360	282/79* 360**	

*cepa EPEC sensível à digestão pela *HincII*.

**cepa EHEC não sensível à digestão pela *HincII*.

***VT sensível à digestão pela *HincII*.

Fonte: Própria autoria.

4.2.5 Detecção de vírus entéricos – Astrovírus e Norovírus

As análises virais foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microbiologia e Laboratório de Higiene Zootécnica, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA-USP.

A detecção de AstV e NoV nas amostras de moluscos bivalves consistiu de quatro etapas: (1) Homogeneização e concentração, (2) extração de ácidos nucléicos, (3) síntese de DNA complementar (cDNA) e (4) detecção do material genético por PCR. Na Figura 10 pode ser

visualizado o fluxograma das principais etapas realizadas na detecção e caracterização de AstV e NoV nas amostras de moluscos bivalves.

Figura 10 - Fluxograma das principais etapas realizadas na detecção de astrovírus e norovírus nas amostras de moluscos bivalves.

Fonte: Própria autoria.

4.2.5.1 Homogeneização e concentração das partículas virais

Para a concentração das partículas virais dos mexilhões e das ostras, foi utilizada a metodologia proposta por Keller et al. (2013), com algumas modificações. Dois gramas de *pool* (composto por todos os tecidos dos moluscos bivalves) foram homogeneizados com o tampão Glicina 1:7 (p/v), pH 9.5 (0,1M glicina/0,3M NaCl). A mistura foi centrifugada a 10.000 x g durante 30 min a 4°C. O pH do sobrenadante foi ajustado para 7,5 e o mesmo volume de PEG-NaCl (16%, 0,6M) foi adicionado. A mistura permaneceu em agitador magnético *overnight* e

então foi centrifugada a $6.700 \times g$ por 30 minutos a 4°C . O precipitado foi ressuspensionado em 3 mL de tampão Na_2HPO_4 (0,15M, pH 9,0) e centrifugado novamente a $6.700 \times g$ por 30 minutos a 4°C . Uma alíquota de 400 μL do sobrenadante foi coletada e armazenada a -80°C até a etapa de extração de ácidos nucleicos.

4.2.5.2 Extração dos ácidos nucleicos

Alíquotas de 300 μL dos concentrados foram submetidos à extração de RNA, utilizando-se o método do TrizolTM (Life Technologies, EUA), após prévio descongelamento, conforme as recomendações do fabricante. Em resumo, em microtubo livre de nucleases, foram adicionados 300 μL do concentrado, 1 mL de Trizol e 200 μL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (na proporção 24:1), os microtubos foram agitados em vortex por 30 s e incubados em gelo durante 25 min. Depois, centrifugados a $14.000 \times g$ durante 25 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado e passado para um novo microtubo. Em seguida, foram adicionados 650 μL de isopropanol gelado v/v e misturados por inversão manual. Posteriormente, incubados *overnight* a -70°C e centrifugados a $14.000 \times g$ durante 25 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e adicionado 600 μL de etanol 70% gelado. Na sequência, os microtubos foram agitados levemente e incubados durante 5 min em gelo. Após, centrifugados a $14.000 \times g$ durante 25 min a 4°C , o sobrenadante foi descartado por inversão. Finalmente, os microtubos foram secos retirando com micropipeta os resíduos de etanol e o sedimento ressuspensionado em 20 μL de água livre de nucleases. Imediatamente foi realizada a transcrição reversa.

Ao final do respectivo protocolo de extração, foi realizada quantificação ($\mu\text{g/mL}$) do RNA obtido, para cada amostra, por espectrofotometria (DeNovix DS-11 Spectrophotometer, DeNovix, EUA) e segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280} , com a finalidade de se determinar o volume de cada amostra de RNA a ser submetido à reação de transcrição reversa. Assim, foram evitadas quantidades maiores do que 5,0 μg de RNA por amostra, conforme indicação do kit comercial. Este limite foi adotado para todas as reações realizadas.

4.2.5.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a reação de RT, foi utilizado o kit ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Em linhas gerais, em microtubo livre de nucleases, foram adicionados 4,0 μL de cada amostra de RNA extraído e 0,5 μg de Random Primers (Promega, EUA). Depois, os microtubos foram aquecidos a 70°C , durante 5 min, para a linearização das fitas de RNA. Em seguida, os microtubos foram resfriados em gelo, por 5 min para permitir o anelamento dos *primers* com o RNA. Na

sequência, foram adicionados 3,2 µL de água livre de nucleases, 4,0 µL do tampão ImProm-II™ 5X Reaction Buffer (1X), 4,8 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) (3mM), 1,0 µL de Recombinant RNasin™ Ribonuclease Inhibitor (1u/ µL), 1,0 µL de conjunto de nucleotídeos: adenina, citosina, timina, guanina (dNTP Mix) (0.5mM) e 1,0 µL de enzima ImProm-II™ 5X. A mistura, totalizando 20 µL, foi homogeneizada e colocada no termociclador, seguindo o protocolo consistindo de 25°C durante 5 min, 42°C durante 60 min e 70°C durante 15 min. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases.

4.2.5.4 Primers e controle positivo

As amostras foram avaliadas quanto à presença de AstV e NoV. Os *primers* foram selecionados para a amplificação de fragmento genômico do gene *pol* de AstV, de acordo com as recomendações de (TSE et al., 2011), em reações de RT-PCR. Para NoV, foi selecionado o gene codificador da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), de acordo com as recomendações de (TERIO et al., 2010), em reações de semi - *nested* PCR. A amplificação do RNA do NoV foi realizada com os *primers* específicos para o NoV genogrupo II (NI e NV-4611) (YUEN et al., 2001) e um *primer* amplamente reativo (NVp110) (LE GUYADER et al., 1996). Os controles internos consistiram para AstV em suspensões fecais bovinas positivas gentilmente fornecidas pelo Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa (FZEA, USP, Brasil) e para NoV foram suspensões termotolerantes do genogrupo II doadas pela Dra. Marize P. Miagostovich (Fiocruz, RJ, Brazil). As sequências dos *primers* utilizados e os respectivos tamanhos dos produtos amplificados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - *Primers* utilizados nas reações de RT-PCR e semi – *nested* PCR para AstV e NoV.

Vírus	Primer	Orientação	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referência
AstV	AstV-F	Senso	GAYTGGACBCGHTWTGATGG	432	Tse et al. (2011)
	AstV-R	antissenso	KYTTRACCCACATNCCAA		
NoV	NV4611	Senso	C(A/T)GCAGC(A/C)CT(A/G/T)GAAATCATGG	273	Yuen et al. (2001)
	NVp110	antissenso	AC(A/T/G)AT(C/T)TCATCATCACCATA		
	NI	Senso	GAATTCCATCGCCCACTGGCT	120	Le Guyader et al. (1996)
	NVp110	antissenso	AC(A/T/G)AT(C/T)TCATCATCACCATA		

Fonte: Própria autoria.

4.2.5.5 PCR e semi – *nested* PCR

Para detecção do AstV foi realizada a reação de PCR utilizando o kit GoTaq™ Colorless Master Mix (Promega, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Em síntese, 3,0 µL do produto da transcrição reversa DNA complementar (cDNA) foi misturado com 12,5 µL de GoTaq™ Colorless Master Mix 2X (Promega, EUA), 1,0 µL do *primer* senso específico (AstV-

F), 1,0 µL do *primer* antissenso específico (AstV-R) a 10µM e 7,5 µL de água livre de nucleases (Promega, EUA) totalizando 25µL. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases. O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), visando à amplificação do fragmento genômico viral de AstV compreendeu: incubação a 94°C durante 7 min, 50 ciclos de 94°C durante 1 min, 48°C durante 1 min e 72°C durante 1 min, sendo a extensão final dada a 72°C durante 10 min, conforme recomendado por (TSE et al., 2011).

Para detecção do NoV foi realizada a reação semi – *nested* PCR, específica para o genogrupo II. A primeira reação foi realizada com os *primers* NV-4611 e utilizando o kit GoTaq™ Colorless Master Mix 2X (Promega, EUA), segundo as recomendações do fabricante visando amplificação de um fragmento de 273 pb. As condições de termociclagem foram: 94°C por 2 min e 40 ciclos consistindo de: 94°C por 30s, 48°C por 90s, 68°C por 1 min, com uma etapa final de 10 min a 68°C. A segunda reação foi realizada com os *primers* (NI e NVp110), para amplificar um fragmento de 120 pb usando GoTaq™ Colorless Master Mix 2X (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante o protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), compreendeu: incubação a 94°C por 10 min, 25 ciclos a 94°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 30s, sendo a extensão final dada a 72°C por 10 min, conforme descrito por TERIO et al. (2010).

Os amplicons obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (AstV) e 2% (NoV) em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X) (Promega, EUA), num volume de 8,0 µL por amostra, adicionado de um volume de 2,0 µL de uma solução contendo 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,3% (w/v) de azul de bromofenol e 65% (p/v) de sacarose, pH=7,5, (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Life Technologies, EUA). Na sequência, o gel foi submetido à coloração em solução de SYBR™ Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA), durante 20 min. Em seguida, o gel foi observado à luz UV, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e software L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil). O tamanho dos amplicons foi determinado pela comparação do padrão de migração eletroforética de um marcador de peso molecular de 100pb (GE Healthcare, EUA). Para as amostras positivas ao PCR, foi realizada a purificação enzimática com o produto ExoSAP-IT™ (USB - Affymetrix), segundo as recomendações do fabricante. Em resumo, 5,0 µL do produto da PCR foram misturados com 2,0 µL da ExoSAP-IT™, totalizando 7,0 µL. Depois, foram incubados a 37°C durante 15 min, para degradar os *primers* e nucleotídeos restantes. Finalmente, incubados a

80°C por 15 min, para inativar a ExoSAP-IT™. O produto foi armazenado até o momento que foi encaminhado para o sequenciamento.

4.2.6 Sequenciamento nucleotídico

A reação de sequenciamento foi realizada com a utilização do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA), contendo AmpliTaq DNA Polymerase, de acordo com as especificações do fabricante, e dos *primers* senso e antissenso. As reações foram preparadas em microplaca de 96 cavidades (MicroAmp Optical 96 wells, Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) e o sequenciamento foi realizado num sequenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3130 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, EUA) pelo Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara.

4.2.7 Alinhamento de seqüências nucleotídicas

A busca de similaridade das seqüências-consenso geradas e editadas com o programa BioeEdit 7.0.9 (HALL, 1999) foi realizada pelo programa BLAST versão 2.0 (ALTSCHUL et al., 1997). A edição e alinhamento múltiplo das seqüências nucleotídicas obtidas, juntamente com outras depositadas no GenBank (Tabela 13 e 14) foi realizada com o programa ClustalW versão 1.4 (THOMPSON et al., 1994), implementado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9 (HALL, 1999), utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em ‘default’. O alinhamento para as seqüências deduzidas de aminoácidos também foi igualmente realizado. A visualização do alinhamento do fragmento de 903 pb corresponde ao gene *phoA* da *E. coli*, utilizando-se as seqüências deduzidas de aminoácidos, foi realizada através do programa Jalview versão 2.8.1 (WATERHOUSE et al., 2009). Matrizes de distâncias, dadas em porcentagens de similaridade/identidade, entre as seqüências nucleotídicas e de aminoácidos deduzidas foram calculadas através do programa MatGAT versão 2.0 (CAMPANELLA et al., 2003), utilizando algoritmo de alinhamento global.

4.2.8 Análise filogenética

Reconstruções filogenéticas para seqüências de 360 e 120 nucleotídeos, relativas ao gene *eae* (EPEC-EHEC) e ao gene RdRp (NoV), respectivamente, foram realizadas através do método *Neighbor-Joining* (NJ), utilizando-se para tanto dos modelos de substituição JTT + G, implementado no programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2011), aplicando suporte

nodal de *bootstrap* para 1.000 pseudo-réplicas (HILLS; BULL, 1993). Para as reconstruções foram utilizadas outras sequências de EPEC e norovírus depositadas no GenBank, conforme indicado nas Tabelas 8 e 9 - apêndice.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises microbiológicas

5.1.1 Contagem de coliformes totais e termotolerantes

5.1.1.1 Distribuição entre os tipos de amostras de moluscos bivalves

A enumeração de coliformes por tipo de amostras (ostras ou mexilhões) pela técnica de número mais provável em 100 g, revelou que a contagem de coliformes totais nos tecidos das ostras variou de 14,1 a 154,5 NMP/g e de coliformes termotolerantes de 3,0 a 48,6 NMP/g, sendo os valores médios para coliformes totais de 78 NMP/g e para coliformes termotolerantes de 17,8 NMP/g (Figura 10).

Figura 11 - Médias das populações de coliformes totais e termotolerantes nos tecidos das ostras (NMP/g), analisados bimensalmente. As barras apresentam os seus respectivos desvios-padrão.

Amostragem 1: Junho de 2016 – Local 1, amostragem 2: Agosto de 2016 – Local 1, amostragem 3: Outubro de 2016 – Local 1, amostragem 4: Dezembro de 2016 – Local 2 e amostragem 5: Fevereiro de 2017 – Local 2.

Fonte: Própria autoria.

Alguns estudos avaliando contaminação de ostras por coliformes foram executados na região de Cananéia em diferentes períodos. Doi et al. (2015), ao avaliarem a qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea* sp.) no estuário em diferentes pontos de amostragem, apresentaram resultados inferiores para coliformes totais, com média geométrica de 18,78 NMP/g, enquanto para a contagem de coliformes termotolerantes reportaram resultados similares com valor médio de 15,53 NMP/g. Ristori et al. (2007) obtiveram concentrações de

coliformes termotolerantes entre <3 e >2461 NMP/g em 40% das amostras de ostras (*Crassostrea brasiliiana*) avaliadas desde manguezais da mesma região, sugerindo um risco significativo da presença de microrganismos patogênicos nesse tipo de moluscos. Ballesteros et al. (2016) analisaram amostras de ostras coletadas antes e após o processo de depuração realizado na Cooperostra e em amostras de ostras coletadas de bancos naturais (Resex do Mandira e Itapitangui), no Complexo Estuarino Cananéia-Iguape, durante 2010 a 2011. A menor densidade de coliformes totais foi apresentada nas amostras coletadas após o processo de depuração (107 NMP/g) e a maior densidade de coliformes totais foi apresentada nas amostras coletadas antes do processo de depuração (1.220 NMP/g). O estudo de Alvarenga (2016) avaliou a presença de coliformes termotolerantes pelo NMP em 100 g em ostras de quatro regiões do estuário de Cananéia (Resex do Mandira, Ilha da Casca, Ponte e Balsa) e revelou contaminação com coliformes termotolerantes em graus variados para todas as regiões, concluindo que devem ser adotadas medidas de mitigação de risco de contaminação e veiculação de patógenos no consumo das ostras produzidas naquelas áreas.

Outros locais também foram amostrados e avaliados quanto à qualidade microbiológica de ostras no Brasil. Ostras comercializadas na Praia do Futuro, em Fortaleza-CE, no período de maio de 2002 a fevereiro de 2003, apresentaram contagem de coliformes termotolerantes variando de 4 a 930 NMP/g e de 4 a 430 NMP/g em dois pontos amostrais, sugerindo que a baixa qualidade microbiológica dos moluscos é provavelmente devido ao alto nível de contaminação no ambiente aquático dos moluscos da região (BARROS et al., 2005). As contagens de coliformes termotolerantes de 90 amostras de ostras provenientes das seis diferentes regiões de cultivo situados na parte insular da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil, variaram entre < 3 e 9 NMP/g, sendo que 73,3% das amostras analisadas apresentaram contagens de coliformes termotolerantes inferiores a 3,0 NMP/g (MIOTTO, 2009). Um levantamento sobre o nível de poluição dos Rios Cachoeira e Santana (Ilhéus, Bahia, Brasil) foi realizado durante um trimestre, por meio da avaliação da qualidade microbiológica da água e de frutos do mar (*Crassostrea rhizophorae* – ostra-do-mangue e *Tagelus plebeius* - moapem) extraídos desses rios. As amostras de ostras da Cachoeira apresentaram valores de coliformes termotolerantes no intervalo de 7 a 130 NMP/g, enquanto que as amostras de moapem da Cachoeira apresentaram valores entre 130 e 220 NMP/g. Por sua vez, as amostras de ostras e moapem do Rio Santana tiveram valores de coliformes termotolerantes entre <3 e 70 NMP/g e <3 e 140 NMP/g, respectivamente (SANDE et al., 2010).

Estudos internacionais têm avaliado a contaminação de ostras de diferentes zonas geográficas. A contagem de coliformes termotolerantes variou de 9 a 1100 NMP/g e apenas duas amostras de ostras excederam a diretriz de coliformes termotolerantes de ≥ 230 NMP/g para mercado atacadista de moluscos norte-americanos (PARVEEN et al., 2008). Três locais de cultivo de mariscos franceses da zona costeira do canal da Mancha tiveram concentrações de coliformes termotolerantes em ostras que variaram de <67 a 71,000 NMP/g (BALIERE et al., 2015b).

Mok et al. (2016) avaliaram a qualidade bacteriológica de ostras de uma área designada para o cultivo de crustáceos na Coreia, sendo que os valores médios geométricos de coliformes termotolerantes em amostras de ostras estiveram entre <18 e 230 NMP/g, atendendo ao limite da regulação para avaliar a qualidade microbiológica de moluscos bivalves definido pelo país.

No presente estudo, a contagem de coliformes totais dos mexilhões variou de 97,4 a 1300 NMP/g e coliformes termotolerantes de 3,6 a 927 NMP/g (Figura 11), sendo os valores médios geométricos para coliformes totais de 543 NMP/g e para coliformes termotolerantes de 221,5 NMP/g.

Figura 12 - Médias das populações de coliformes totais e termotolerantes nos tecidos dos mexilhões (NMP/g), analisados bimensalmente. As barras apresentam os seus respectivos desvios-padrão.

Amostragem 1: Junho de 2016 – Local 1, amostragem 2: Agosto de 2016 – Local 1, amostragem 3: Outubro de 2016 – Local 1, amostragem 4: Dezembro de 2016 – Local 2 e amostragem 5: Fevereiro de 2017 – Local 2.

Fonte: Própria autoria.

Na literatura consultada não foram encontradas pesquisas que avaliassem a qualidade microbiológica de mexilhões (*Mytella falcata*) cultivados no estuário de Cananéia. O grau de contaminação microbiológica foi avaliado em amostras de sururu *in natura*, do complexo estuarino de Mundaú-Manguaba no Estado de Alagoas, Brasil, e as populações de coliformes termotolerantes foram <3 NMP/g (SANTOS et al., 2014).

Mexilhões da espécie *Perna perna*, cultivados e comercializados no município de Ubatuba (SP), apresentaram 1.100 NMP/g de coliformes totais (CORDEIRO et al., 2007), com resultado similar ao obtido neste estudo na coleta realizada no mês de fevereiro de 2017 (1.300 NMP/g). Justino (2009) avaliou a qualidade microbiológica da água e de mexilhões (*Mytella guyanensis*) em área de manguezal do sistema estuarino da Baía de Vitória, Brasil, ao longo de 14 meses de monitoramento (fevereiro de 2008 a março de 2009). Os resultados das análises bacteriológicas revelaram elevada contaminação do mexilhão, com densidades de até 10^6 NMP/25g de coliformes totais. Nascimento et al. (2011) avaliaram mexilhões e ostras comercializados no mercado central da cidade de Aracaju-SE e observaram que a maioria das amostras dos dois tipos de moluscos bivalves apresentaram contagem de coliformes totais e termotolerantes > 1.600 NMP/g.

Em estudo realizado nas ilhas costeiras da região da Baixada Santista (Urubupunga e Ilha Porchat), fora das cidades de São Vicente e Santos, SP - Brasil (MARTINEZ; OLIVEIRA, 2010), foram encontradas densidades bacterianas nos mexilhões de 50 a 4.300 vezes maior que na água amostrada nas proximidades do cultivo, indicando que a relação entre o número de bactérias presentes na água e as bactérias acumuladas pelos moluscos não é simples e depende de muitos fatores, difíceis de avaliar. As densidades bacterianas encontradas em mexilhões são o resultado de interações complexas relacionadas a sua fisiologia e morfologia, como tamanho, filtração, excreção e taxas metabólicas e também dependem das características da água como composição e densidade (SOLÉ et al., 2000).

5.1.1.2 Distribuição por local de amostragem

Nesta pesquisa também foi avaliada a concentração de coliformes totais e termotolerantes por local de amostragem. Os maiores valores de coliforme totais e termotolerantes foram observados nas amostragens 4 e 5, realizadas no Resex do Mandira para as amostras de mexilhões. Os valores de coliformes totais encontrados foram 1.023 NMP/g na amostragem 4

e 1.300 NMP/g na amostragem 5, e para coliformes termotolerantes valores de 143,4 NMP/g na amostragem 4 e de 927 NMP/g na amostragem 5.

No entanto, para as amostras de ostras as maiores contagens se apresentaram nos dois locais Resex do Mandira e Itapanhoapina. Outros autores, por meio de análises microbiológicas da água, demonstraram índices de contaminação no estuário de Cananéia. Em estudo realizado por Barbieri et al. (2012), a qualidade microbiológica da água para o cultivo de ostras da Cooperostra apresentou valores superiores aos permitidos pela Legislação brasileira, em todos os anos estudados, segundo a resolução do CONAMA dos anos 2007, 2009 e 2010. No mesmo sentido, Ballesteros et al. (2016), ao analisarem o NMP de coliformes em amostras de água e ostras em três locais de Cananéia (Resex do Mandira, Itapitangui e Cooperostra), relataram que a maior média de densidade de coliformes totais e termotolerantes nos tecidos das ostras e nas amostras de água ocorreu em Resex do Mandira em relação aos demais locais. O estudo supracitado corrobora com os achados deste trabalho ao indicarem a região de Resex do Mandira como uma área com águas com maior presença de coliformes, portanto deve ser realizado um monitoramento mais detalhado da área para garantir um alimento seguro para a população.

No entanto, Doi et al. (2015), ao analisarem coliformes em água do município de Cananéia em diferentes pontos de amostragem, descreve que as áreas com menores médias geométricas foram Ilha da Casca, Resex do Mandira, Retiro e Pedrinhas, que apresentaram valores de coliformes entre 2 e 130 NMP/100 mL de coliformes totais e de termotolerantes entre 2 e 170 NMP/100 mL, com pouca variação na amplitude entre os dados coletados nas localidades e que as áreas mais contaminadas foram Pêr, Mosquiteiro, Itapitangui e Taquari. Da mesma forma, Mignani et al. (2013), ao analisarem o NMP de coliformes em água de três regiões de Cananéia (Resex do Mandira, Itapitangui e Cooperostra) entre os anos de 2007 e 2008, relataram que as menores médias geométricas de coliformes totais e termotolerantes ocorreram em Resex do Mandira. Grande parte dos trabalhos realizados em Cananéia avaliou a contaminação da água; no entanto, a correlação entre contagem de coliformes em água e nos moluscos bivalves é controversa. Ramos et al. (2010), avaliando a contagem de coliformes totais e termotolerantes em águas e ostras na Baía Sul da Ilha, SC, encontraram correlação positiva entre as contagens na água e em ostras.

Dos Santos et al. (2016) encontraram, em análises microbiológicas de águas de cultivo e de ostras no Estado da Bahia, valores de coliformes termotolerantes significativamente maiores

nas ostras do que na água de cultivo. Esses achados relacionam-se com a fisiologia do animal, que é capaz de concentrar esses agentes em seus tecidos, onde a sobrevivência dos agentes também é maior (RAMOS et al., 2010). Desta forma, a avaliação somente dos parâmetros de contaminação das águas de cultivo possui caráter limitado quanto a avaliar a segurança da ostra como alimento. No estudo de Collaço et al. (2015), avaliou-se o uso do geoprocessamento para definição de áreas para o cultivo de ostras na região estuarina de Cananéia. O mapa ambiental elaborado mostrou que os locais (Itapanhoapina e Resex do Mandira) têm um alto potencial de maricultura. Este mapa foi elaborado através da análise de dados sobre a situação de contaminação por coliformes termotolerantes durante o ano 2012, além de mapear a presença de atividades potencialmente poluidoras, como concentração de residências, ineficiente rede de saneamento básico e atividades náuticas.

Frente ao exposto, resultados diversos foram encontrados para cada tipo de molusco bivalve analisado e o mesmo aconteceu quando foi avaliado o efeito do período e local de coleta na distribuição microbiológica. Deve-se reconhecer que uma série de fatores pode contribuir para o aumento da contaminação no estuário, como por exemplo a pluviosidade, que está intimamente ligada às estações do ano, parecendo possuir grande influência no grau de contaminação do ambiente, devido a sua capacidade de arrastar resíduos orgânicos para os corpos hídricos e contribuindo para o aumento da concentração de bactérias em águas de crescimento e cultivo de moluscos. Outros fatores, como temperatura, ventos, níveis de maré, lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados podem também interferir diretamente no nível de contaminação dos moluscos bivalves.

5.2 Identificação e caracterização dos patótipos de *Escherichia coli*

5.2.1 Identificação microbiológica e bioquímica dos isolados de *Escherichia coli*

De cada placa de Ágar L-EMB considerada como positiva para *E. coli* (n= 48), observou-se crescimento de colônias nucleadas com centro preto e com ou sem brilho metálico (Figura 13), caracterizando assim a presença de *E. coli* nestas amostras, pois, segundo (SILVA et al., 2010), o Ágar L-EMB é um meio seletivo diferencial para distinguir *E. coli* dos demais coliformes termotolerantes. De cada amostra positiva (48), cinco colônias típicas foram isoladas aleatoriamente, totalizando 240 colônias. Essas colônias foram submetidas a testes bioquímicos (Figura 14) e os resultados foram os seguintes:

- Teste do indol: ocorreu formação do anel de coloração vermelho na superfície do meio, indicando uma reação positiva (+).
- Teste do citrato: não ocorreu mudança da coloração do meio, permanecendo a cor verde original, indicando resultado negativo (-).
- Teste Voges-Proskauer: o meio apresentou uma cor amarelo-acastanhada indicando o resultado negativo (-).

Das 240 colônias isoladas aleatoriamente das 48 amostras positivas, noventa e três colônias apresentaram resultados característicos de colônias de *E. coli* aos testes bioquímicos.

Figura 13 - Placa com Ágar L-EMB referente à o isolamento de *Escherichia coli* da amostra de ostra (OS-2-3).

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 14 - Testes bioquímicos da amostra de ostra (OS-2-3), (A) Teste do indol (+), (B) citrato (-) e (C) Voges-Proskauer (-).

Fonte: Acervo pessoal.

5.2.2 Identificação molecular de *Escherichia coli*

As 93 colônias foram submetidas a análises de PCR e os resultados mostraram que 48 colônias apresentaram o gene *phoA* (903 pb), um gene altamente conservado presente na *E. coli*. Os resultados são apresentados na Figura 15 e Tabela 8.

Figura 15 - Fotografia do gel de agarose, corado com SYBRTM Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos a partir da técnica de PCR para o gene *phoA*, utilizando extração de DNA por lise térmica.

As amostras de moluscos bivalves foram aleatoriamente selecionadas do banco de amostras (apêndice - quadro 1). (1) Marcador de massa molecular de (100 pb DNA ladder), (2) Controle positivo, (3) Amostra (MS-1-9), (4) Amostra (OS-2-3), (5) Amostra (MS-2-10), (6) Amostra (OS-3-5), (7) Amostra (MS-3-2), (8) Amostra (OS-4-5), (9) Amostra (MS-4-1), (10) Amostra (OS-5-8), (11) Amostra (MS-5-12), (12) Amostra (MS-5-13), (13) Amostra (MS-5-14) e (14) Controle negativo “água”.

Fonte: Acervo pessoal.

A qualidade dos moluscos bivalves é fortemente determinada pela microbiota bacteriana (COSTA, 2013). Nesse contexto, o uso de *E. coli* como um indicador sanitário em amostras de moluscos bivalves tem sido utilizado com frequência e desde então amplamente aplicado como parâmetro de qualidade microbiológica (SANATH KUMAR et al., 2001; GOURMELON et al., 2006; BENNANI et al., 2011; CAMPOS et al., 2013; BALIERE et al., 2015a; 2015b; CAMPOS et al., 2015; BALIERE et al., 2016), especialmente no que diz respeito à contaminação fecal (FELDHUSEN, 2000; MANNA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2016).

No estudo de Barros et al. (2005), foram avaliados pontos de comercialização (A e B) de ostra (*Crassostrea rhizophorae*) na Praia do Futuro, em Fortaleza-CE, no período de maio de

2002 a fevereiro de 2003. De um total de 81 cepas isoladas das amostras do ponto de comercialização “A”, foram identificadas 70 cepas (86,6%) de *E. coli*, enquanto que das 70 cepas oriundas do ponto de comercialização “B”, foram identificadas 45 (64,3%) como *E. coli*. Estes resultados confirmaram elevados percentuais de *E. coli* nas ostras obtidas a partir dos dois pontos de comercialização, confirmando a baixa qualidade microbiológica destes moluscos e, indiretamente, o elevado nível de contaminação por coliformes termotolerantes do ambiente aquático, onde são capturados esses bivalves.

Tabela 8 - Ocorrência de *Escherichia coli* e genes de virulência detectados.

Amostragem	Local	Molusco bivalve	Coliformes totais ^a (NMP g ⁻¹)	Coliformes termotolerantes ^a (NMP g ⁻¹)	<i>Escherichia coli</i> ^b (%)	EPEC-EHEC ^c (%)
1	Itapanhoapina	Mexilhões	97,4	3,6	13,3	0
		Ostras	14,1	3,0	0	0
2	Itapanhoapina	Mexilhões	174,5	15,5	6,7	0
		Ostras	136,3	7,1	13,3	0
3	Resex do Mandira	Mexilhões	119,5	17,7	20	0
		Ostras	154,5	48,6	26,7	0
4	Resex do Mandira	Mexilhões	1023	143,4	33,3	6,7
		Ostras	29,5	15,8	13,3	0
5	Resex do Mandira	Mexilhões	1300	927	20	13,3
		Ostras	55,5	14,3	13,3	6,7

^a Médias NMP (n=150 amostras), ^bPorcentagem de amostras positivas para *E. coli* pela análise molecular do gene *phoA* (24/150). ^cPorcentagem de amostras positivas para o gene *eae* (4/24).

NMP: número mais provável, EPEC: *E. coli* enteropatogênica, EHEC: *E. coli* enterohemorrágica.

Fonte: Própria autoria.

Neste estudo, os resultados mostraram que *E. coli* foi isolada em 16% (24 de 150) das amostras de moluscos bivalves (Tabela 9) usando o método do número mais provável, confirmado por colônias típicas em Ágar L-EMB. As concentrações médias de *E. coli* variaram de 3 a >927 NMP/g. No estudo de Miotto (2009), a presença de *E. coli* foi detectada em apenas 10 amostras (11,11%) das 90 amostras de ostra, coletas da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil, com contagens variando de <3 a 9 NMP/g. Pereira et al. (2006) encontraram valores de coliformes termotolerantes variando de <3 a 1.100 NMP/g em amostras de ostras coletadas na área de cultivo Sambaqui, localizada na região costeira de Florianópolis e detectaram presença de *E. coli* em 9% das amostras analisadas. Ramos (2007) analisou 180 amostras de carne de ostras provenientes da Baía Sul de Santa Catarina e detectou a presença de *E. coli* em somente 18 amostras. Segundo o Programa Brasileiro de Controle Sanitário de Moluscos Bivalves, 20% das amostras analisadas neste estudo seriam classificadas na categoria A e 4% como categoria B (Tabela 9).

Tabela 9 - População de *Escherichia coli* em amostras de moluscos bivalves^a pelo método do número mais provável (NMP).

Categoria ^b	<i>E. coli</i> (NMP g ⁻¹)			Prevalência (%)
	Mínimo	Mediana	Máximo	
A (<230 NMP 100 g ⁻¹)	3	21,20	150	20
B (≥230 a ≤46.000 NMP 100 g ⁻¹)	240	860	927	4
C (>46.000 NMP 100 g ⁻¹)	--- ND ---			

^an = 150, ^b = Programa Brasileiro de Controle Sanitário de Moluscos Bivalves. ND = não detectada.

Fonte: Própria autoria.

De acordo com Bennani et al. (2011), do total de amostras analisadas (n = 619), foram isoladas 151 amostras com *E. coli*, apresentando uma prevalência de 24,4%. A prevalência de cepas de *E. coli* foi alta em amostras de sedimento (40%) e moluscos bivalves (30%) em comparação com amostras de plâncton (16%) e amostras de água do mar (14%).

No estudo de Romalde et al. (2002) em moluscos coletados na costa noroeste da Espanha, a maioria das amostras (40,8%) estiveram no grupo de moluscos moderadamente poluídos (categoria B). As percentagens de amostras obtidas para os outros dois grupos foram de 29,9% e 29,3% para amostras limpas e altamente poluídas, respectivamente. Lodder-Verschoor et al. (2005) avaliaram amostras de ostras coletadas mensalmente por 13 meses a partir de quatro diferentes áreas de coleta comercial no Delta do Oosterschelde na Holanda. As amostras de

ostras foram classificadas determinando os níveis de *E. coli* de acordo com os padrões estabelecidos pela Diretriz de Conselho (91/492/CEE). Duas das 36 amostras de ostras comerciais e 2 de 28 amostras não comerciais foram classificadas na categoria B e, portanto, não estão prontas para consumo. Todas as outras amostras de ostras foram classificadas na categoria A.

Mariscos colhidos da Inglaterra e no País de Gales durante o período 1999-2008 apresentaram no último ano de estudo uma porcentagem de áreas de produção que atingiram a categoria B (86%). Durante o mesmo ano, a porcentagem de áreas categoria A e categoria C foi 2% e 11%, respectivamente, segundo a regulação da Comunidade Europeia No. 854/2004 (CAMPOS et al., 2013). Trinta e sete amostras coletadas desde a costa francesa, apresentaram uma concentração ≤ 230 *E. coli* por 100 g, sessenta e quatro estiveram entre 230 e 4.600 *E. coli* por 100 g (categoria B) e 25 apresentaram uma concentração >46.000 (categoria C).

Entre os mariscos analisados, as amêijoas foram as mais contaminadas (média geométrica de 2.440 *E. coli* por 100 g vs 1.070 para mexilhões e 364 para ostras). Nas águas, as concentrações de *E. coli* variaram de <38 a 190.530 por 100 mL, com uma média geométrica de 1.224 (BALIERE et al., 2015b). Os níveis de *E. coli* em ostras de todas as estações de amostragem variaram de <200 a 1.300 MNP/g. A máxima concentração de *E. coli* esteve dentro da faixa da categoria B em todas as estações (CAMPOS et al., 2015).

5.2.3 Identificação molecular dos patótipos de *Escherichia coli*

Das 24 amostras positivas para *E. coli* pela técnica de PCR, quatro (17%) foram identificadas como EPEC ou EHEC pela presença do gene *eae*, responsável pela adesão íntima em células epiteliais e comum para as ambas estirpes. Os resultados são apresentados na Figura 16 e Tabela 8. Por isso, os amplicons obtidos foram submetidos a RFLP e sequenciamento nucleotídico para confirmar o patótipo detectado neste estudo.

Nas amostragens 1, 2 e 3, que somaram 90 amostras, o gene *eae* não foi detectado. Foram detectadas amostras positivas nas amostragens 4 e 5. O gene *eae* foi detectado em amostras coletadas no Resex do Mandira durante o verão. A disponibilidade desses agentes patogênicos em ambientes aquáticos torna-se concentrada no interior da carne dos moluscos bivalves, tornando-os um potencial vetor de doenças transmitidas por alimentos (EVANS et al., 2016).

Neste estudo, os outros patótipos de *E. coli* (ETEC, EIEC e EAEC) não foram identificados. No entanto, patótipos como ETEC, STEC e EPEC atípica (ATEC) foram

detectados entre isolados bacterianos circulantes em ambientes aquáticos no Rio de Janeiro principalmente em águas residuais residenciais (DE LUCA REBELLO; REGUA-MANGIA, 2014).

Figura 16 - Fotografia de gel de agarose, corado com SYBRTM Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos a partir da técnica de PCR para os gene *phoA* (903 pb) e *eae* (360 pb), utilizando extração de DNA por lise térmica.).

As amostras de moluscos bivalves selecionadas do banco de amostras (apêndice - quadro 2). (1) Marcador de massa molecular de (100 pb DNA ladder), (2) Controle negativo “água”, (3) Controle positivo, (4) Amostra (MS-4-1), (5) Amostra (MS-4-5), (6) Amostra (OS-5-8), (7) Amostra (OS-5-10), (8) Amostra (MS-5-1), (9) Amostra (MS-5-2)

Fonte: Acervo pessoal.

O isolamento de cepas de STEC a partir de amostras de água, coletadas em diferentes municípios do norte do Paraná, foi descrito recentemente, destacando a importância da água potável, especialmente da água não tratada, como fonte de cepas STEC potencialmente patogênicas para humanos (LASCOWSKI et al., 2013). No estudo de Carlos et al. (2011) verificaram a presença de sete fatores de virulência entre amostras de *E. coli* isoladas de humanos, bovinos, frangos, ovelhas, suínos e caprinos saudáveis e de duas estações de tratamento de esgoto do rio Tietê. O patótipo EAEC foi encontrado apenas em amostras de água das estações de tratamento. Estes resultados indicam que, possivelmente, isolados de espécies de *E. coli* podem ser encontrados de forma onipresente em ambientes aquáticos no Brasil.

A circulação de cepas de *E. coli* portadoras de marcadores genéticos diarreio gênicos tem sido detectada em ecossistemas aquáticos de distintas áreas geográficas exibindo perfis patogênicos particulares. Hamelin et al. (2006) realizaram um levantamento de isolados ambientais de *E. coli* de águas de recreio, em Ontário, Canadá. Vinte e nove por cento de 308 isolados de um local de praia nos Grandes Lagos carregava um conjunto de patotipos de genes relacionados à virulência. A maioria dos isolados com genes de virulência foi classificada como ExPEC (26,4% dos isolados de *E. coli*); em contraste, a proporção de isolados de *E. coli* classificados como patotipos entéricos foi baixa (2,2%). Akter et al. (2013) reportou que, dos cinco patotipos avaliados (ETEC, EPEC, EHEC, EIEC e EAEC) em Bangladesh em grandes massas de água, foram detectados consistentemente os patotipos ETEC, EPEC, EHEC, mas os genes dos patotipos EIEC e EAEC foram rastreados apenas ocasionalmente. O patotipo ETEC foi o mais prevalente, seguido pelo patotipo EPEC. No estudo de Sidhu et al. (2013) testaram isolados de *E. coli* (n = 300) coletados de seis locais na região subtropical de Brisbane, Austrália, antes e depois da tempestade, para a presença de 11 genes de virulência específicos para patotipos diarreio gênicos. Durante os períodos de seca, os isolados pertencentes ao patotipo do EAEC foram comumente detectados (23%), seguido por EHEC (11%) e EPEC (11%). Por outro lado, uma prevalência mais uniforme de patotipos EPEC (14%), EAEC (12%), EIEC (10%), EHEC (7%) e ETEC (7%) foi observada após os eventos de tempestades.

5.2.3.1 RFLP dos patotipos de *Escherichia coli*

Adicionalmente, as seis amostras que apresentaram resultados positivos na primeira reação do PCR multiplex para identificação dos patotipos de *E. coli*, correspondentes ao gene *phoA* e *eae*, foram submetidas à digestão enzimática para confirmação desses resultados e diferenciação de cepas que possuem um gene em comum, no caso EPEC e EHEC (Figura 17). O gene *phoA* foi confirmado, pois por meio da digestão foram gerados os fragmentos específicos deste produto de PCR, os quais foram clivados em dois fragmentos 334 e 559 pb. No caso do gene *eae*, a digestão do fragmento 360 bp indica que foi sensível à digestão pela enzima *Hinc II*, com fragmentos de 282 e 79 pb, correspondendo assim ao patotipo EPEC, segundo a Tabela 9. Os produtos de PCR foram encaminhados para sequenciamento nucleotídico.

Este patotipo de *E. coli* tem sido isolado de moluscos bivalves como reportado pelos seguintes estudos. Resultados obtidos por Baliere, Rince, Blanco et al. (2015) mostraram a prevalência de EPEC em áreas de coleta de moluscos bivalves e suas bacias hidrográficas, com

0,83% (23 de 2.778) isolados de EPEC nas amostras de moluscos bivalves, 0,74% (62 de 8.371) isolados de EPEC em amostras de água fresca e 1,8% (4 de 225) isolados de EPEC em amostras água do mar coletadas na costa francesa no Canal da Mancha do Leste. A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014) afirmou que as cepas de *E. coli*, por exemplo EPEC e EHEC, estão entre os agentes mais frequentes de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo. Os surtos EPEC apresentaram uma distribuição sazonal com um pico maior durante o verão, seguido do outono, segundo o estudo realizado no Cairo, Egito, no qual isolaram e identificaram a EPEC em crianças menores de cinco anos, com sintomas como diarreia, durante diferentes épocas entre janeiro de 2009 a dezembro de 2009 (BEHIRY et al., 2011).

Figura 17 - Fotografia de gel de agarose, corado com SYBRTM Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de digestão por enzimas de restrição (*Hinc II*), para verificação dos genes *phoA* (334/559 pb) e *eae* (79 pb).

As amostras de moluscos bivalves selecionadas do banco de amostras (apêndice – quadro 2). (1) Marcador de massa molecular de (50 pb DNA ladder), (2) Controle negativo “água”, (3) Amostra (MS-4-1), (4) Amostra (MS-4-5), (5) Amostra (OS-5-8), (6) Amostra (OS-5-10), (7) Amostra (MS-5-1) e (8) Amostra (MS-5-2).

Fonte: Acervo pessoal.

Este estudo mostrou que os moluscos bivalves coletados em ambientes aquáticos podem ser positivos para o gene *eae* como indicador para EPEC. A prevalência de EPEC neste estudo foi maior no Resex do Mandira, que poderia estar relacionado com a presença dos maiores valores de coliformes totais e termotolerantes (1.300 NMP/g e 927 NMP/g, respectivamente). Alguns estudos sugerem que esses tipos de agentes patogênicos podem persistir em ambientes específicos, particularmente em temperaturas quentes que sustentam o crescimento (SINGH et

al., 2015) e que a transmissão pode ocorrer desde fontes ambientais como a vida selvagem e pecuária, bem como animais que ocupam o mesmo nicho (BALIERE et al., 2016). Resultados semelhantes foram encontrados por Balière et al. (2015), que obtiveram a maior frequência da cepa EPEC em novembro de 2013, de 21,3% (19 dos 89 isolados de EPEC a partir de moluscos bivalves, água fresca e água do mar) e em agosto de 2014, de 12,4% (11 dos 89 isolados de moluscos bivalves, água fresca e água do mar), correspondendo aos meses de verão e outono.

As áreas de cultivo de moluscos bivalves podem ser afetadas por pequenas saídas do rio ou o escoamento superficial difuso de contaminantes derivados de atividades agrícolas podendo contribuir para a contaminação por agentes patogênicos (OLIVEIRA et al., 2011). No processo de alimentação por filtração, os moluscos bivalves são mais suscetíveis a acumular bactérias e vírus patogênicos nos tecidos digestivos e musculares (SAPKOTA et al., 2008).

5.2.4 Sequenciamento nucleotídico e alinhamento das sequências de *Escherichia coli*

Foi realizado o sequenciamento nucleotídico dos fragmentos com aproximadamente 903 pb, correspondente ao gene *phoA* de *E. coli* das 48 colônias positivas no gel de agarose, e a posterior comparação da similaridade das sequências derivadas com sequências homólogas, levaram à confirmação do produto obtido como fragmento genômico procurado. As Figuras 22, 23, 24 e 25 – apêndice, ilustram o alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidos entre algumas das sequências positivas para *E. coli* escolhidas aleatoriamente, com seus respectivos histogramas de qualidade, conservação e consenso.

5.2.5 Análise de similaridade das sequências de *Escherichia coli*

Nos Quadros 1, 2, 3 e 4 – apêndice, são mostradas as porcentagens de Similaridade/Identidade relativas ao gene *phoA* de *Escherichia coli* para as cinco amostragens realizadas no estudo. As sequências da amostragem 1 e 2 apresentaram similaridade de 98,8 a 100% (Quadro 1) para com as outras sequências homólogas, enquanto as sequências da amostragem 3 exibiram similaridade de 92,5 a 100% (Quadro 2). As porcentagens de similaridade de aminoácidos obtidas na amostragem 4 e 5, entre as colônias de *E. coli* sequenciadas foram maiores do que 89,6 % (Quadro 3) e 91,3% (Quadro 4), quando comparadas umas com as outras. Enquanto que com relação às sequências de referência de *phoA*, recuperadas do GenBank, as colônias apresentaram similaridade variando de 89,6 a 100% (Quadro 3) e 90,8 a 100% (Quadro 4) e identidade variando de 88,6 a 100% (Quadro 3) e 89,9 a 100% (Quadro 4).

5.2.6 Análises filogenéticas e de similaridade do patotipo de *Escherichia coli*

As seis colônias positivas ao gene *eae* (360 pb) na PCR e ao RLFP (79 e 282 pb) foram enviadas para o sequenciamento para confirmação do patotipo EPEC e todas foram identificadas como sequências relacionadas a este patotipo. Estas sequências foram enviadas ao banco de dados GenBank (Centro Nacional de Biotecnologia, US National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 EUA) e suas respectivas identificações podem ser observadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Colônias positivas e sequenciadas de EPEC detectadas no presente trabalho, e depositadas no GenBank com seus respectivos códigos de acesso.

Amostra	Código de acesso GenBank
MS-4-1	MF981857
MS-4-5	MF981858
MS-5-1	MF981859
MS-5-2	MF981860
OS-5-8	MF981861
OS-5-10	MF981862

Fonte: Própria autoria.

A análise BLAST confirmou que essas sequências eram semelhantes às previamente determinadas nessa base de dados. Duas dessas sequências foram encontradas em mexilhões em dezembro de 2016 (EPEC MF981857 e EPEC MF981858), dois em ostras coletadas em fevereiro de 2016 (EPEC MF981861 e EPEC MF981862) e dois em mexilhões coletados em fevereiro de 2016 (EPEC MF981859 e EPEC MF981860). No Quadro 5 – apêndice, são mostradas as porcentagens de Similaridade/Identidade relativas ao gene *eae* da *Escherichia coli*. A similaridade entre as seis amostras sequenciadas variou entre 57,7 e 97,1% quando comparadas umas às outras; já quando comparadas a outras sequências de referência depositadas no GenBank, a similaridade variou entre 56,2 e 95,9%. A identidade entre as sequências deste estudo foi entre 57,7 e 99,7% e quando comparadas com as outras sequências de referência variou entre 56,8 e 100%.

A Figura 18 mostra o filograma obtido por análise filogenética de sequências de aminoácidos deduzidas. As amostras sequenciadas neste estudo foram agrupadas em cinco grupos filogenéticos principais, designados A, B, C, D e E. A sequência EPEC MF981861 foi agrupada no grupo A com outras sequências isoladas de gado e fezes humanas. EPEC MF981857 foi agrupada no grupo B, que inclui EPEC (AJ579305 e AJ716147). O grupo C

incluiu a sequência EPEC MF981859 e uma sequência isolada de fezes humanas no Uruguai. O Grupo D consistiu apenas na sequência EPEC MF981860. As sequências EPEC MF981858 e EPEC MF981862 permaneceram no grupo E, com AJ744877 (fezes humanas-Uruguai), AJ705053 (gado-Brasil), AJ705055 (gado-Brasil), AJ716140 (humano fezes-Uruguai) e AJ716125 (fezes humanas-Brasil).

Avaliando a árvore filogenética é possível verificar que as cepas isoladas não são muito semelhantes entre elas, porque não estão próximas umas das outras no filograma para o gene da *eae*, com exceção das cepas EPEC MF981858 e EPEC MF981860, que não apresentaram distância significativa na reconstrução filogenética.

Os resultados mostraram que as cepas EPEC que circulam no ambiente aquático avaliado são muito semelhantes às encontradas no Uruguai e no Brasil, apresentando semelhança entre as cepas que circulam na América do Sul. O papel das diferentes espécies animais que transportam EPEC tem sido pouco estudado nos últimos anos no Brasil, embora a presença desses agentes patogênicos tenha sido identificada nas fezes de búfalos (BERALDO et al., 2014), porcos (BORGES et al., 2012) e bezerros em São Paulo (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007) e Minas Gerais (ANDRADE et al., 2011; COURA et al., 2015).

Figura 18 - Filograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referentes à amplificação de um fragmento de 360 pb do gene *eae* de *Escherichia coli*.

As sequências de genes da *eae* determinadas neste estudo estão indicadas por círculos preenchidos. As amostras sequenciadas neste estudo foram agrupadas em cinco grupos filogenéticos principais, designados A, B, C, D e E. Os números de acesso do GenBank são exibidos na árvore. A barra representa a distância filogenética entre as sequências nucleotídicas.

Fonte: Própria autoria.

5.3 Detecção de astrovírus

Astrovírus não foram identificados em nenhuma das amostras de moluscos bivalves analisadas neste estudo, como pode ser verificado na Figura 19 e Tabela 11. Resultados similares foram reportados por Lodder-Verschoor et al. (2005), que avaliaram a presença de norovírus, rotavírus, enterovírus, vírus da Hepatite A e astrovírus, em um total de 28 amostras de ostras não comerciais e 36 comerciais (*pools* de tecidos hepatopancreáticos) coletadas na Holanda. Das 28 amostras de ostras não comerciais, quatro amostras foram positivas para enterovírus, e das 36 amostras de ostras comerciais, dez foram positivas para enterovírus. Os outros vírus entéricos avaliados não foram detectados.

Figura 19 - Fotografia de gel de agarose, corado com SYBRTM Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação do fragmento de 432 pb, relativo ao gene *pol* de astrovírus, obtidos através das técnicas de RT-PCR a partir de amostras de moluscos bivalves.

As amostras foram aleatoriamente selecionadas do banco de amostras (apêndice - quadro 4). (1) Marcador de massa molecular de (100 pb DNA ladder), (2) Controle negativo “água”, (3) Amostra (MS-1-9), (4) Amostra (OS-2-3), (5) Amostra (MS-2-10), (6) Amostra (OS-3-5), (7) Amostra (MS-3-2), (8) Amostra (OS-4-5), (9) Amostra (MS-4-1), (10) Amostra (OS-5-8), (11) Amostra (MS-5-12), (12) Amostra (MS-5-14), (13) Amostra (MS-5-15), (14) Controle positivo.

Fonte: Acervo pessoal.

No estudo de Hansman et al. (2008), que pesquisaram um total de 57 pacotes de amêijoas coletados em supermercados e mercados de peixes de 11 locais diferentes no oeste do Japão entre dezembro de 2005 e setembro de 2006, foram examinados vírus entéricos humanos

(norovírus, vírus de Aichi, rotavírus, adenovírus, vírus da hepatite A e astrovírus). Astrovírus não foram detectados em nenhum dos pacotes analisados, enquanto os outros vírus entéricos foram detectados. La Rosa et al. (2012) não encontraram astrovírus em mexilhões e amêijoas frescas e congeladas coletados durante os programas de monitoramento oficial de controle, desde áreas de cultivo, restaurantes, supermercados de peixe e supermercados de moluscos bivalves no sul da Itália (Sicília).

Os astrovírus têm sido implicados em surtos relacionados ao consumo de marisco, embora não tão comumente quanto os norovírus. Alguns trabalhos relatam o AstV associado à infecção pelo consumo de moluscos bivalves (ostras) (YAMASHITA et al., 1991; CAUL, 1996a; CAUL, 1996b; ANÔNIMO, 1998; NAKAGAWA-OKAMOTO et al., 2009). Um surto de astrovírus foi relatado quando um terço de 39 oficiais da marinha que participaram de uma festa sofreram de gastroenterite cinco dias após o consumo de ostras. Astrovírus foram detectados em cinco pacientes e dois mostraram anticorpos IgM astro-específico (KURTZ; LEE, 1987).

Outros estudos realizados na China e na Tunísia reportaram presença de astrovírus em moluscos bivalves, e a taxa de detecção variou de 6% e 61%, sendo as principais espécies estudadas a ostra do pacífico, amêijoas e mexilhões (ELAMRI et al., 2006; MING et al., 2013).

Cento e trinta e sete mariscos, 61 amêijoas (*Tapes decussates e semidecussatus*), 54 mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) e 22 ostras (*Crassostrea gigas*), foram coletadas para monitoramento ambiental e de mercado, nos quais AstV foram detectados em 18,2% dos moluscos bivalves. Os mexilhões parecem ser os bivalves mais contaminados, com 64,8% de amostras positivas, 55,7% e 22,7%, para amêijoas e ostras, respectivamente (GABRIELI et al., 2007). Astrovírus foram detectados em um grande número de amostras de ostras (n = 41), analisadas após um evento de inundação próximo a uma lagoa de produção de moluscos bivalves, e 205 casos de gastroenterites foram relacionadas ao consumo destas ostras, sendo que o AstV foi principalmente detectado durante as primeiras duas semanas (94% e 78% das amostras foram positivas para a primeira e segunda semana, respectivamente) (LE GUYADER et al., 2008).

Foram monitorados moluscos bivalves selvagens e de cultivo da Ria de Vigo (Espanha) para os principais vírus entéricos humanos, especificamente, norovírus, vírus da hepatite A, astrovírus, rotavírus, enterovírus e vírus Aichi. Os resultados mostraram a presença de pelo menos um vírus entérico em 63,4% das 41 amostras analisadas. NoV GII foi o vírus mais

prevalente, detectado em 53,7% das amostras, enquanto NoV GI, astrovírus e enterovírus foram encontrados em menores porcentagens (7,3; 12,2 e 12,2 %; respectivamente). Em geral, as amostras obtidas na natureza foram mais frequentemente contaminadas do que as cultivadas (70,6 vs. 58,3%) (LUZ VILARINO et al., 2009). O estudo de Le Saux et al. (2009) demonstrou o impacto de eventos de tempestade na contaminação de moluscos bivalves, mesmo sendo depurados antes da sua comercialização. Como os vírus persistem por mais tempo do que as bactérias indicadoras de contaminação fecal, vários tipos de vírus que causam gastroenterite foram relatados. A análise de amostras clínicas e de moluscos mostraram a presença de até oito cepas diferentes de vírus: norovírus GI e GII, astrovírus e rotavírus, sendo todas as cepas idênticas entre amostras clínicas e ambientais. Estes resultados mostram que a possível fonte de contaminação tinha fezes e esgoto, especialmente no inverno, quando uma alta diversidade de cepas pode estar presente. Em três anos de estudo conduzido no sul da França, AstV foram detectados em 17% das ostras (*Crassostrea gigas*) localizadas em áreas ocasionalmente impactadas pelo esgoto e em 37% de mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) coletados em áreas sujeitas a descarga de esgoto (LE GUYADER et al., 2010).

Cinquenta amostras de moluscos importadas para a Espanha durante o período de setembro de 2006 a março de 2009 foram analisadas para norovírus GI e GII, vírus da hepatite A e astrovírus. Os países de origem dos moluscos foram Marrocos, Peru, Vietnã e Coreia do Sul. As espécies estudadas foram amêijoas (*Callista chione*, n = 25; *Transanella pannosa*, n = 6; *Meretrix lyrata*, n = 3; e *Donax* sp., n = 5), ostras (*Crassostrea angulata*, n = 1), berbigão (*Cerastoderma edule*, n = 1), e lingueirão (*Solen marginatus*, n = 1 e *Ensis* sp., n = 8). Vinte das 50 amostras (40%) estavam contaminadas por pelo menos um vírus, embora todas as importações de moluscos cumprissem os padrões sanitários vigentes. Norovírus GI foi o vírus mais prevalente, detectado em 24% das amostras, seguido por astrovírus (18%), norovírus GII (8%) e vírus da hepatite A (4%) (POLO et al., 2010). Durante o período de janeiro 2001 a março 2012, 286 amostras fecais foram coletadas de pacientes associados ao consumo de ostras em 88 surtos de gastroenterites agudas não bacterianas na cidade Osaka, Japão. Analisaram a presença de 10 vírus entéricos humanos e foram detectadas oito cepas de AstV em cinco surtos (IRITANI et al., 2014).

O estudo de Le Guyader et al. (2000) relatou a investigação na França, por um período de três anos, do vírus da hepatite A, norovírus, enterovírus, rotavírus e astrovírus por RT-PCR e hibridização em tecido de marisco. Em relação aos AstV, as amostras de mexilhões estavam

mais contaminadas (50%) do que as amostras de ostras (17%) e um padrão estacional da presença de AstV foi observado, com uma detecção muito baixa durante o verão e alta detecção durante o inverno. Neste estudo não houve detecção de AstV durante todo o período de avaliação, o qual compreendeu a estação do verão e o inverno, no Brasil.

Astrovírus têm sido isolados de diversos tipos de água de consumo, doce, marinha e residual, como relatado por diversos autores (ABAD et al., 1997; PINTO et al., 2001; LE CANN et al., 2004; PUSCH et al., 2005; ARRAJ et al., 2008; MIAGOSTOVICH et al., 2008; RODRIGUEZ-DIAZ et al., 2009; AW; GIN, 2010; 2011; HELLMER et al., 2014), sendo assim estes vírus podem acumularse nos tecidos dos moluscos bivalves. Aw e Gin (2010) estudaram águas residuais coletadas em três pontos de recuperação em plantas de tratamento em Singapura. Em mais de seis meses de período de amostragem, adenovírus, astrovírus e ambos os genogrupos de norovírus GI e GII foram detectados em 100% do esgoto e do efluente secundário. A genotipagem de isolados ambientais revelou múltiplos genótipos de NoV GI e GII, Coxsackieviruses A, AstV tipo 1 e HAdV tipo 4. Aw e Gin (2011) avaliaram amostras de água superficial (n =78) coletadas entre junho de 2006 e janeiro de 2009 dos principais rios e canais de uma bacia hidrográfica altamente urbanizada na parte central da cidade da Singapura, seis amostras de água da baía estuarina também foram coletadas de março a julho de 2007. Entre as 84 amostras de água coletadas, pelo menos um vírus foi detectado em 70 (83,3%) das amostras. Os NoVs foram determinados como o tipo de vírus entérico mais prevalente detectado em amostras de águas superficiais urbanas, seguidos por astrovírus, enterovírus, adenovírus e vírus da hepatite A. AstV foi detectado em todos os tipos de amostras analisadas com proporções de: rio acima 12/26 (46,2%), rio abaixo 11/24 (45,8%), canal 15/24 (62,5%) e no estuário 2/6 (33,3%), com uma prevalência total de 40/80 (50%) em todas as amostras analisadas.

A experiência brasileira tem demonstrado que os astrovírus estão disseminados no meio ambiente em rios, hospedeiros e águas residuais (GUIMARAES et al., 2008; MIAGOSTOVICH et al., 2008; FUMIAN et al., 2013; NUÑEZ et al., 2016; SOUZA et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2017; ALVES et al., 2018). Em amostras de esgoto urbano de uma estação de tratamento da cidade do Rio de Janeiro, a frequência de detecção do AstV foi 16,7% (GUIMARAES et al., 2008). Outro estudo analisou a presença dos quatro principais vírus responsáveis pela gastroenterite aguda humana em um rede impactada por um processo de urbanização desordenada, durante um ano de coleta de amostras de riachos na bacia

hidrográfica ao redor da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. Este estudo foi realizado em treze locais de coleta de amostras de águas superficiais, incluindo diferentes áreas de assentamento humano caracterizadas como floresta urbana, rural e primária. Pelo menos um dos quatro tipos de vírus estudados foi detectado em 59,6% (31/52) das amostras de água analisadas e o rotavírus foi o mais frequente (44,2%), seguido pelo adenovírus humano (30,8%), astrovírus humano (15,4%) e norovírus (5,8%) (MIAGOSTOVICH et al., 2008). Mais recentemente, o estudo de Fumian et al. (2013) avaliou amostras de influentes e efluentes, coletadas duas vezes por mês ao longo de um período de um ano, na área metropolitana do Rio de Janeiro. AstV foram detectados em 14,6% amostras (14/48). Os estudos citados acima demonstram a presença do astrovírus em diferentes ambientes no Brasil, com diferentes níveis de ocorrência, sendo difícil compará-los entre si, pois as condições são sempre diferentes, incluindo condições do local, tipo de moluscos bivalves, período de amostragem, métodos de amostragem e detecção.

Tabela 11 - Ocorrência de astrovírus e norovírus GII em mexilhões e ostras coletadas desde o Complexo Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape durante o período 2016–2017.

Amostragem	Local	Mês	Estação	Molusco bivalve	AstV	NoV GII	NoV GII (positivo/total)
1	Itapanhoapina	Junho	Inverno	Mexilhões	ND	ND	0/15
				Ostras	ND	ND	0/15
2	Itapanhoapina	Agosto	Inverno	Mexilhões	ND	+	3/15
				Ostras	ND	+	2/15
3	Resex do Mandira	Outubro	Primavera	Mexilhões	ND	ND	0/15
				Ostras	ND	+	2/15
4	Resex do Mandira	Dezembro	Verão	Mexilhões	ND	+	3/15
				Ostras	ND	+	6/15
5	Resex do Mandira	Fevereiro	Verão	Mexilhões	ND	+	2/15
				Ostras	ND	+	3/15
Prevalência					-	-	21/150

ND: não detectada.

Fonte: Própria autoria.

5.4 Detecção de norovírus

Os resultados da RT-PCR para amplificação de um fragmento da ORF1 de norovírus das 150 amostras analisadas de moluscos bivalves mostraram que 21 (14%) foram positivas para norovírus GII, como são apresentados na Tabela 11 e Figura 20. As amostras positivas foram de mexilhões (38%) e ostras (62%), obtidas dos dois locais de amostragem: 5 (24%) de Itapanhoapina e 16 (76%) de Resex do Mandira.

Gentry et al. (2009) pesquisaram a distribuição de norovírus num estuário no Estado de Geórgia, EUA, durante um ano e mostraram que o NoV representou 9,3% das amostras positivas. Por tipo de amostra, a prevalência foi 55% (5/9) de ostras, 8,3% (6/72) de água e 14% (10/72) de plâncton. Outro estudo analisou aproximadamente 2.000 mariscos das espécies *Curbicula fluminea*, *Ruditapes decussatus*, *Tellina crassa*, *Spisula solida*, *Dosinia exoleta*, *Ensis* spp., *Mytilus* spp., *Ostrea edulis* e *Cerastoderma edule*, organizados em 49 lotes, coletados entre março de 2008 e fevereiro de 2009 no Estuário do rio Minhoem, Estuário do rio Lima, Estuário do rio Douro e outros ambientes aquáticos em Portugal. Os mariscos foram testados para norovírus, vírus da hepatite A e enterovírus. No geral, 67% de todos os lotes analisados foram contaminados por pelo menos um dos vírus estudados, enquanto a presença simultânea de dois e três vírus foi detectada em lotes de 22% e 6%, respectivamente. Dos três vírus, o NoV foi detectado em 37% dos lotes, seguido pelo EV em 35% e pelo VHA em 33% (MESQUITA et al., 2011). Polo et al. (2015) fizeram um levantamento durante 18 meses em Galícia, Espanha. Este estuário espanhol é a área de produção de bivalves mais importante da Europa. Determinaram a prevalência do vírus da hepatite A e norovírus, incluindo os genogrupos I e II. Quatro espécies de bivalves foram estudadas, incluindo mexilhões selvagens (*Mytilus galloprovincialis*), amêijoas (*Venerupis philippinarum* e *Venerupis decussata*) e berbigão (*Cerastoderma edule*). No geral, 55,4% das amostras estavam contaminadas por pelo menos um dos vírus estudados, sendo detectada a presença simultânea de dois ou três vírus em 11,3% dos casos. NoV GI foi o vírus mais prevalente (32,1%), seguido por NoV GII (25,6%) e VHA (10,1%). Os mexilhões cultivados apresentaram maior percentual de amostras positivas (61,4%), seguidos de berbigão (59,4%), mexilhões (54,3%) e amêijoas (38,7%).

O NoV tem sido encontrado em moluscos bivalves de estuários em vários países ao redor do mundo. Na Inglaterra, níveis de NoV foram detectados em ostras colocadas em vários locais dentro de um estuário impactado por descargas de esgoto (CAMPOS et al., 2015). Farkas et al. (2018) relataram que norovírus foram encontrados em moluscos bivalves colhidos no estuário

Conway (North Wales, Reino Unido). Resultados similares ao encontrados neste estudo foram reportados por DIEGO et al. (2013) ao analisarem ostras da área de cultivo no complexo estuarino no “Vale do Ribeira” (Cananéia-Brasil) em duas ocasiões diferentes (julho e outubro 2010). A *qPCR* detectou NoV GI nas áreas de cultivo e a contaminação de ostras pelo vírus também foi evidenciada nos tanques de depuração (NoV GII). Mais recentemente, estes mesmos autores detectaram a presença de adenovírus em ostras do Complexo Estuarino-Lagunar de Cananéia, na área de cultivo e depois de serem depuradas (LEAL et al., 2018). Souza et al. (2012) mostraram que, além do adenovírus (o vírus mais prevalente encontrado naquele estudo), os outros três vírus examinados (HAV, HuNoV GI/GII e JCPyV) foram encontrados em amostras de ostras, cultivas em Santa Catarina, Brasil. Entretanto, no estudo de Keller et al. (2013) realizado com mexilhões na região do manguezal de Vitória, ES, Brasil, o norovírus não foi detectado. Do mesmo modo, Souza et al. (2013) avaliaram, ao longo do 2010, sessenta e cinco dúzias de ostras *Crassostrea gigas*, colocadas em cestas apropriadas e alocadas em quatro locais diferentes na Baía de Florianópolis, no estado de Santa Catarina, Brasil. NoV GI/GII, vírus da Hepatite A e poliomavírus JC não foram detectados nessas amostras.

Figura 20 - Fotografia de gel de agarose, corado com SYBRTM Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação do fragmento de 120 pb, relativo ao RdRp de norovírus, obtidos através das técnicas de RT-PCR a partir de amostras de moluscos bivalves

As amostras foram aleatoriamente selecionadas do banco de amostras (apêndice – quadro 4). (1) Marcador de massa molecular de (100 pb DNA ladder), (2) Amostra (OS-2-3), (3) Amostra (MS-2-10), (4) Amostra (OS-3-6), (5) Amostra (OS-4-1), (6) Amostra (MS-4-5), (6) Amostra (OS-5-8), (7) Controle positivo, (11) Controle negativo “água”.

Fonte: Acervo pessoal.

Uma pesquisa de três anos, entre 2005 e 2008, que investigou 116 amostras de mariscos varejistas (amêijoas, mexilhões e ostras), mostrou detecção confirmada por sequenciamento dos genótipos NoV G11.4 e NoV GIIB/Hilversum em 60% (12/20) das amostras (TERIO et al., 2010). Da mesma forma, os genótipos NoV GII.4 e NoV GIIB foram encontrados em 16,7% das amostras de ostras e mexilhões (n = 42) entre setembro 2003 e janeiro 2004 para a presença de NoV em mariscos holandeses (BOXMAN et al., 2006). Outra pesquisa, conduzida ao longo de um ano, na qual foram analisadas 235 amostras de mariscos italianos (*Tapes philippinarum*, *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea* spp. e *Chlamys* spp.) mostrou a presença de NoV em 14% de todas as amostras testadas. Amostras de mariscos colhidas na costa polaca (n = 120) foram testados para NoV e VHA. NoV GI foi detectado em 22 (18,3%), NoV GII em 28 (23,3%) e VHA em 9 (7,5%) dos moluscos (BIGORAJ et al., 2014). Kittigul et al. (2016) detectaram e caracterizaram norovírus em três espécies de moluscos bivalves: ostras (*Saccostrea forskali*), amêijoas (*Anadara nodifera*) e mexilhões (*Perna viridis*), sendo que 12,3% (37/300 amostras) das amostras de moluscos tiveram resultados positivos para norovírus. A frequência de norovírus em ostras, de 17% (17/100 amostras), foi maior que em mexilhões, de 14% (14/100 amostras) e amêijoas, de 6% (6/100 amostras). Os resultados confirmam o risco para a saúde associado ao consumo de moluscos como possíveis vetores de patologias virais e mostra como *E. coli* não pode ser considerada como indicador de contaminação viral, uma vez que a presença de ácido nucleico VHA e/ou NoV foi detectado também em amostras respeitando o limite da legislação europeia para este indicador (CROCI et al., 2007).

O NoV é frequentemente encontrado em águas com contaminação fecal e é responsável por muitas doenças entéricas associadas a ostras em humanos (LEES, 2000; ATMAR, 2010). Uma parte significativa dos fluxos das águas residuais humanas podem transportar microrganismos patogênicos e chegar nas águas costeiras (LE SAUX et al., 2009). Embora as águas residuais sejam geralmente tratadas antes de serem lançadas em córregos e rios, durante os eventos de chuvas fortes, a poluição pode chegar ao mar devido a escoamento superficial ou transbordamento do esgoto (DE OLIVEIRA; HANAZAKI, 2011; BIGORAJ et al., 2014) ou sobrecarga das estações de tratamento de esgoto (WANG; DENG, 2016). Essa contaminação também pode ser introduzida por descarga de esgoto de embarcações (MORESCO et al., 2012). Outras fontes de poluição fecal humana e animal incluem resíduos de animais de estimação e de vida selvagem e vazamentos de fossa séptica, que também podem produzir contaminação esporádica (DE OLIVEIRA; HANAZAKI, 2011).

Neste estudo, 66,6% das amostras positivas para NoV GII corresponderam à estação chuvosa em Cananéia, que ocorre entre os meses de novembro a abril (DE GODOY et al., 2015). Os microrganismos podem ser absorvidos à matéria orgânica, às partículas suspensas, ou ao sedimento, contribuindo para a sua persistência no meio ambiente (MORESCO et al., 2012).

O NoV tem sido encontrado em águas de estuários em vários países ao redor do mundo. No México, o vírus foi identificado durante a primavera em águas estuarinas com taxas de detecção de 70% (HERNANDEZ-MORGA et al., 2009). No Havaí, o norovírus genogrupo I e II foram detectados nos parques “Bellows Field Beach” e “Kaiaka Bay Beach”, respectivamente (TONG et al., 2011). Águas estuarinas foram coletadas em locais da Nova Zelândia entre dezembro de 2003 e junho de 2013; norovírus GII foi mais frequentemente detectado do que adenovírus, poliomavírus humano e NoV GI (HEWITT et al., 2013).

Os NoV são amplamente disseminados em diversos ecossistemas aquáticos brasileiros (MIAGOSTOVICH et al., 2008; VICTORIA et al., 2009; VICTORIA et al., 2010a; 2010b; PRADO et al., 2011; VIEIRA et al., 2012; FUMIAN et al., 2013). Em geral, têm sido detectados em águas residuais do Rio de Janeiro (15 a 45% de positividade) (PRADO et al., 2011; FUMIAN et al., 2013), na Lagoa Rodrigo de Freitas (18%) (VIEIRA et al., 2012), em águas superficiais (rio, baía e riacho) e esgoto não tratado, da cidade de Belém com uma taxa de positividade de 9,4% (TEIXEIRA et al., 2016) e em rios da Bacia Amazônica (5,8%) (MIAGOSTOVICH et al., 2008), (7,4%) (VIEIRA et al., 2016). Altas frequências de detecção de NoV GII vêm sendo relatadas em águas residuais urbanas e hospitalares da cidade do Rio de Janeiro (VICTORIA et al., 2010a; PRADO et al., 2011; FUMIAN et al., 2013). A prevalência de NoV GII também foi observada em diversos ecossistemas aquáticos de Florianópolis, SC (VICTORIA, et al., 2010b). Além disso, uma subestimação do verdadeiro número de infecções causadas por NoV transmitidas pela água e por alimentos provavelmente existe devido à frequente ausência de uma vigilância ativa no sistema para identificar e relatar surtos de NoV na maioria dos países latino-americanos (DA SILVA POLÓ et al., 2016).

5.4.1 Sequenciamento nucleotídico e alinhamento das sequências

Do total de 21 amostras positivas ao RT-PCR, apenas 16 puderam ser submetidas ao sequenciamento nucleotídico, pela adequada concentração de DNA apresentada pelas mesmas (mínimo necessário para a realização do sequenciamento: 10 ng/μL, segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280}). Este fato pode ter ocorrido devido à baixa concentração viral nos

tecidos dos moluscos bivalves ou ainda pela degradação do RNA viral em consequência do tempo de armazenamento das amostras em questão.

Das 16 amostras de NoV sequenciadas, treze amostras eram provenientes do local Resex do Mandira (OS-3-6, OS-3-7, OS-4-1, OS-4-5, OS-4-10, OS-4-11, OS-4-13, MS-4-5, MS-4-8, OS-5-8, OS-5-10, MS-5-12 e MS-5-15) e três amostras de Itapanhoapina (OS-2-3, MS-2-10 e MS-2-12). As amostras sequenciadas foram enviadas ao banco de dados do GenBank e suas respectivas identificações podem ser observadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Amostras positivas e sequenciadas de norovírus detectadas no presente trabalho, e depositadas no GenBank com seus respectivos códigos de acesso.

Amostra	Código de acesso GenBank
OS-2-3	MH444874
MS-2-10	MH444875
MS-2-12	MH444876
OS-3-6	MH444878
OS-3-7	MH444879
OS-4-1	MH444880
OS-4-5	MH444881
OS-4-10	MH444882
OS-4-11	MH444883
OS-4-13	MH444884
MS-4-5	MH444885
MS-4-8	MH444886
OS-5-8	MH444887
OS-5-10	MH444888
MS-5-12	MH444889
MS-5-15	MH444877

Fonte: Própria autoria.

A análise BLAST confirmou que essas sequências eram semelhantes às sequências da ORF1b previamente determinadas. Três destas sequências foram encontradas em ostras (OS) e mexilhões (MS) coletadas em agosto 2016 (OS-2-3, MS-2-10 e MS-2-12), duas em ostras coletadas em 2016 (OS-3-6 e OS-3-7) e sete em ostras e mexilhões coletados em dezembro 2016 (OS-4-1, OS-4-5, OS-4-10, OS-4-11, OS-4-13, MS-4-5 e MS-4-8), e quatro em ostras e mexilhões em fevereiro 2017 (OS-5-8, OS-5-10, MS-5-12 e MS-5-15).

5.4.2 Análises filogenéticas e de similaridade de norovírus

A reconstrução filogenética das sequências nucleotídicas das amostras positivas para NoV GII em associação com outras sequências obtidas do GenBank está descrita na Figura 21. As amostras de NoV GII foram agrupadas num clado único juntamente com outras sequências de NoV, sendo mais próximas filogeneticamente de sequências originárias do Brasil, Japão e México. As sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo apresentaram valores maiores que 97,2% de identidade com sequências de norovírus detectadas no Brasil (Hu/GII/ICB1241/1996/Brazil, Hu/GII/ICB2109/1996/Brazil, Hu/GII/ICB1467/1996/Brazil, Hu/GII/ICB1434/1996/Brazil e Hu/GII/ICB2670/1996/Brazil), pertencentes ao genótipo GII.4 (CASTILHO et al., 2006). Outro estudo foi realizado por Morillo et al. (2008) em amostras fecais de pacientes com gastroenterites provenientes de surtos de diarreia no estado de São Paulo. Do total de amostras analisadas, 32 (15,7%) foram positivas para norovírus genogrupo GII. A comparação das sequências dos produtos de PCR com as sequências do GenBank demonstrou 88,8% a 98,8% de identidade, sugerindo a presença de norovírus genogrupo GII em surtos de gastroenterites no Estado de São Paulo. No Brasil, foram descritos os NoV GII, evidenciando uma grande variedade de genótipos circulantes, revelando a diversidade viral nesta região (DA SILVA POLÓ et al., 2016).

As cepas foram analisadas juntamente com uma seleção de cepas NoV GII representativas de vários genótipos. Estudos epidemiológicos em larga escala documentaram o surgimento sequencial de variantes NoV GII emergentes consecutivamente em todo o mundo (VINJE; KOOPMANS, 1996; LOPMAN et al., 2004; GALLIMORE et al., 2007). De acordo com os estudos realizados por Kittigul et al. (2016) que analisaram a genotipagem molecular de norovírus em ostras, mexilhões e berbigão em Bangkok, Tailândia, as sequências de norovírus de todos os três tipos de moluscos do estudo estavam intimamente relacionadas a cepas de norovírus encontradas em amostras fecais, de ostras e de água em todo o mundo, demonstrando assim que os norovírus que circulam em humanos e no meio ambiente e nos moluscos podem ser um veículo potencial para a transmissão.

Nos Quadros 6 e 7 – apêndice, são mostradas as porcentagens de Similaridade/Identidade relativas ao sequenciamento do gene RdRp do norovírus para as 16 amostras sequenciadas no estudo. Os valores encontrados corroboram os agrupamentos observados nas reconstruções filogenéticas. Neste sentido, no Quadro 6, as sequências apresentaram similaridade de 93,8-96,6% para com as outras sequências homólogas, enquanto as sequências apresentadas no

Quadro 7 exibiram similaridade de 93,8 a 96,1%. A similaridade das sequências do gene RdRp de norovírus neste estudo, quando comparadas com outras sequências homólogas de norovírus depositadas no GenBank e que ficaram no mesmo clado filogenético das sequências brasileiras, foi igual ou superior a 93,8%. Resultados similares foram reportados por Morillo et al. (2008), que ao comparar suas sequências com a sequências NoV do genogrupo GII (DQ397325-BRA) disponíveis no GenBank, mostraram similaridade de 93 a 100%. As amostras da cidade de Praia Grande apresentaram 97,7%, amostras do centro de saúde demonstraram 100% e amostras de hospitais apresentam 88,9 a 100% de similaridade entre eles.

Comparando as sequências obtidas neste estudo com todas as sequências depositadas no GenBank, os valores de similaridade ficaram entre 41,6 e 96,6%. Já a identidade entre as mesmas sequências de nucleotídeos já descritas pertencentes ao mesmo clado das amostras brasileiras foi igual ou superior a 92,2%. Considerando todas as sequências, os valores de identidade variaram entre 40,4 e 100%.

Figura 21 - Filograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referentes à amplificação de um fragmento de 120 pb do gene RdRp do norovírus.

As sequências de genes da RdRp determinadas em este estudo são indicadas por círculos preenchidos. Os números de acesso do GenBank estão exibidos na árvore. A barra representa a distância filogenética entre as sequências nucleotídicas.

Fonte: própria autoria.

6. CONCLUSÕES

A contagem de coliformes totais e termotolerantes revelou que estes valores podem ser influenciados pelo tipo de moluscos bivalve e pela local de amostragem no qual foram coletados os moluscos. A regulamentação brasileira não estabelece padrões de coliformes totais e termotolerantes para consumo de moluscos bivalves crus, condição na qual eles são geralmente consumidos. Esta ausência de regulamentação dificulta a avaliação microbiológica deste tipo de alimento e leva a incertezas entre os consumidores em relação ao consumo de moluscos.

Esta é a primeira detecção da cepa *Escherichia coli* enteropatogênica em moluscos bivalves no Brasil. Portanto, contribui para a epidemiologia da contaminação por *Escherichia coli* em moluscos bivalves e a avaliação da prevalência e variação genética da *Escherichia coli* enteropatogênica em diferentes países. Uma atualização na legislação, criando limites para *Escherichia coli* e seus patótipos em alimentos, principalmente os consumido *in natura*, permitiria às instituições de Vigilância Sanitária realizar inspeções mais rigorosas nas etapas de cultivo e comercialização, garantindo a inocuidade dos alimentos.

O norovírus foi detectado em moluscos bivalves coletados no estuário. É possível o uso destes vírus como bioindicadores da contaminação da água do mar. A introdução de ferramentas de diagnóstico específicas para patógenos virais de origem alimentar é fundamental para melhorar as estratégias de controle e também para monitorar a epidemiologia das cepas que circulam no meio ambiente.

As amostras de norovírus GII foram agrupadas em um clado único juntamente com outras sequências no norovírus, sendo mais próximas filogeneticamente de sequências originárias do Brasil, Japão e México.

Os resultados obtidos fornecem contribuições importantes para o auxílio nas decisões de implantação de medidas de proteção a este ambiente estuarino e na prevenção de surtos relacionados ao consumo de moluscos bivalves contaminados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, F. et al. Astrovirus survival in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 63, n. 8, p. 3119-3122, 1997.
- AIDAR-UGRINOVICH, L. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 115, n. 3, p. 297-306, 2007.
- AKTER, S. et al. Prevalence and distribution of different diarrhoeagenic *Escherichia coli* virulotypes in major water bodies in Bangladesh. **Epidemiology & Infection**. Cambridge, v. 141, n. 12, p. 2516-2525, 2013.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALVARENGA, A. R. D. **Avaliação de parâmetros microbiológicos e toxicológicos de ostras (*Crassostrea* sp.) do município de Cananéia, São Paulo**. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Biológico São Paulo, São Paulo, 2016.
- ALVES, C. D. et al. Detection and genetic characterization of Mamastrovirus 5 from Brazilian dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**. Rio de Janeiro, *In press*, 2018.
- ANDRADE, J. A. B. D.; HAAPALAINEN, E. F.; FAGUNDES-NETO, U. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of persistent diarrhea: an experimental model using light microscopy. **Revista Paulista de Pediatria**. São Paulo, v. 29, n. 1, p. 60-66, 2011.
- Anônimo, 1998. Outbreaks of gastroenteritis in England and Wales associated with shellfish: 1996 and 1997. **Communication Disease Report**. 8, 21-24.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Committee on Microbiological for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington. APHA, 2001.
- APPLETON, H.; HIGGINS, P. G. Viruses and gastroenteritis in infants. **The Lancet**. Amsterdam, v. 1, p. 1, 1975.
- ARNOLD, A.; MACMAHON, E. Adenovirus infections. **Medicine**. v.45, p.777-780, 2017.

ARRAJ, A. et al. An epidemiological study of enteric viruses in sewage with molecular characterization by RT-PCR and sequence analysis. **Journal of Water and Health**. Londres, v. 6, n. 3, p. 351-358, 2008.

ATMAR, R. L. Noroviruses: state of the art. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 2, n. 3, p. 117-126, 2010.

ATMAR, R. L.; ESTES, M. K. The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection. **Gastroenterology Clinics of North America**. Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 275-290, 2006.

ATMAR, R. L. et al. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 61, n. 8, p. 3014-3018, 1995.

AW, T. G.; GIN, K. Y. H. Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 109, n. 2, p. 716-730, 2010.

AW, T. G.; GIN, K. Y. H. Prevalence and genetic diversity of waterborne pathogenic viruses in surface waters of tropical urban catchments. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 110, n. 4, p. 903-914, 2011.

AYULO, A. M. R.; MACHADO, R. A.; SCUSSEL, V. M. Enterotoxigenic *Escherichia-coli* and *Staphylococcus-aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 24, n. 1-2, p. 171-178, 1994.

BAERT, L. et al. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health?. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 151, n. 3, p. 261-269, 2011.

BAERT, L.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Evaluation of two viral extraction methods for the detection of human noroviruses in shellfish with conventional and real-time reverse transcriptase PCR. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 44, n. 1, p. 106-111, 2007.

Bányai, K.; Estes, M.K.; Martella, V., Parashar U.M. Viral gastroenteritis. **The Lancet**. v. 392, n. 10142, p. 175-186, 2018.

BAGORDO, F. et al. Rotavirus occurrence in shellfish with low levels of *E. coli*. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 5, n. 3, p. 169-175, 2013.

BAKER, C. A. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. **Food Control**. Amsterdam, v. 59, p. 407-419, 2016.

BALDRIDGE, M. T.; TURULA, H.; WOBUS, C. E. Norovirus regulation by host and microbe. **Trends in Molecular Medicine**. Amsterdam, v. 22, n. 12, p. 1047-1059, 2016.

BALIERE, C. et al. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* in Shellfish-Harvesting Areas and Their Watersheds. **Frontiers in Microbiology**. Lausanne, v. 6, p. 1-15, 2015a.

BALIERE, C. et al. Successful detection of pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish, environmental waters and sediment using the ISO/TS-13136 method. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 60, n. 4, p. 315-320, 2015b.

BALIERE, C. et al. Molecular Profiling of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Enteropathogenic *E. coli* Strains Isolated from French Coastal Environments. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 82, n. 13, p. 3913-3927, 2016.

BALLESTEROS, E. R. et al. Microbial quality of oysters and waters from culture and natural banks in Cananeia (SP). **Boletim Do Instituto De Pesca**. São Paulo, v. 42, n. 1, p. 134-144, 2016.

BANERJEE, S. K.; FARBER, J. M. Detection, Enumeration, and Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* from Seafood: Development of a Multidisciplinary Protocol. **Journal of AOAC International**. Rockville, v. 100, n. 2, p. 445-453, 2017.

BARBIERI, E. et al. Microbiological quality of cultivation water used for oysters marketed in Cananéia-SP, Brasil. **O Mundo da Saúde**. São Paulo, v. 36, n. 4, p. 541-547, 2012.

BARBIERI, E. et al. Avaliação dos Impactos ambientais e socioeconômicos da aquicultura na região estuarina-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**. São Paulo, v. 14, n. 3, p. 385-398, 2014.

BARCLAY, L. et al. Infection control for norovirus. **Clinical Microbiology and Infection**. Amsterdam, v. 20, n. 8, p. 731-40, 2014.

BARRETO, N. E.; DE SOUSA, O. V.; DOS FERNANDES VIEIRA, R. H. S. Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. Fortaleza, v. 2, n. 2, p. 18-31, 2008.

BARROS, D.; BARBIERI, E. Análise da ocorrência de metais: Ni, Zn, Cu, Pb e Cd em ostras (*Crassostrea brasiliana*) e sedimentos coletados no Estuário de Cananeia-SP (Brasil). **O Mundo Saúde**. São Paulo, v. 36, n. 4, p. 635-642, 2012.

- BARROS, L. M. O. et al. Fecal contaminant of the oyster *Crassostrea rhizophorae* commercialized at Praia do Futuro, Fortaleza, Ceará State. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza, v. 36, n. 3, p. 285-289, 2005.
- BEHIRY, I. K. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children in Cairo, Egypt. **The Scientific World Journal**. New York, v. 11, p. 2613-2619, 2011.
- BELLOU, M.; KOKKINOS, P.; VANTARAKIS, A. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 5, n. 1, p. 13-23, 2013.
- BENNANI, M. et al. First Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Shellfish and Coastal Environments of Morocco. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Clifton, v. 165, n. 1, p. 290-299, 2011.
- BERALDO, L. G. et al. Detection of Shiga toxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 170, n. 1-2, p. 162-166, 2014.
- BERNARD, H. et al. Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. **Eurosurveillance**. Saint-Maurice, v. 19, n. 8, p. 13-21, 2014.
- BHATT, S. et al. The tip of the iceberg: on the roles of regulatory small RNAs in the virulence of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Lausanne, v. 6, p. 1-6, 2016.
- BIGORAJ, E. et al. Occurrence of Norovirus and Hepatitis A Virus in Wild Mussels Collected from the Baltic Sea. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 6, n. 3, p. 207-212, 2014.
- BORGES, C. A. et al. Shiga toxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in the feces and carcasses of slaughtered pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**. Larchmont, v. 9, n. 12, p. 1119-1125, 2012.
- BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. **International Microbiology**. Barcelona, v. 1, n. 3, p. 191-196, 1998.
- BOSCH, A. et al. Should shellfish be purified before public consumption?. **The Lancet**. Amsterdam, v. 344, n. 8928, p. 1024-1025, 1994.
- BOSCH, A. et al. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. **Current Opinion in Biotechnology**. London, v. 19, n. 3, p. 295-301, 2008.

BOSCH, A.; PINTÓ, R. M.; GUIX, S. Human astroviruses. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 27, n. 4, p. 1048-1074, 2014.

BOSCH, M. D. et al. Year-round shellfish exploitation in the Levant and implications for Upper Palaeolithic hunter-gatherer subsistence. **Journal of Archaeological Science: Reports**. Amsterdam, *In Press*, 2017.

BOXMAN, I. L. A. et al. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 108, n. 3, p. 391-396, 2006.

BOZKURT, H.; D'SOUZA, D. H.; DAVIDSON, P. M. Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 78, n. 8, p. 1597-1617, 2015.

BRAKE, F. et al. A survey of Australian oysters for the presence of human noroviruses. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 44, p. 264-270, 2014.

BRANDAO, R. P.; BOEHS, G.; DA SILVA, P. M. Health assessment of the oyster *Crassostrea rhizophorae* on the southern coast of Bahia, northeastern Brazil. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria**. Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 84-91, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001**.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução N° 357, de 17 de março de 2005**.

BRASIL. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**. p. 1-60, 2011.

BRUGGINK, L. D.; CATTON, M. G.; MARSHALL, J. A. Evaluation of the Bioline Standard Diagnostics SD immunochromatographic norovirus detection kit using fecal specimens from Australian gastroenteritis incidents. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. New York, v. 76, n. 2, p. 147-152, 2013.

BRUGGINK, L. D. et al. Evaluation of the RIDA(®)QUICK immunochromatographic norovirus detection assay using specimens from Australian gastroenteritis incidents. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 173, n. 1, p. 121-126, 2011.

BUTOT, S. et al. Evaluation of various real-time RT-PCR assays for the detection and quantitation of human norovirus. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 90-94, 2010.

CADDY, S. L.; GOODFELLOW, I. Complete genome sequence of canine astrovirus with molecular and epidemiological characterisation of UK strains. **Veterinary Microbiology**. Amsterdam, v. 177, n. 1-2, p. 206-213, 2015.

CAMPANELLA, J. J.; BITINCKA, L.; SMALLEY, J. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. **BMC Bioinformatics**. London, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2003.

CAMPOS, C. J. et al. Trends in the levels of *Escherichia coli* in commercially harvested bivalve shellfish from England and Wales, 1999–2008. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 67, n. 1-2, p. 223-227, 2013.

CAMPOS, C. J. et al. Human norovirus in untreated sewage and effluents from primary, secondary and tertiary treatment processes. **Water Research**. Amsterdam, v. 103, p. 224-232, 2016.

CAMPOS, C. J. A. et al. Fate of Human Noroviruses in Shellfish and Water Impacted by Frequent Sewage Pollution Events. **Environmental Science & Technology**. Washington, v. 49, n. 14, p. 8377-8385, 2015.

CAMPOS, C.J. et al. Risk factors for norovirus contamination of shellfish water catchments in England and Wales. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 241, p. 318-324, 2017a.

CAMPOS, C.J. Risk factors for norovirus contamination of shellfish water catchments in England and Wales. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 241, p. 318-324, 2017b.

CARDEMIL, C. V.; PARASHAR, U. D.; HALL, A. J. Norovirus Infection in Older Adults Epidemiology, Risk Factors, and Opportunities for Prevention and Control. **Infectious Disease Clinics of North America**. Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 839-870, 2017.

CARLOS, C. et al. Prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from healthy animals and water sources in Brazil. **Journal of Water and Health**. London, v. 9, n. 1, p. 138-142, 2011.

CARLSON-BANNING, K. M.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outwits hosts through sensing small molecules. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 41, p. 83-88, 2018.

CARTER, M. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 98, n. 6, p. 1354-1380, 2005.

CASTILHO, J. G. et al. Genetic diversity of norovirus among children with gastroenteritis in Sao Paulo State, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 44, n. 11, p. 3947-3953, 2006.

CASTRO, R. A. et al. Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. **Brazilian Journal of Microbiology**. Rio de Janeiro, v. 49, n. 1, p. 59-66, 2018.

CAUL, E. O. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part I. The clinical and diagnostic perspective. **Journal of Clinical Pathology**. London, v. 49, n. 11, p. 874, 1996.

CAUL, E. O. Viral gastroenteritis: small round structured viruses, caliciviruses and astroviruses. Part II. The epidemiological perspective. **Journal of Clinical Pathology**. London, v. 49, n. 11, p. 959, 1996.

Centers for Disease Control and Prevention **Gastroenteritis Associated with Consumption of Raw Shellfish-Hawaii**, CDC, 1991a.

Centers for Disease Control and Prevention **Epidemiologic Notes and Reports Paralytic Shellfish Poisoning -- Massachusetts and Alaska**. CDC, 1991b.

Centers for Disease Control and Prevention. **Guideline for the Prevention and Control of Norovirus Gastroenteritis Outbreaks in Healthcare Settings**. CDC, 2011.

Centers for Disease Control and Prevention. **Increase in *Vibrio parahaemolyticus* illnesses associated with consumption of shellfish from several Atlantic coast harvest areas, United States**. CDC, 2013.

Centers for Disease Control and Prevention. **U.S. Trends and Outbreaks**. CDC, 2018.

CEUTA, L. O.; BOEHS, G. Parasites of the mangrove mussel *Mytella guyanensis* (Bivalvia: Mytilidae) in Camamu Bay, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 72, n. 3, p. 421-427, 2012.

CHANDRASEKARAN, R. et al. Geographic isolation of *Escherichia coli* genotypes in sediments and water of the Seven Mile Creek - A constructed riverine watershed. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 538, n. 538, p. 78-85, 2015.

CHAPMAN, P. et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 68, n. 1-2, p. 11-20, 2001.

CHAPRON, C. D.; BALLESTER, N. A.; MARGOLIN, A. B. The detection of astrovirus in sludge biosolids using an integrated cell culture nested PCR technique. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 89, n. 1, p. 11-15, 2000.

CHEN, H. et al. Microbiological analysis and microbiota in oyster: a review. **Invertebrate Survival Journal**. Italy, v. 13, p. 374-388, 2016.

CHUNG, H.; JAYKUS, L.-A.; SOBSEY, M. D. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 62, n. 10, p. 3772-3778, 1996.

CIULLI, S. et al. A preliminary study on a novel sea water disinfection process by a peroxy-acid compound to complement and improve the microbial depuration of clams (*Ruditapes philippinarum*). **Food Control**. Amsterdam, v. 80, p. 226-235, 2017.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**. Austin, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.

CLEMENS, J.D.; BALAKRISH NAIR G.; AHMED, T.; QADRI, F.; HOLMGREN, J. Cholera. **Seminar**. v. 390. p. 1539 – 1549, 2017.

COLAKOGLU, F. A.; SARMASIK, A.; KOSEOGLU, B. Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. **Food control**. Amsterdam, v. 17, n. 8, p. 648-652, 2006.

COLLAÇO, F. L.; SARTOR, S. M.; BARBIERIA, E. Uso do geoprocessamento para definição de áreas para o cultivo de ostras na região estuarina de Cananéia/SP. **Revista de Gestão Costeira Integrada**. São Paulo, v. 15, n. 2, p. 193-207, 2015.

CORDEIRO, D. et al. Qualidade do mexilhão *Perna perna* submetido ao processo combinado de cocção, congelamento e armazenamento. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 25, n. 1, p. 165-179, 2007.

CORMIER, J. et al. Concentration of enteric virus indicator from seawater using granular activated carbon. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 196, p. 212-218, 2014.

CORTES-PENFIELD, N. W. et al. Prospects and challenges in the development of a norovirus vaccine. **Clinical Therapeutics**. Amsterdam, v. 39, n. 8, p. 1537-1549, 2017.

COSTA, R. A. *Escherichia coli* in seafood: a brief overview. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. Irvine, v. 4, n. 03, p. 450-454, 2013.

COURA, F. M. et al. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**. Edinburgh, v. 47, n. 1, p. 3-11, 2015.

COVA, A. W. et al. Parasites in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* cultivated in the estuary of the Graciosa River in Taperoa, Bahia. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria**. Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 21-27, 2015.

CROCI, L. et al. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 252-257, 2007.

CROCI, L. et al. Detection of Norovirus and Feline Calicivirus in spiked molluscs subjected to heat treatments. **Food Control**. Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 17-22, 2012.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**. London, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

D'SOUZA, D. H. Phytocompounds for the control of human enteric viruses. **Current Opinion in Virology**. Amsterdam, v. 4, p. 44-49, 2014.

DA CONCEIÇÃO DORNELLAS, P.; CAMPOS, H. L. Efeitos do crescimento urbano na qualidade das águas do riacho Piauí, Arapiraca-AL. **Revista de Geografia**. Recife, v. 25, n. 2, p. 113-123, 2010.

DA COSTA SOUZA, I. et al. Matching pollution with adaptive changes in mangrove plants by multivariate statistics. A case study, *Rhizophora mangle* from four neotropical mangroves in Brazil. **Chemosphere**. Amsterdam, v. 108, p. 115-124, 2014.

DA SILVA FERREIRAI, M. et al. Contaminação por metais traço em mexilhões *Perna perna* da costa brasileira. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 43, n. 6, p. 1012-1020, 2013.

DA SILVA LUZ, I.; MIAGOSTOVICH, M. P. Norovírus em alimentos. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**. Rio de Janeiro, v. 5, n. 3, p. 100-115, 2017.

DA SILVA POLÓ, T. et al. Human norovirus infection in Latin America. **Journal of Clinical Virology**. Amsterdam, v. 78, p. 111-119, 2016.

DABROWSKI, T. et al. Numerical modelling of blue mussel (*Mytilus edulis*) bacterial contamination. **Journal of Sea Research**. Den Burg, v. 89, p. 52-63, 2014.

DAVID, J.; SALAROLI, R. B.; FONTANETTI, C. S. Fine structure of *Mytella falcata* (Bivalvia) gill filaments. **Micron**. Oxford, v. 39, n. 3, p. 329-336, 2008.

DE BENEDICTIS, P. et al. Astrovirus infections in humans and animals—molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. **Infection, Genetics and Evolution**. Amsterdam, v. 11, n. 7, p. 1529-1544, 2011.

DE GODOY, D. F.; ANDRIOLO, A.; DE FATIMA FILLA, G. The influence of environmental variables on estuarine dolphins (*Sotalia guianensis*) spatial distribution and habitat used in the Estuarine Lagunar Complex of Cananéia, southeastern Brazil. **Ocean & Coastal Management**. Barking, v. 106, p. 68-76, 2015.

DE GRAAF, M.; VILLABRUNA, N.; KOOPMANS, M. P. G. Capturing norovirus transmission. **Current Opinion in Virology**. Amsterdam, v. 22, p. 64-70, 2017.

DE LUCA REBELLO, R. C.; REGUA-MANGIA, A. H. Potential enterovirulence and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 490, p. 19-27, 2014.

DE MENEZES, F. G. et al. An outbreak of norovirus infection in a long-term care facility in Brazil. **Einstein**. São Paulo, v. 4, n. 1, p. 410-413, 2010.

DE MORAES TAVARES, T.; DE PAULA CARDOSO, D. D. D.; DIEDERICHSEN DE BRITO, W. M. Enteric viruses vehiculated by water: microbiological aspects and water quality control. **Revista de Patologia Tropical**. Goiás, v. 34, n. 2, p. 85-104, 2005.

DE OLIVEIRA, F. C.; HANAZAKI, N. Ethnobotany and ecological perspectives on the management and use of plant species for a traditional fishing trap, southern coast of São Paulo, Brazil. **Journal of Environmental Management**. Amsterdam, v. 92, n. 7, p. 1783-1792, 2011.

DE OLIVEIRA SARTORI, A. G.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**. Campinas, v. 19, n. 2, p. 83-93, 2012.

DESSELBERGER, U. Viral gastroenteritis. **Medicine**. Amsterdam, v. 45, n. 11, p. 690-694, 2017.

DI RENZO, L. et al. Food safety and nutritional quality for the prevention of non communicable diseases: the Nutrient, hazard Analysis and Critical Control Point process (NACCP). **Journal of Translational Medicine**. London, v. 13, n. 128, p. 1-13, 2015.

DICAPRIO, E. et al. Epidemiology, prevention, and control of the number one foodborne illness: human norovirus. **Infectious Disease Clinics of North America**. Philadelphia, v. 27, n. 3, p. 651-674, 2013.

DIEGO, A. G. L. et al. Sanitary quality of edible bivalve mollusks in Southeastern Brazil using an UV based depuration system. **Ocean & Coastal Management**. Barking, v. 72, p. 93-100, 2013.

DOI, S. A.; DE OLIVEIRA, A.; BARBIERI, E. Determination of coliforms in the water and soft tissue of oysters extracted in Cananeia, Sao Paulo, Brazil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**. Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 111-118, 2015.

DORE, B. et al. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. **Eurosurveillance**. Saint-Maurice, v. 15, n. 19, p. 12-15, 2010.

DORNELLES, L. P. et al. Purification and characterization of a protease from the visceral mass of *Mytella charruana* and its evaluation to obtain antimicrobial peptides. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 245, p. 1169-1175, 2018.

DOS SANTOS, S. S. et al. Condições sanitárias de ostras produzidas e comercializadas em Taperoá, Bahia e o efeito da depuração na redução da carga microbiana/Sanitary conditions produced oysters and marketed in Taperoá, Bahia and the effect of depuration in reducing microbial load. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**. Aracaju, v. 3, n. 2, p. 49-60, 2016.

DUNBAR, N. L.; BRUGGINK, L. D.; MARSHALL, J. A. Evaluation of the RIDAGENE real-time PCR assay for the detection of GI and GII norovirus. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. New York, v. 79, n. 3, p. 317-321, 2014.

EL NEMR, A. et al. The distribution, contamination and risk assessment of heavy metals in sediment and shellfish from the Red Sea coast, Egypt. **Chemosphere**. Oxford, v. 165, p. 369-380, 2016.

EL-SENOUSY, W. M. et al. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 73, n. 1, p. 164-167, 2007.

ELAMRI, D. et al. Detection of human enteric viruses in shellfish collected in Tunisia. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 43, n. 4, p. 399-404, 2006.

ELMAHDI, S., DASILVA, L.V., PARVEEN, S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. **Food Microbiology**. Amsterdam, v.57, p. 128-134, 2016.

ELVIRA FARFAN-GARCIA, A. et al. Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Revista Chilena De Infectologia**. Santiago, v. 33, n. 4, p. 438-450, 2016.

EREGNO, F. E. et al. Hydrodynamic modelling of recreational water quality using *Escherichia coli* as an indicator of microbial contamination. **Journal of Hydrology**. Amsterdam, v. 561, p. 179-186, 2018.

ETHELBERG, S. et al. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. **Eurosurveill**. Saint-Maurice, v. 15, n. 6, p. 1-3, 2010.

EVANS, K. S. et al. Measuring the impact of pollution closures on commercial shellfish harvest: The case of soft-shell clams in Machias Bay, Maine. **Ocean & Coastal Management**. Barking, v. 130, p. 196-204, 2016.

FAJARDO, P. et al. Bacteria isolated from shellfish digestive gland with antipathogenic activity as candidates to increase the efficiency of shellfish depuration process. **Food Control**. Amsterdam, v. 46, p. 272-281, 2014.

Food Agriculture Organization. **Standard for quick frozen blocks of fish fillet, minced fish flesh and mixtures Of fillets and minced fish flesh**. FAO, 2010.

Food Agriculture Organization **The state of world fisheries and aquaculture 2014 Rome, Italy**. FAO, 2014.

Food Agriculture Organization **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome. FAO, 2018.

Food Agriculture Organization. **Aquaculture Newsletter**. Rome. p. 56: 66 FAO, 2017.

- FARFÁN-GARCÍA, A. E. et al. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. **Revista Chilena de Infectología**. Santiago, v. 33, n. 4, p. 438-450, 2016.
- FARKAS, K. et al. Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. **Science of The Total Environment**. Amsterdam, v. 634, p. 1174-1183, 2018.
- FAUCONNEAU, B. Health value and safety quality of aquaculture products. **Revue De Medecine Veterinaire**. Toulouse, v. 153, n. 5, p. 331-336, 2002.
- FAVERO, J. M. D.; DIAS, J. F. Juvenile fish use of the shallow zone of beaches of the Cananéia-Iguape coastal system, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**. São Paulo, v. 63, n. 2, p. 103-114, 2015.
- Food Drug Administration. **Guide for the control of molluscan shellfish**. FDA, 2013.
- FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**. Amsterdam, v. 2, n. 13, p. 1651-1660, 2000.
- Felice, E.; Mauroy, A.; Pozzo, F.; Thiry, D.; Ceci, C.; Martino, B.; Marsilio, F., Etienne Thiry Bovine noroviruses: A missing component of calf diarrhoea diagnosis. **The Veterinary Journal**. Amsterdam, v. 207, 53–62, 2016.
- FINKBEINER, S. R. et al. Stem Cell-Derived Human Intestinal Organoids as an Infection Model for Rotaviruses. **Mbio**. Washington, v. 3, n. 4, p. 1-6, 2012.
- FLEMING, L. et al. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 53, n. 10-12, p. 545-560, 2006.
- FONTENELLE, T. H.; BAPTISTA NETO, J. A.; DA FONSECA, E. M. Water quality along the Alagoas State Coast, Northeast Brazil: advocacy for the coastal management. **Revista de Gestão Costeira Integrada**. São Paulo, v. 15, n. 4, 2015.
- FORCELINI, H.; KOLM, H. E.; ABSHER, T. M. Total coliforms and *Escherichia coli* in oysters marketed at the municipal market of Guaratuba, Paraná-Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, v. 35, n. 2, p. 275-283, 2009.
- FRANZ, E. et al. Exploiting the explosion of information associated with whole genome sequencing to tackle Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in global food production systems. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 187, p. 57-72, 2014.

FRIEDMANN, H. C. Escherich and Escherichia. **Advances in Applied Microbiology**. New York, v. 60, p. 133-196, 2006.

FUENTES, C. et al. Identification of Human Astrovirus Genome-Linked Protein (VPg) Essential for Virus Infectivity. **Journal of Virology**. London, v. 86, n. 18, p. 10070-10078, 2012.

FUMIAN, T. M. et al. A rapid procedure for detecting noroviruses from cheese and fresh lettuce. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 155, n. 1, p. 39-43, 2009.

FUMIAN, T. M. et al. Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Water and Health**. London, v. 11, n. 1, p. 110-119, 2013.

FURLAN, E. et al. Estabilidade físico-química e mercado do mexilhão (*Perna perna*) cultivado em Ubatuba–SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n. 3, p. 516-523, 2007.

GABRIELI, R. et al. Enteric viruses in molluscan shellfish. **Microbiologica-Quarterly Journal of Microbiological Sciences**. Bologna, v. 30, n. 4, p. 471-476, 2007.

GALLIMORE, C. et al. Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination. **Epidemiology & Infection**. Cambridge, v. 133, n. 1, p. 41-47, 2005.

GALLIMORE, C. I. et al. Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 323-330, 2005.

GALLIMORE, C. I. et al. Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants. **Archives of Virology**. Wien, v. 152, n. 7, p. 1295-303, 2007.

GALVÃO, J. A. **Qualidade microbiológica da água de cultivo e de mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758) comercializados em Ubatuba, SP**. 2004. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

GALVÃO, P. M. A. et al. Bioacumulação de metais pesados em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. Itajaí, v. 13, n. 2, p. 59-66, 2010.

GAYTÁN, M. O. et al. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Lausanne, v. 6, p. 1-25, 2016.

GENG, Y. S. et al. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. **Journal of Hepatology**. Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 37-43, 2016.

GENTRY, J.; VINJE, J.; LIPP, E. K. A rapid and efficient method for quantitation of genogroups I and II norovirus from oysters and application in other complex environmental samples. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 156, n. 1-2, p. 59-65, 2009.

GENTRY, J. et al. Norovirus distribution within an estuarine environment. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 75, n. 17, p. 5474-5480, 2009.

GENTRY-SHIELDS, J.; JAYKUS, L. A. Comparison of process control viruses for use in extraction and detection of human norovirus from food matrices. **Food Research International**. Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 320-325, 2015.

GIBOTTI, A. et al. Molecular characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* ipa genes by PCR-RFLP analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**. Rio de Janeiro, v. 35, n. 1-2, p. 74-80, 2004.

GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**. Rio de Janeiro, v. 47, p. 3-30, 2016.

GOMEZ-ALDAPA, C. A. et al. Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E-coli* and enterotoxigenic *E-coli* on coriander. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 59, p. 97-103, 2016.

GONZALEZ, M. et al. Enumeration of Mesophilics Aerobics, Faecal Coliforms and *Clostridium perfringens* in the Oyster *Crassostrea rhizophorae* from Laguna Grande del Obispo, Sucre State, Venezuela. **Revista Científica-Facultad De Ciencias Veterinarias**. Maracaibo, v. 21, n. 1, p. 80-87, 2011.

GOURMELON, M. et al. First isolation of Shiga toxin 1d producing *Escherichia coli* variant strains in shellfish from coastal areas in France. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 100, n. 1, p. 85-97, 2006.

GRAYMORE, M. L. M.; SIPE, N. G.; RICKSON, R. E. Sustaining Human Carrying Capacity: A tool for regional sustainability assessment. **Ecological Economics**. Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 459-468, 2010.

GREEN, D. H.; LEWIS, G. D. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture. **Water Research**. Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 1195-1200, 1999.

GROVE, S. F. et al. Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 69, n. 4, p. 957-968, 2006.

GUIMARAES, F. R. et al. Molecular detection of human astrovirus in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 103, n. 8, p. 819-823, 2008.

GUIX, S. et al. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 40, n. 1, p. 133-139, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. Oxford, n. 41, p. 95-98, 1999.

HAMELIN, K. et al. A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from Great Lakes recreational waters. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 72, n. 6, p. 4200-4206, 2006.

HANSMAN, G. S. et al. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 71, n. 8, p. 1689-1695, 2008.

HARAMOTO, E. et al. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. **Water Research**. Amsterdam, v. 135, p. 168-186, 2018.

HARRIS, J.; LOPMAN, B.; O'BRIEN, S. Infection control measures for norovirus: a systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings. **Journal of Hospital Infection**. Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 1-9, 2010.

HARRIS, K. J. et al. The antecedents and outcomes of food safety motivators for restaurant workers: An expectancy framework. **International Journal of Hospitality Management**. Oxford, v. 63, p. 53-62, 2017.

HARVALA, H. et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. **Journal of Clinical Virology**. Amstendar, v. 101 p.11–17, 2018.

HELLMER, M. et al. Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 80, n. 21, p. 6771-6781, 2014.

HERNANDEZ-MORGA, J. et al. Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration–RT-PCR integrated methods. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 106, n. 5, p. 1579-1590, 2009.

HERNROTH, B. E.; BADEN, S. P. Alteration of host-pathogen interactions in the wake of climate change - Increasing risk for shellfish associated infections?. **Environmental Research**. Amsterdam, v. 161, p. 425-438, 2018.

HEWITT, J. et al. Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. **Water Research**. Amsterdam, v. 47, n. 17, p. 6750-6761, 2013.

HILLS, D. M.; BULL, J. J. An empirical test of boot strapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology**. Oxford, v. 42, p. 10, 1993.

HODGSON, K. R.; TOROK, V. A.; TURNBULL, A. R. Bacteriophages as enteric viral indicators in bivalve mollusc management. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 65, p. 284-293, 2017.

HORM, K. M.; D'SOUZA, D. H. Survival of human norovirus surrogates in milk, orange, and pomegranate juice, and juice blends at refrigeration (4 degrees C). **Food Microbiology**. Cambridge, v. 28, n. 5, p. 1054-1061, 2011.

HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clinical Microbiology and Infection**. Amsterdam, v. 21, n. 8, p. 729-734, 2015.

HUSMAN, A. M. D. R. et al. Rapid virus detection procedure for molecular tracing of shellfish associated with disease outbreaks. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 70, n. 4, p. 967-974, 2007.

HYUN, J.; KIM, H. S.; LEE, K. M. Evaluation of a new real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of norovirus in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 40-44, 2014.

IBGE. **Atlas geográfico das zonas costeiras e oceânicas do Brasil / IBGE, Diretoria de Geociências**. - Rio de Janeiro 2011.

IBRAHIM, C. et al. Detection of Aichi virus genotype B in two lines of wastewater treatment processes. **Microbial Pathogenesis**. Amsterdam, v. 109, p. 305-312, 2017.

IKIZ, S. et al. Investigation of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in Seafood by Cultural Methods and PCR. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**. Kars, v. 22, n. 3, p. 397-401, 2016.

IRITANI, N. et al. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. **Journal of Medical Virology**. New York, v. 86, n. 12, p. 2019-2025, 2014.

ISIDEAN, S. D. et al. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine**. Amsterdam, v. 29, n. 37, p. 6167-6178, 26 2011.

JACOBSEN, S. et al. Co-circulation of classic and novel astrovirus strains in patients with acute gastroenteritis in Germany. **Journal of Infection**. Amsterdam, v. 76, p. 457-464, 2018.

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. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 62, n. 6, p. 2074-2080, 1996.

JEONG, H. S.; JEONG, A.; CHEON, D.-S. Epidemiology of astrovirus infection in children. **Korean Journal of Pediatrics**. Söul, v. 55, n. 3, p. 77-82, 2012.

JUSTINO, J. D. F. **Avaliação de coliformes e vírus entéricos na água e no mexilhão (*Mytella guyanensis*) em área de manguezal da Baía de Vitória (ES)**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado). Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2009.

KANG, W.; CANNON, J. L. A membrane-based electro-separation method (MBES) for sample clean-up and norovirus concentration. **PloS one**. San Francisco, v. 10, n. 10, p. 1-22, 2015.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. London, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KAPIKIAN, A. Z. et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. **Journal of Virology**. London, v. 10, n. 5, p. 1075-1081, 1972.

KARAMOKO, Y. et al. Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region) by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 135-137, 2005.

KARST, S. M. et al. Advances in Norovirus Biology. **Cell Host Microbe**. Cambridge, v. 15, n. 6, p. 668-680, 2014.

KATAYAMA, H. et al. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. **Water Research**. Amsterdam, v. 42, n. 6-7, p. 1441-1448, 2008.

KAUFMAN, S. S.; GREEN, K. Y.; KORBA, B. E. Treatment of norovirus infections: moving antivirals from the bench to the bedside. **Antiviral Research**. Amsterdam, v. 105, p. 80-91, 2014.

KELLER, R.; JUSTINO, J. F.; CASSINI, S. T. Assessment of water and seafood microbiology quality in a mangrove region in Vitoria, Brazil. **Journal of Water and Health**. London, v. 11, n. 3, p. 573-580, 2013.

KITTIGUL, L. et al. A comparison of virus concentration methods for molecular detection and characterization of rotavirus in bivalve shellfish species. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 46, p. 161-167, 2015.

KITTIGUL, L. et al. Prevalence and molecular genotyping of noroviruses in market oysters, mussels, and cockles in Bangkok, Thailand. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 8, n. 2, p. 133-140, 2016.

KONG, H.; HONG, X.; LI, X. Current perspectives in pathogenesis and antimicrobial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**. Amsterdam, v. 85, p. 44-49, 2015.

KONG, R. et al. A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of enterotoxigenic (ETEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) strains of *Escherichia coli*. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 38, n. 12, p. 1207-1215, 1999.

KOO, H. L. et al. Noroviruses: the principal cause of foodborne disease worldwide. **Discovery Medicine**. Timonium, v. 10, n. 50, p. 61-70, 2010.

KOTLOFF, K. L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**. Amsterdam, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

KRISHNAN, T. Novel human astroviruses: challenges for developing countries. **Virus Disease**. London, v. 25, n. 2, p. 208-214, 2014.

KURODA, K. et al. Pepper mild mottle virus as an indicator and a tracer of fecal pollution in water environments: Comparative evaluation with wastewater-tracer pharmaceuticals in Hanoi, Vietnam. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 506, p. 287-298, 2015.

KURTZ, J.; LEE, T. Astroviruses: human and animal. **Novel Diarrhoea Viruses**. Chichester, p. 92-107, 1987.

LA ROSA, G. et al. GIV noroviruses and other enteric viruses in bivalves: a preliminary study. **The New Microbiologica**. Pavia, v. 35, n. 1, p. 27-34, 2012.

LALITHA, K.; GOPAKUMAR, K. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in fish (*Mugil cephalus*) and shrimp (*Penaeus indicus*) tissue homogenates stored under vacuum. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 18, n. 6, p. 651-657, 2001.

LASCOWSKI, K. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of north Paraná State, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 114, n. 4, p. 1230-1239, 2013.

LATIF-EUGENIN, F.; BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 121, n. 3, p. 883-891, 2016.

LE CANN, P. et al. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. **Research in Microbiology**. Amsterdam, v. 155, n. 1, p. 11-15, 2004.

LE GUYADER, F. et al. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 66, n. 8, p. 3241-3248, 2000.

LE GUYADER, F. et al. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 62, n. 11, p. 4268-4272, 1996.

LE GUYADER, F. S.; ATMAR, R. L.; LE PENDU, J. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. **Current Opinion in Virology**. Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 103-110, 2012.

LE GUYADER, F. S. et al. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 44, n. 11, p. 3878-3882, 2006.

- LE GUYADER, F. S. et al. Comprehensive Analysis of a Norovirus-Associated Gastroenteritis Outbreak, from the Environment to the Consumer. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 48, n. 3, p. 915-920, 2010.
- LE GUYADER, F. S. et al. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 46, n. 12, p. 4011-4017, 2008.
- LE GUYADER, F. S. et al. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 179-186, 2004.
- LE GUYADER, F. S. et al. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 87, n. 1-2, p. 107-112, 2003.
- LE GUYADER, F. S. et al. Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 75, n. 3, p. 618-624, 2009.
- LE SAUX, J. C. et al. Evidence of the presence of viral contamination in shellfish after short rainfall events. **Journal of Shellfish Research**. Washington, 2009.
- LEAL, D. A. G. et al. Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. **Water Research**. Amsterdam, v. 137, p. 273-280, 2018.
- LEES, D. Viruses and bivalve shellfish. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 59, n. 1-2, p. 81-116, 2000.
- LEUVEN, J. et al. Tidal sand bar dimensions and shapes in estuaries. **Earth-Science Reviews**. Amsterdam, v. 161, p. 204-223, 2016.
- LIAO, Q. et al. Genetic characterization of a novel astrovirus in Pekin ducks. **Infection, Genetics and Evolution**. Amsterdam, v. 32, p. 60-67, 2015.
- LIZASOAIN, A. et al. Environmental assessment reveals the presence of MLB-1 human astrovirus in Uruguay. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 119, n. 3, p. 859-867, 2015.
- LODDER-VERSCHOOR, F. et al. Year-round screening of noncommercial and commercial oysters for the presence of human pathogenic viruses. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 68, n. 9, p. 1853-1859, 2005.

LONSDALE, J. et al. A user's guide to coping with estuarine management bureaucracy: An Estuarine Planning Support System (EPSS) tool. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 127, p. 463-477, 2018.

LOPMAN, B. et al. Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. **Current Opinion in Virology**. Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 96-102, 2012.

LOPMAN, B. et al. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. **The Lancet**. Amsterdam, v. 363, n. 9410, p. 682-688, 2004.

LOUTREUL, J. et al. Prevalence of human noroviruses in frozen marketed shellfish, red fruits and fresh vegetables. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 6, n. 3, p. 157-168, 2014.

LOVE, D. C. et al. Methods for recovery of hepatitis A virus (HAV) and other viruses from processed foods and detection of HAV by nested RT-PCR and TaqMan RT-PCR. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 221-226, 2008.

LOVE, D. C.; LOVELACE, G. L.; SOBSEY, M. D. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 211-217, 2010.

LOWTHER, J. et al. Validation of ISO method 15216 part 1—Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, *In press*, 2017.

LOWTHER, J. A.; HENSHILWOOD, K.; LEES, D. N. Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. **Journal of Food Protection**. Ames, v. 71, n. 7, p. 1427-1433, 2008.

LUCERO, Y.; VIDAL, R. Norovirus vaccines under development. **Vaccine**. Amsterdam, 2017.

LUNESTAD, B. T. et al. An outbreak of norovirus infection from shellfish soup due to unforeseen insufficient heating during preparation. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 8, n. 4, p. 231-234, 2016.

LUZ, M. D. S. A.; BOEHS, G. Parasites in the oyster *Crassostrea rhizophorae* from farmed and natural stocks in the Bay of Camamu, Bahia, northeastern Brazil. **Journal of Parasitology and Vector Biology**. Bangalore, v. 7, n. 6, p. 120-128, 2015.

LUZ VILARINO, M. et al. Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. **International Microbiology**. Barcelona, v. 12, n. 3, p. 145-151, 2009.

MACHADO, I.; FAGUNDES, L.; HENRIQUES, M. Diagnóstico da comercialização da ostra de mangue pelos extrativistas de Cananéia, Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**. São Paulo, v. 43, n. 5, p. 41-52, 2013.

MACHADO, I. C. et al. A integração da pesquisa ao conhecimento ecológico local no subsídio ao manejo: variações no estoque natural da ostra de mangue *Crassostrea* spp. na reserva extrativista do Mandira, Cananéia-SP, Brasil. **Ambiente & Sociedade**. São Paulo, v. 14, n. 1, p. 1-22, 2011.

MAIOLI, O. L. G. et al. Polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons in *Mytella charruana*, a bivalve mollusk from Mundau Lagoon, Brazil. **Microchemical Journal**. Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 172-179, 2010.

MAKARY, P. et al. Multiple norovirus outbreaks among workplace canteen users in Finland, July 2006. **Epidemiology & Infection**. Cambridge, v. 137, n. 3, p. 402-407, 2009.

MANNA, S. K.; DAS, R.; MANNA, C. Microbiological quality of finfish and shellfish with special reference to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. **Journal of Food Science**. New Jersey, v. 73, n. 6, p. M283-M286, 2008.

MARKS, P. et al. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. **Epidemiology & Infection**. Cambridge, v. 131, n. 1, p. 727-736, 2003.

MARQUES, J. A. et al. Antioxidant defense responses in *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) exposed to an experimental diesel oil spill in Paranagua Bay (Parana, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Amsterdam, v. 107, p. 269-275, 2014.

MARTELLA, V. et al. Enteric disease in dogs naturally infected by a novel canine astrovirus. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 50, n. 3, p. 1066-1069, 2012.

MARTINEZ, D. I.; OLIVEIRA, A. J. F. C. D. Faecal bacteria in *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia) for biomonitoring coastal waters and seafood quality. **Brazilian Journal of Oceanography**. São Paulo, v. 58, n. SPE3, p. 29-35, 2010.

MARTÍNEZ, R. E. N.; VILLALOBOS, L. B. D. B. *Escherichia coli* enteropatógena en moluscos crudos y cocidos. **Revista Científica**. Caracas, v. 15, p. 163-167, 2005.

MENDENHALL, I. H. et al. Influence of age and body condition on astrovirus infection of bats in Singapore: An evolutionary and epidemiological analysis. **One Health**. Amsterdam, v. 4, p. 27-33, 2017.

MENDONÇA, J. T.; KATSURAGAWA, M. Caracterização da pesca artesanal no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape, Estado de São Paulo, Brasil (1995-1996). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá, v. 23, p. 535-547, 2001.

MESQUITA, J. R. et al. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 28, n. 5, p. 936-941, 2011.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of manaus, Central Amazonia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 74, n. 2, p. 375-382, 2008.

MIGNANI, L. **Determinação da concentração de coliformes totais e termotolerantes e de variáveis ambientais na água de cultivo da ostra *Ccrassostrea* sp. em Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil**. 2008. 64 F. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesca – APTA - SAA, São Paulo, 2008.

MIGNANI, L. et al. Coliform density in oyster culture waters and its relationship with environmental factors. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. Brasília, v. 48, n. 8, p. 833-840, 2013.

MILL, A.; SCHLACHER, T.; KATOULI, M. Tidal and longitudinal variation of faecal indicator bacteria in an estuarine creek in south-east Queensland, Australia. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 52, n. 8, p. 881-891, 2006.

MINAGAWA, Y. C. **Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpes de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios**. 2017. 108 f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

MING, H. X. et al. Prevalence of human enteric viruses and a potential indicator of contamination in shellfish in China. **Journal of Food Safety**. London, v. 33, n. 2, p. 209-214, 2013.

MIOTTO, L. A. Coliformes termotolerantes e enterococcus SP em ostras e águas salinas utilizadas para cultivo de moluscos bivalves da Baía Sul da Ilha de Santa Catarina-Brasil. 2009.

MIRHOSEINI, A.; AMANI, J.; NAZARIAN, S. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. **Microbial Pathogenesis**. Amsterdam, v. 118, p. 162-169, 2018.

MITTELSTAEDT, S.; CARVALHO, V. M. D. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) 0157: H7 - Revisão. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**. São Paulo, p. 24: 175-182, 2006

MIYASHITA, L. K.; CALLIARI, D. Species-specific and combined feeding rates and selectivity of dominant mysids from a subtropical estuary, Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. Amsterdam, v. 459, p. 160-168, 2014.

MOK, J. S. et al. Bacteriological quality evaluation of seawater and oysters from the Jaranman-Saryangdo area, a designated shellfish growing area in Korea: impact of inland pollution sources. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 108, n. 1-2, p. 147-154, 2016.

MOORE, J. E. et al. Phenotypic and genotypic characterization of urease-positive thermophilic Campylobacters (UPTC) isolated from shellfish. **International Journal of Food Science and Technology**. Oxford, v. 38, n. 6, p. 735-739, 2003.

MORAES, D. S. D. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 36, p. 370-374, 2002.

MORESCO, V. et al. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 64, n. 1, p. 40-48, 2012.

MORILLO, S. G. et al. Identification and molecular characterization of norovirus in Aao Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 619-622, 2008.

MORILLO, S. G.; TIMENETSKY, M. D. C. S. T. Norovírus: uma visão geral. **Revista da Associação Médica Brasileira**. São Paulo, v. 57, n. 4, p. 462-467, 2011.

MOURA, J. F. D. et al. The interface of public healthcare with the health of the oceans: proliferation of disease, socio-economic impacts and beneficial relationships. **Ciencia & Saude Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 16, n. 8, p. 3469-3480, 2011.

MULUGETA, S. et al. Contamination level and location of recreational freshwater influence the ability to predict *Escherichia coli* concentration by qPCR targeting Bacteroides. **Journal of Environmental Management**. Amsterdam, v. 103, p. 95-101, 2012.

- NAIFAR, I. et al. Spatial distribution and contamination assessment of heavy metals in marine sediments of the southern coast of Sfax, Gabes Gulf, Tunisia. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 131, p. 53-62, 2018.
- NAKAGAWA-OKAMOTO, R. et al. Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. Tokyo, v. 62, n. 1, p. 63-66, 2009.
- NASCIMENTO, V. A. et al. Qualidade Microbiológica de Moluscos Bivalves-Sururu e Ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. **Scientia Plena**. Sergipe, v. 7, n. 4, 2011.
- NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia-coli* to hep-2 cells. **Pediatric Infectious Disease Journal**. Amsterdam, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.
- NENONEN, N. P. et al. Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. **Journal of Clinical Virology**. Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 105-108, 2009.
- NG, T. L. et al. Oyster-associated outbreaks of Norovirus gastroenteritis in Singapore. **Journal of Infection**. Amsterdam, v. 51, n. 5, p. 413-418, 2005.
- NISHIDA, T. et al. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. **Microbiology and Immunology**. London, v. 51, n. 2, p. 177-184, 2007.
- NISHIGIMA, F. N.; WEBER, R. R.; BICEGO, M. C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of Santos and Cananeia, SP, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 42, n. 11, p. 1064-1072, 2001.
- NUÑEZ, L. et al. Detection and molecular characterization of chicken astrovirus associated with chicks that have an unusual condition known as “white chicks” in Brazil. **Poultry Science**. Oxford, v. 95, n. 6, p. 1262-1270, 2016.
- OCHOA, T. J. et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Oxford, v. 102, n. 9, p. 852-856, 2008.
- OLIVEIRA, J. et al. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. **Food Control**. Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 805-816, 2011.

OLIVEIRA, S. Vulnerabilidade ambiental da planície costeira de Caravelas (BA) como subsídio ao ordenamento ambiental. **Sociedade & Natureza**. Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 147-160, 2016.

Oliveira W.F., Silva P.M.S., Silva R.C.S., Silva G.M.M., Machado G., Coelho L.C.B.B., Correia. M.T.S. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants. **Journal of Hospital Infection**. England, v. 98, p. 111-117, 2018.

OLUWAYELU, D. O.; SMYTH, V.; TODD, D. Detection of avian nephritis virus and chicken astrovirus in Nigerian indigenous chickens. **African Journal of Biotechnology**. Nairobi, v. 11, n. 17, p. 3949-3957, 2012.

ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Ribeirão Preto, v. 39, n. 4, p. 507-517, 2006.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.; SOTO, D. Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil. **Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais**. 2007.

OTERO, X. L. et al. Spatial variation in pore water geochemistry in a mangrove system (Pai Matos island, Cananeia-Brazil). **Applied Geochemistry**. Oxford, v. 21, n. 12, p. 2171-2186, 2006.

OUÉDRAOGO, N. et al. Prevalence and genetic diversity of enteric viruses in children with diarrhea in Ouagadougou, Burkina Faso. **PloS One**. San Francisco, v. 11, n. 4, p. 1-22, 2016.

OWEN, M.; WILLIS, C.; LAMPH, D. Evaluation of the TEMPO (R) most probable number technique for the enumeration of Enterobacteriaceae in food and dairy products. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 109, n. 5, p. 1810-1816, 2010.

PADOVAN, A. et al. Multiple approaches to assess the safety of artisanal marine food in a tropical estuary. **Environmental Monitoring and Assessment**. Dordrecht, v. 189, n. 3, p. 1-15, 2017.

PALMEIRA, K. R. et al. O sururu como produto de subsistência e renda da população ribeirinha, brasil-revisão de literatura. **Semioses**. Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 49-61, 2016.

PANKOVICS, P. et al. Detection of a mammalian-like astrovirus in bird, European roller (*Coracias garrulus*). **Infection, Genetics and Evolution**. Amsterdam, v. 34, p. 114-121, 2015.

PARISENTI, J.; TRAMONTE, V. L. C. G.; ARELLANO, D. B. Composição de esteróis e ácidos graxos de ostras (*Crassostrea gigas*) cultivadas em Florianópolis - SC, em duas estações do ano. **Food Science and Technology**. Campinas, v. 30, p. 73-76, 2010.

PARK, S. Y. et al. Ultraviolet-C efficacy against a norovirus surrogate and hepatitis A virus on a stainless steel surface. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 211, p. 73-78, 2015.

PARVEEN, S. et al. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 354-361, 2008.

PAZ, V. P. D. S.; TEODORO, R. E. F.; MENDONÇA, F. C. Water resources, irrigated agriculture and the environment. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v. 4, n. 3, p. 465-473, 2000.

PERCIVAL, S. **Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks**. 2014. 696 f. Academic Press.

PEREIRA, M. A. et al. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis-Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 159-163, 2006.

PEREIRA, O. M.; GRAÇA-LOPES, R. D. *Fixação de sementes de Mytella falcata (sururu)* em coletores artificiais no Canal de Bertioga, Estuário de Santos, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, v. 22, p. 165-173, 1995.

PEREIRA, O. M. et al. Estimativa da produção de *Mytella falcata* e de *M. guyanensis* em bancos naturais do estuário de Ilha Comprida-Sp-Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, v. 29, p. 139-149, 2003.

PETRIGNANI, M. et al. Norovirus introduction routes into nursing homes and risk factors for spread: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of Hospital Infection**. Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 163-178, 2015.

PINTO, R. M. et al. Astrovirus detection in wastewater samples. **Water Science and Technology**. London, v. 43, n. 12, p. 73-76, 2001.

Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves (PNCMB). **Manual do MPA para o Programa Nacional de Controle Higiênico-Sanitário de Moluscos Bivalves**. 2013.

- PODEWILS, L. et al. Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. **Epidemiology & Infection**. Cambridge, v. 135, n. 5, p. 827-833, 2007.
- POLO, D. et al. Viral elimination during commercial depuration of shellfish. **Food Control**. Amsterdam, v. 43, p. 206-212, 2014a.
- POLO, D. et al. Depuration kinetics of hepatitis A virus in clams. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 39, p. 103-107, 2014b.
- POLO, D.; VARELA, M. F.; ROMALDE, J. L. Detection and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 193, p. 43-50, 2015.
- POLO, D. et al. Imported mollusks and dissemination of human enteric viruses. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v. 16, n. 6, p. 1036-1037, 2010.
- POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: A worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**. Oxford, v. 35, n. 8, p. 921-928, 2002.
- PRADO, T. et al. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Research**. Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 1287-1297, 2011.
- PREDMORE, A. et al. Electron beam inactivation of Tulane virus on fresh produce, and mechanism of inactivation of human norovirus surrogates by electron beam irradiation. **International Journal Food Microbiology**. Amsterdam, v. 198, p. 28-36, 2015.
- PREVOST, B. et al. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. **Environment International**. Amsterdam, v. 79, p. 42-50, 2015.
- PUSCH, D. et al. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. **Archives of Virology**. Wien, v. 150, n. 5, p. 929-947, 2005.
- Puzari, M.; Sharma, M.; Chetia, P. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. **Journal of Infection and Public Health**. Amsterdam, v.11, p. 451–454, 2018.
- RAGUPATHI, N. D. et al. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies. **New Microbes and New Infections**. New Jersey, v. 21, p. 58-62, 2018.

RAMOS, R. J. **Monitoramento bacteriológico de águas do mar e de ostras (*Crassostrea gigas*) em áreas de cultivo na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina.** 2007. 117 f.

Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciencias Agrarias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

RAMOS, R. J. et al. Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz.** São Paulo, v. 69, n. 1, p. 29-37, 2010.

RANDAZZO, W. et al. Optimization of PMAxx pretreatment to distinguish between human norovirus with intact and altered capsids in shellfish and sewage samples. **International Journal of Food Microbiology.** Amsterdam, v. 266, p. 1-7, 2018.

REES, G. **Safe management of shellfish and harvest waters.** World Health Organization, 2010.

REGUA-MANGIA, A. H. et al. *Escherichia coli* enteroagregativa (eaeC): filotipagem e resistência a antimicrobianos em um enteropatógeno emergente. **Revista de Patologia Tropical.** Goiás, v. 38, n. 1, p. 27-34, 2009.

RIBEIRO, E. B. et al. Integrated assessment of biomarker responses and microbiological analysis of oysters from Sao Luis Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin.** London, v. 113, n. 1-2, p. 182-186, 2016.

RICHARDS, G. P. et al. Rapid methods for extraction and concentration of poliovirus from oyster tissues. **Journal of Virological Methods.** Amsterdam, v. 5, n. 5-6, p. 285-291, 1982.

RICHARDS, G. P.; MCLEOD, C.; LE GUYADER, F. S. Processing strategies to inactivate enteric viruses in shellfish. **Food and Environmental Virology.** New York, v. 2, n. 3, p. 183-193, 2010.

RIGOTTO, C. et al. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). **Water Research.** Amsterdam, v. 39, n. 2-3, p. 297-304, 2005.

RISTORI, C. A. et al. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International Journal of Environmental Health Research.** London, v. 17, n. 4, p. 259-269, 2007.

RITTENSCHOBBER, D.; NOWAK, V.; CHARRONDIERE, U. R. Review of availability of food composition data for fish and shellfish. **Food Chemistry**. Amsterdam, v. 141, n. 4, p. 4303-4310, 2013.

ROCHA, C. M. C. D. et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 48, n. 8, p. 4-6, 2013.

ROCHA, D. C. D. C. et al. Caracterização molecular de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica em animais silvestres capturados na Região Amazônica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. Pará, v. 8, n. 1, p. 9-16, 2017.

ROCHA-PEREIRA, J.; VAN DYCKE, J.; NEYTS, J. Norovirus genetic diversity and evolution: implications for antiviral therapy. **Current Opinion in Virology**. Amsterdam, v. 20, p. 92-98, 2016.

ROCOURT, J. R. et al. The present state of foodborne disease in OECD countries. 2003.

RODRIGUEZ-DIAZ, J. et al. Detection and Characterization of Waterborne Gastroenteritis Viruses in Urban Sewage and Sewage-Polluted River Waters in Caracas, Venezuela. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 75, n. 2, p. 387-394, 2009.

ROMALDE, J. L. et al. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 74, n. 1-2, p. 119-130, 2002.

ROSA, J. L. R. L.; BARROS, R. F. B. F.; DE OLIVEIRA, M. D. O. S. Características da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). **Revista Saude & Ciencia**. Campina Grande, v. 2, n. 1, p. 66-78, 2016.

ROTH, A. N.; KARST, S. M. Norovirus mechanisms of immune antagonism. **Current Opinion in Virology**. Amsterdam, v. 16, p. 24-30, 2016.

RUPP, G. S.; DE OLIVEIRA NETO, F. M.; GUZENSKI, J. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en la región sudeste-sur de Brasil. **FAO Actas de Pesca y Acuicultura**. Roma, n. 12, p. 77-89, 2008.

RUTJES, S. A. et al. Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 71, n. 7, p. 3734-3740, 2005.

SAITO, R. et al. A model of recent sedimentation in the Cananeia–Iguape estuary, Brazil. **Radioactivity in the Environment**. Amsterdam, v. 8, p. 419-430, 2006.

SALAS-MASSO, N. et al. Do the *Escherichia coli* European Union shellfish safety standards predict the presence of *Arcobacter* spp., a potential zoonotic pathogen?. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 624, p. 1171-1179, 2018.

SANATH KUMAR, H.; OTTA, S.; KARUNASAGAR, I. Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 334-338, 2001.

SANDE, D. et al. Bivalve molluscs prospection in pollution study from Cachoeira and Santana rivers in Ilheus, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 47, n. 3, p. 190-196, 2010.

SANTOS, T. M. M. et al. Avaliação microbiológica e da concentração de vitamina A, ferro e zinco em preparações do molusco sururu (*Mytella falcata*). **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**. Rio de Janeiro, v. 9, n. 3, p. 811-822, 2014.

SAPKOTA, A. et al. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. **Environment International**. Amsterdam, v. 34, n. 8, p. 1215-26, 2008.

SAPONE, A. et al. Perturbation of xenobiotic metabolism in *Dreissena polymorpha* model exposed in situ to surface water (Lake Trasimene) purified with various disinfectants. **Chemosphere**. Amsterdam, v. 144, p. 548-554, 2016.

SARVIKIVI, E. et al. Multiple norovirus outbreaks linked to imported frozen raspberries. **Epidemiology and Infection**. Cambridge, v. 140, n. 2, p. 260-267, 2012.

SAUVE, S. et al. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). **Aquatic Toxicology**. Amsterdam, v. 58, n. 3-4, p. 189-200, 2002.

SAXENA, T.; KAUSHIK, P.; MOHAN, M. K. Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 249-264, 2015.

SCARDUA, M. P. et al. Growth, mortality and susceptibility of oyster *Crassostrea* spp. to *Perkinsus* spp. infection during on growing in northeast Brazil. **Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria**. Jaboticabal, v. 26, n. 4, p. 401-410, 2017.

SCHAEFFER, J. et al. Norovirus contamination on French marketed oysters. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 166, n. 2, p. 244-248, 2013.

SEO, D. J. et al. Seasonal and regional prevalence of norovirus, hepatitis A virus, hepatitis E virus, and rotavirus in shellfish harvested from South Korea. **Food Control**. Amsterdam, v. 41, p. 178-184, 2014.

SEYMOUR, I.; APPLETON, H. Foodborne viruses and fresh produce. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 91, n. 5, p. 759-773, 2001.

SHAH, M. P.; HALL, A. J. Norovirus Illnesses in Children and Adolescents. **Infectious Disease Clinics**. v. 32, n. 1, p. 103-118, 2018.

SHIEH, Y. S. C. et al. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. **Journal of Infectious Diseases**. Oxford, v. 181, p. S360-S366, 2000.

SIDHU, J. P. et al. Occurrence of virulence genes associated with diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 79, n. 1, p. 328-335, 2013.

SILVA, N. D.; JUNQUEIRA, V. C.; SILVEIRA, N. F. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. In: (Ed.). **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**: Varela, 2001.

SINGH, P. et al. Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Lausanne, v. 5, p. 1-13, 2015.

SIQUEIRA, J. A. M. et al. Astrovirus infection in hospitalized children: Molecular, clinical and epidemiological features. **Journal of Clinical Virology**. Amsterdam, v. 94, p. 79-85, 2017.

SODRÉ, F. N. G. A. D.; FREITAS, R. R. D.; REZENDE, V. L. F. M. Um panorama da aquicultura como alternativa sócio-econômica as comunidades tradicionais. **Revista Brasileira de Agroecologia**. Porto Alegre, v. 3, n. 3, p. 13-23, 2008.

SOLÉ, M. et al. Bivalves residue analysis for the assessment of coastal pollution in the Ebro Delta (NW Mediterranean). **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 40, n. 9, p. 746-753, 2000.

- SOUZA, D. S. M. et al. Presence of enteric viruses, bioaccumulation and stability in *Anomalocardia brasiliensis* clams (GMELIN, 1791). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 2017.
- SOUZA, D. S. M. et al. Virus, protozoa and organic compounds decay in depurated oysters. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 167, n. 3, p. 337-345, 2013.
- SOUZA, D. S. M. et al. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Amsterdam, v. 76, p. 153-161, 2012.
- SOUZA, W. et al. Novel astrovirus and calicivirus identified in migratory birds in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**. Hamilton, v. 53, p. 9, 2016.
- STALS, A. et al. Evaluation of a norovirus detection methodology for ready-to-eat foods. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 145, n. 2-3, p. 420-425, 2011a.
- STALS, A. et al. Evaluation of a norovirus detection methodology for soft red fruits. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 28, n. 1, p. 52-58, 2011b.
- STROHMEIER, T. et al. Flow reduction, seston depletion, meat content and distribution of diarrhetic shellfish toxins in a long-line blue mussel (*Mytilus edulis*) farm. **Journal of Shellfish Research**. Washington, v. 24, n. 1, p. 15-23, 2005.
- SUFFREDINI, E. et al. Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 113, n. 3, p. 686-692, 2012.
- SUMMA, M.; VON BONSDORFF, C.-H.; MAUNULA, L. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 183, n. 2, p. 154-160, 2012.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**. Oxford, v. 28, n. 10, p. 2731-9, 2011.
- TEIXEIRA, D. M. et al. Occurrence of norovirus GIV in environmental water samples from Belém city, Amazon region, Brazil. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 8, n. 1, p. 101-104, 2016.
- TERIO, V. et al. Norovirus in retail shellfish. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 27, n. 1, p. 29-32, 2010.

TEUNIS, P. F. M. et al. Enteric Virus Infection Risk from Intrusion of Sewage into a Drinking Water Distribution Network. **Environmental Science & Technology**. v. 44, n. 22, p. 8561-8566, 2010.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

Thuener, J. Hepatitis A and B Infections. **Prim Care Clin Office Pract**. v. 44, p. 621–629, 2017.

TONG, H. I. et al. Effective detection of human noroviruses in Hawaiian waters using enhanced RT-PCR methods. **Water Research**. Amsterdam, v. 45, n. 18, p. 5837-5848, 2011.

TOROK, V. et al. National survey of foodborne viruses in Australian oysters at production. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 69, p. 196-203, 2018.

TRAMONTE, K. M. et al. Geochemical behavior, environmental availability, and reconstruction of historical trends of Cu, Pb, and Zn in sediment cores of the Cananéia-Iguape coastal system, Southeastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 127, p. 1-9, 2018.

TSE, H. et al. Rediscovery and genomic characterization of bovine astroviruses. **Journal of General Virology**. v. 92, n. 8, p. 1888-1898, 2011.

TURNAGE, N. L.; GIBSON, K. E. Sampling methods for recovery of human enteric viruses from environmental surfaces. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 248, p. 31-38, 2017.

VAN, T. T. H. et al. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 217-223, 2008.

VANTARAKIS, A. et al. Development of a multiplex PCR detection of *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in mussels. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 31, n. 2, p. 105-109, 2000.

VICTORIA, M. et al. Evaluation of an adsorption–elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. **Journal of Virological Methods**. Amsterdam, v. 156, n. 1-2, p. 73-76, 2009.

VICTORIA, M. et al. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Water and Health**. London, v. 8, n. 1, p. 158-165, 2010a.

VICTORIA, M. et al. Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 109, n. 1, p. 231-238, 2010b.

VIEIRA, C. B. et al. Viruses surveillance under different season scenarios of the Negro River Basin, Amazonia, Brazil. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2016.

VIEIRA, C. B. et al. Detection of enteric viruses in recreational waters of an urban lagoon in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 107, n. 6, p. 778-784, 2012.

VINJE, J.; KOOPMANS, M. P. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. **Journal of Infectious Diseases**. Oxford, v. 174, n. 3, p. 610-615, 1996.

VINJÉ, J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 53, n. 2, p. 373-381, 2015.

VU, D. L. et al. Epidemiology of Classic and Novel Human Astrovirus: Gastroenteritis and Beyond. **Viruses**. Basel v. 9, n. 2, p. 1-33, 2017.

WALKER, D. I. et al. *Escherichia coli* testing and enumeration in live bivalve shellfish—Present methods and future directions. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 73, p. 29-38, 2017.

WANG, J.; DENG, Z. Detection and forecasting of oyster norovirus outbreaks: recent advances and future perspectives. **Marine Environmental Research**. Amsterdam, v. 80, p. 62-9, 2012.

WANG, J.; DENG, Z. Modeling and prediction of oyster norovirus outbreaks along Gulf of Mexico coast. **Environmental Health Perspectives**. New York, v. 124, n. 5, p. 627, 2016.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**. Oxford, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.

WETZ, M. S.; YOSKOWITZ, D. W. An 'extreme' future for estuaries? Effects of extreme climatic events on estuarine water quality and ecology. **Marine Pollution Bulletin**. London, v. 69, n. 1-2, p. 7-18, 2013.

WHITE, M. B.; RAJAGOPALAN, S.; YOSHIKAWA, T. T. Infectious diarrhea: norovirus and *Clostridium difficile* in older adults. **Clinics in Geriatric Medicine**. Philadelphia, v. 32, n. 3, p. 509-522, 2016.

WHITE, P. Evolution of norovirus. **Clinical Microbiology and Infection**. Amsterdam, v. 20, n. 8, p. 741-745, 2014.

World Health Organization (WHO). **Preventing diarrhoea through better water, sanitation and hygiene: exposures and impacts in low-and middle-income countries**. 2014.

World Health Organization (WHO). **Viruses in Food: Scientific Advice to Support Risk Management Activities: Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series. No. 13., Microbiological Risks Assessment Series**. 2008.

World Health Organization (WHO). **Escherichia coli**. World Health Organization 2017.

WONG, K. et al. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. **Environment International**. Amsterdam, v. 45, p. 151-164, 2012.

WOODS, J. W. et al. Detection and molecular characterization of norovirus from oysters implicated in outbreaks in the US. **Food Microbiology**. Cambridge, v. 59, p. 76-84, 2016.

WUNDERLI, W. et al. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **PloS One**. San Francisco, v. 6, n. 11, p. 1-9, 2011.

WYN-JONES, A.; SELLWOOD, J. Enteric viruses in the aquatic environment. **Journal of Applied Microbiology**. Newark, v. 91, n. 6, p. 945-962, 2001.

YAMASHITA, T. et al. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. **Journal of Infectious Diseases**. Oxford, v. 164, n. 5, p. 954-957, 1991.

YANG, S.-C. et al. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. **Archives of Microbiology**. Berlin, v. 199, n. 6, p. 811-825, 2017.

YANG, X. J. et al. Prevalence, enumeration, and characterization of *Salmonella* isolated from aquatic food products from retail markets in China. **Food Control**. Amsterdam, v. 57, p. 308-313, 2015.

YEN, H.; KARINO, M.; TOBE, T. Modulation of the inflammasome signaling pathway by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Lausanne, v. 6, p. 1-8, 2016.

YILMAZ, H. et al. Real-Time PCR Detection of Norovirus in Mussels Collected from the Bosphorus in Istanbul, Turkey. **Food and Environmental Virology**. New York, v. 2, n. 2, p. 64-68, 2010.

YOKOYAMA, C. C. et al. Adaptive immunity restricts replication of novel murine astroviruses. **Journal of Virology**. London, v. 86, n. 22, p. 12262-12270, 2012.

YUEN, L. K. et al. Heminested multiplex reverse transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 39, n. 7, p. 2690-2694, 2001.

ZHANG, H. et al. Protective immunity of a Multivalent Vaccine Candidate against piglet diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in a pig model. **Vaccine**. Amsterdam, v. 36, n. 5, p. 723-728, 2018.

ZHANG, H. N. et al. Prevalence of Foodborne Pathogens in Cooked Meat and Seafood from 2010 to 2013 in Shandong Province, China. **Iranian Journal of Public Health**. Tih-rān, v. 45, n. 12, p. 1577-1585, 2016.

ZHOU, N. et al. Environmental Surveillance for Human Astrovirus in Shandong Province, China in 2013. **Scientific Reports**. London, v. 4, p. 1-5, 2014.

ZHUANG, X. et al. Modulation of host signaling in the inflammatory response by enteropathogenic *Escherichia coli* virulence proteins. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 237-244, 2017.

APÊNDICE

Tabela 13 - Sequências de nucleotídeos de EPEC utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do nome, origem, tipo de amostra e respectivos números de acesso no GenBank.

Nome	Origem	Tipo de amostra	Nº acesso GenBank
EPEC-FG551	Uruguai	Fezes humanas	AJ744877
EPEC-74.3	Brasil	Fezes humanas	AJ716126
EPEC-FV5123-4286/1	Suíça	Gado	AJ879903
EPEC-FG305	Uruguai	Fezes humanas	AJ744880
EPEC-FV335	Uruguai	Fezes humanas	AJ716140
EPEC-157.5	Brasil	Fezes humanas	AJ744876
EPEC-FV5133-3988/1	Suíça	Gado	AJ879904
EPEC-FV3854-1070/1	Suíça	Gado	AJ879907
EPEC-FV3139-20F1	Brasil	Gado	AJ705053
EPEC-FG274	Uruguai	Fezes humanas	AJ716146
EPEC-FV2760-034BG2	Brasil	Gado	AJ705055
EPEC-18.1	Brasil	Fezes humanas	AJ716125
EPEC-FV5125-4125/1	Suíça	Gado	AJ879902
EPEC-133.5	Brasil	Fezes humanas	AJ716134
EPEC-FV5120-4075/1	Suíça	Gado	AJ879906
EPEC-FV5126-3951/1	Suíça	Gado	AJ879905
EPEC-217.2	Brasil	Fezes humanas	AJ744872
EPEC-376	Uruguai	Fezes humanas	AJ579369
EPEC-373	Uruguai	Fezes humanas	AJ579305
EPEC-FV4770-4112	Brasil	Gado	AJ715400
EPEC-FG275	Uruguai	Fezes humanas	AJ716147
EPEC-FG547	Uruguai	Fezes humanas	AJ744879
EPEC-FG513	Uruguai	Fezes humanas	AJ744878
EPEC-FV2699-FICHA3	Brasil	Gado	AJ715403
EPEC-69.2	Uruguai	Fezes humanas	AJ744875

Fonte: Própria autoria.

Tabela 14 - Sequências de nucleotídeos de NoV utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do genótipo, nome, origem e respectivos números de acesso no GenBank.

Genótipo	Nome	Origem	Nº acesso GenBank
GII	GII.1, Hawaii	EUA	U07611
GII	GII.2, Melksham	Inglaterra	X81879
GII	GII.3, Toronto	Canada	U02030
GII	GII.4, Common Florida	EUA	AF080549
GII	GII.5, Vermont	EUA	AF414423
GII	GII.6, Florida 1993	EUA	AF414407
GII	GII.7, Pennsylvania	EUA	AF414409
GII	GII.8, Idaho	EUA	AY054299
GII	GII Arg320	EUA	AF190817
GII	Hu/GII/ICB1241/1996/Brazil	Brasil	DQ386921
GII	Hu/GII/ICB2109/1996/Brazil	Brasil	DQ386957
GII	Hu/GII/ICB1467/1996/Brazil	Brasil	DQ386941
GII	Hu/GII/ICB1434/1996/Brazil	Brasil	DQ386933
GII	Hu/GII/ICB2670/1996/Brazil	Brasil	DQ386955
GII	Hu/GII.4/Kobe034/2006/JP	Japão	AB291542
GII	Hu/GII.4/Sydney348/97O/AU	Austrália	DQ078829
GII	Hu/NLV/OCS960352/1996/JP	Japão	AB089860
GII	HMO6-201308-NOR	México	KX019854
GII	YURI 32073	Japão	AB083781
GII	Hu/NV/Hokkaido/47/2000/JP	Japão	AB240173
GII	Hu/NV/Hokkaido/44/2000/JP	Japão	AB240174
GII	NV/Saitama T24eGII/01/JP	Japão	AB112306
GII	GII, Swine NoV Sw43/1997/JP	Japão	AB074892
GIII	GIII, Jena	Alemanha	AJ011099
GII	Hu/GII.4/Sydney348/97O/AU	Austrália	DQ078829
GII	Hu/NLV/OCS960352/1996/JP	Japão	AB089860

Fonte: Própria autoria

Figura 22 - Alinhamento das sequências deduzidas de 244 aminoácidos do gene *phoA* de *Escherichia coli* para as sequências MS-1-10, MS-1-14, OS-2-3, OS-2-10, OS-2-15 e MS-2-10, detectadas no presente estudo, e de outras *Escherichia coli* recuperadas do GenBank.

O histograma *Conservation* reflete a conservação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos e indica resíduos completamente conservados com um asterisco amarelo, sendo as posições menos conservadas mostradas em cores mais escuras. O histograma de qualidade de anotação *Quality* reflete a probabilidade de se observar uma mutação numa coluna qualquer do alinhamento baseada nos escores da matriz BLOSUM62 entre os resíduos mutado e o conservado. O histograma *Consensus* reflete a porcentagem do resíduo modal por coluna.

Fonte: Própria autoria.

Figura 23 - Alinhamento das sequências deduzidas de 253 aminoácidos do gene *phoA* de *Escherichia coli* para as amostras OS-3-2, OS-3-5, OS-3-7, MS-3-2, MS-3-7 e MS-3-11 detectadas no presente estudo, e de outras *Escherichia coli* recuperadas do GenBank.

O histograma *Conservation* reflete a conservação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos e indica resíduos completamente conservados com um asterisco amarelo, sendo as posições menos conservadas mostradas em cores mais escuras. O histograma de qualidade de anotação *Quality* reflete a probabilidade de se observar uma mutação numa coluna qualquer do alinhamento baseada nos escores da matriz BLOSUM62 entre os resíduos mutado e o conservado. O histograma *Consensus* reflete a porcentagem do resíduo modal por coluna.

Fonte: Própria autoria.

Figura 24 - Alinhamento das sequências deduzidas de 226 aminoácidos do gene *phoA* de *Escherichia coli* para as amostras OS-4-1, OS-4-7, MS-4-8, MS-4-9, MS-3-13, MS-4-14 e MS-4-15 detectadas no presente estudo, e de outras *Escherichia coli* recuperadas do GenBank.

O histograma *Conservation* reflete a conservação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos e indica resíduos completamente conservados com um asterisco amarelo, sendo as posições menos conservadas mostradas em cores mais escuras. O histograma de qualidade de anotação *Quality* reflete a probabilidade de se observar uma mutação numa coluna qualquer do alinhamento baseada nos escores da matriz BLOSUM62 entre os resíduos mutado e o conservado. O histograma *Consensus* reflete a porcentagem do resíduo modal por coluna.

Fonte: Própria autoria.

Figura 25- Alinhamento das seqüências deduzidas de 226 aminoácidos do gene *phoA* de *Escherichia coli* para as amostras OS-5-10, OS-5-15, MS-5-1, MS-5-11 MS-5-13 e MS-5-14, detectadas no presente estudo, e de outras *Escherichia coli* recuperadas do GenBank.

O histograma *Conservation* reflete a conservação das propriedades físico-químicas dos aminoácidos e indica resíduos completamente conservados com um asterisco amarelo, sendo as posições menos conservadas mostradas em cores mais escuras. O histograma de qualidade de anotação *Quality* reflete a probabilidade de se observar uma mutação numa coluna qualquer do alinhamento baseada nos escores da matriz BLOSUM62 entre os resíduos mutado e o conservado. O histograma *Consensus* reflete a porcentagem do resíduo modal por coluna.

Fonte: Própria autoria.

Quadro 1 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 903 pb do gene *phoA*, entre sequências da amostragem 1 e 8 sequências da amostragem 2 detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de *Escherichia coli* recuperadas do GenBank.

Bacteria	Similaridade/Identidade (%)																			
	MS-1-9	MS-1-10	MS-1-14	OS-2-3	OS-2-4	OS-2-10	OS-2-12	OS-2-13	OS-2-15	MS-2-10	MS-2-12	AP017620	CP006834	CP007799	CP010186	CP010196	CP010242	CP021207	CP016007	CP019903
MS-1-9	-	100,0	99,6	99,6	99,9	99,6	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	91,1	93,3	92,0	90,2	90,2	90,2	92,2	92,8	93,0
MS-1-10	100,0	-	99,6	99,6	99,9	99,6	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	91,1	93,3	92,0	90,2	90,2	90,2	92,2	92,8	93,0
MS-1-14	99,6	99,6	-	100,0	99,7	100,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	91,1	93,6	92,3	90,4	90,4	90,4	92,5	93,1	93,2
OS-2-3	99,6	99,6	100,0	-	99,7	100,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	91,1	93,6	92,3	90,4	90,4	90,4	92,5	93,1	93,2
OS-2-4	99,9	99,9	99,7	99,7	-	99,7	98,9	98,9	98,9	98,9	98,9	91,1	93,5	92,2	90,3	90,3	90,3	92,4	93,0	93,1
OS-2-10	99,6	99,6	100,0	99,0	99,7	-	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	91,1	93,6	92,3	90,4	90,4	90,4	92,5	93,1	93,2
OS-2-12	98,8	98,8	99,0	99,0	98,9	99,0	-	100,0	100,0	100,0	100,0	91,5	94,3	92,7	91,3	91,3	91,3	92,9	93,5	93,9
OS-2-13	98,8	98,8	99,0	99,0	98,9	99,0	100,0	-	99,7	99,7	99,7	91,5	94,3	92,7	91,3	91,3	91,3	92,9	93,5	93,9
OS-2-15	98,8	98,8	99,0	99,0	98,9	99,0	99,7	99,7	-	100,0	100,0	91,5	94,0	92,7	91,0	91,0	91,0	92,9	93,5	93,6
MS-2-10	98,8	98,8	99,0	99,0	98,9	99,0	100,0	100,0	100,0	-	99,9	91,5	94,3	92,7	91,3	91,3	91,3	92,9	93,5	93,9
MS-2-12	98,8	98,8	99,0	99,0	98,9	99,0	99,9	99,9	99,9	99,9	-	91,5	94,1	92,7	91,2	91,2	91,2	92,9	93,5	93,8
AP017620	91,7	91,7	91,7	91,7	91,7	91,7	92,1	92,1	92,1	92,1	92,1	-	90,4	88,6	85,5	85,5	85,5	88,8	89,4	90,0
CP006834	93,6	93,6	93,9	93,9	93,7	93,9	94,5	94,5	94,5	94,5	94,5	90,5	-	97,2	93,5	93,5	93,5	97,4	98,0	99,6
CP007799	93,4	93,4	93,7	93,7	93,5	93,7	94,1	94,1	94,1	94,1	94,1	89,8	97,6	-	92,6	92,6	92,6	97,5	98,9	97,3
CP010186	90,4	90,4	90,6	90,6	90,5	90,6	91,5	91,5	91,5	91,5	91,5	85,6	93,5	92,6	-	100,0	100,0	94,5	93,6	93,7
CP010196	90,4	90,4	90,6	90,6	90,5	90,6	91,5	91,5	91,5	91,5	91,5	85,6	93,5	92,6	100,0	-	100,0	94,5	93,6	93,7
CP010242	90,4	90,4	90,6	90,6	90,5	90,6	91,5	91,5	91,5	91,5	91,5	85,6	93,5	92,6	100,0	100,0	-	94,5	93,6	93,7
CP021207	92,5	92,5	92,8	92,8	92,6	92,8	93,1	93,1	93,1	93,1	93,1	88,9	97,4	97,5	94,5	94,5	94,5	-	98,6	97,5
CP016007	93,5	93,5	93,7	93,7	93,6	93,7	94,1	94,1	94,1	94,1	94,1	89,9	98,7	98,9	93,6	93,6	93,6	98,6	-	98,7
CP019903	93,2	93,2	93,5	93,5	93,3	93,5	94,1	94,1	93,9	94,1	94,0	90,1	99,6	97,5	93,7	93,7	93,7	97,5	98,4	-

Fonte: Própria autoria.

Quadro 2 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 903 pb do gene *phoA*, entre 13 sequências da amostragem 3 detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de *Escherichia coli* recuperadas do GenBank.

Bacteria	Similaridade/Identidade (%)																			
	OS-3-2	OS-3-3	OS-3-5	OS-3-6	OS-3-7	OS-3-11	MS-3-2	MS-3-6	MS-3-7	MS-3-9	MS-3-11	MS-3-14	MS-3-15	AP017260	CP006834	CP007799	CP010186	CP010196	CP021207	CP016007
OS-3-2	-	98,3	98,0	96,0	96,0	94,7	99,5	97,4	98,0	98,0	98,5	96,7	98,7	87,5	95,6	94,7	95,8	95,8	95,5	95,8
OS-3-3	98,0	-	99,2	97,4	97,4	93,6	98,3	98,7	98,2	98,2	98,7	95,5	98,5	88,9	96,8	95,9	94,4	94,4	96,7	97,0
OS-3-5	97,8	98,9	-	97,9	97,9	93,1	97,8	99,2	98,2	98,2	98,7	95,0	98,3	88,9	96,6	96,4	93,9	93,9	97,2	97,5
OS-3-6	95,7	97,1	97,7	-	100,0	94,2	96,0	98,2	97,9	97,9	97,4	96,2	97,3	87,3	95,6	95,5	94,9	94,9	97,1	96,5
OS-3-7	94,5	97,1	97,7	100,0	-	94,2	96,0	98,2	97,9	97,9	97,4	96,2	97,3	83,5	90,9	90,0	94,9	94,9	97,1	96,5
OS-3-11	94,5	93,3	92,8	94,0	94,0	-	94,7	92,7	94,2	94,2	93,8	96,9	94,0	83,5	90,9	90,0	95,5	95,5	91,6	91,0
MS-3-2	99,2	98,0	97,5	95,7	95,7	94,5	-	97,4	98,0	98,0	98,5	96,7	98,7	87,5	95,4	94,5	95,5	95,5	95,3	95,5
MS-3-6	97,1	98,4	98,9	97,9	97,9	92,5	97,1	-	98,3	98,3	98,8	94,9	98,7	88,4	96,8	96,7	93,5	93,5	97,5	97,8
MS-3-7	97,8	97,9	97,9	97,7	97,7	94,0	97,8	98,0	-	100,0	99,5	96,3	99,1	87,7	96,1	95,4	95,2	95,2	96,9	96,5
MS-3-9	97,8	97,9	97,9	97,7	97,7	94,0	97,8	98,0	100,0	-	99,5	96,3	99,1	87,7	96,1	95,4	95,2	95,2	96,9	96,5
MS-3-11	98,3	98,4	98,4	97,1	97,1	93,6	98,3	98,5	99,2	99,2	-	95,8	99,6	88,1	96,6	95,9	94,6	94,6	963,7	97,0
MS-3-14	96,4	95,3	94,7	95,9	95,9	97,1	96,4	94,4	96,0	96,0	95,5	-	95,9	85,1	92,7	91,8	98,6	98,6	93,6	92,8
MS-3-15	98,4	98,3	98,0	97,0	97,0	93,7	98,4	98,4	98,8	98,8	99,3	95,6	-	87,9	96,7	95,8	94,8	94,8	96,6	96,8
AP017620	87,9	89,3	89,3	87,6	87,6	83,8	87,8	88,8	88,0	88,0	88,5	85,4	88,2	-	90,4	88,6	85,5	85,5	88,8	89,4
CP006834	96,0	97,2	97,0	96,0	96,0	91,2	95,8	97,2	96,4	96,4	97,0	93,1	97,1	90,5	-	97,2	93,5	93,5	97,4	98,0
CP007799	95,1	96,3	96,8	95,8	95,8	90,3	94,8	97,1	95,8	95,8	96,3	92,2	96,2	89,8	97,6	-	92,6	92,6	97,5	98,9
CP010186	96,2	94,9	94,4	95,4	95,4	96,5	96,0	94,0	95,6	95,6	95,1	99,1	95,3	85,6	93,5	92,6	-	100,0	94,5	93,6
CP010196	96,2	94,9	94,4	95,4	95,4	96,5	96,0	94,0	95,6	95,6	95,1	99,1	95,3	85,6	93,5	92,6	100,0	-	94,5	93,6
CP021207	95,9	97,2	97,8	97,5	97,5	91,9	95,8	98,0	97,2	97,2	97,2	94,0	97,1	88,9	97,4	97,5	100,0	100,0	-	98,6
CP016007	96,2	97,4	97,9	96,9	96,9	91,3	95,9	98,1	96,8	96,8	97,4	93,2	97,2	89,9	98,4	98,4	93,5	93,5	98,9	-

Fonte: Própria autoria.

Quadro 3 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 903 pb do gene *phoA*, entre 13 sequências da amostragem 4 detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de *Escherichia coli* recuperadas do GenBank.

Bacteria	Similaridade/Identidade (%)																			
	OS-4-1	OS-4-5	OS-4-7	OS-4-10	MS-4-1	MS-4-5	MS-4-6	MS-4-8	MS-4-9	MS-4-10	MS-4-13	MS-4-14	MS-4-15	CP006834	CP007799	CP010186	CP010196	CP010242	CP021207	CP016007
OS-4-1	-	93,7	94,3	94,6	94,7	94,4	94,8	95,1	94,8	91,8	94,2	92,1	94,8	95,0	94,1	96,4	96,4	96,4	95,8	95,2
OS-4-5	94,9	-	94,9	90,4	96,0	95,4	95,9	95,3	96,4	93,0	94,7	91,4	95,5	95,8	95,5	92,1	92,1	92,1	96,0	96,5
OS-4-7	95,1	97,0	-	93,2	96,8	97,4	97,5	97,3	96,1	93,0	94,8	91,6	97,8	95,8	96,4	95,3	95,3	95,3	97,8	97,0
OS-4-10	95,2	92,2	93,7	-	91,2	91,9	91,6	91,7	91,4	88,6	91,0	89,1	92,2	91,6	90,7	96,5	96,5	96,5	92,5	91,7
MS-4-1	95,2	96,4	97,3	91,7	-	97,4	99,2	97,1	97,1	94,8	95,7	92,4	97,5	97,4	97,6	93,1	93,1	93,1	97,8	98,4
MS-4-5	95,1	96,8	98,3	92,7	97,5	-	97,8	97,1	96,2	93,8	95,5	92,2	99,3	96,4	96,4	93,5	93,5	93,5	98,6	97,4
MS-4-6	95,4	96,6	98,1	92,2	99,2	98,0	-	97,4	97,0	94,3	95,6	92,7	97,9	97,0	97,4	93,4	93,4	93,4	98,2	98,2
MS-4-8	95,7	96,5	98,1	92,3	97,8	98,2	98,2	-	96,5	93,7	95,4	92,4	97,8	96,5	96,7	93,6	93,6	93,6	98,0	97,6
MS-4-9	95,2	96,5	96,5	91,7	97,6	96,6	97,4	97,1	-	96,1	95,9	93,5	96,6	97,6	96,7	93,0	93,0	93,0	97,1	97,8
MS-4-10	93,6	94,7	94,8	90,2	95,8	95,3	95,8	95,4	97,4	-	93,6	91,0	93,8	95,5	94,1	90,3	90,3	90,3	94,3	94,9
MS-4-13	94,9	95,5	95,6	91,6	96,3	95,8	96,2	96,2	96,7	94,6	-	92,0	95,7	97,2	95,4	92,4	92,4	92,4	95,7	93,6
MS-4-14	92,7	92,1	92,2	89,6	93,1	92,7	93,3	93,2	94,1	92,4	93,0	-	92,8	93,2	91,7	90,7	90,7	90,7	92,9	92,8
MS-4-15	95,3	96,6	98,2	92,6	97,9	99,3	98,4	98,6	97,1	95,7	96,3	93,3	-	96,7	96,7	93,9	93,9	93,9	99,0	97,8
CP006834	95,0	95,8	96,0	91,6	97,4	96,4	97,0	96,7	97,6	95,9	97,4	93,4	96,6	-	97,2	93,5	93,5	93,5	97,4	98,0
CP007799	94,1	95,5	96,4	90,7	97,6	96,4	97,4	97,0	96,7	94,8	95,9	92,0	96,9	97,6	-	92,6	92,6	92,6	97,5	98,9
CP010186	97,1	94,1	95,6	97,1	93,6	94,5	94,0	94,0	93,5	92,1	93,2	91,3	94,4	93,5	92,6	-	100,0	100,0	94,5	93,6
CP010196	97,1	94,1	95,6	97,1	93,6	94,5	94,0	94,0	93,5	92,1	93,2	91,3	94,4	93,5	92,6	100,0	-	100,0	94,5	93,6
CP010242	97,1	94,1	95,6	97,1	93,6	94,5	94,0	94,0	93,5	92,1	93,2	91,3	94,4	93,5	92,6	100,0	100,0	-	94,5	93,6
CP021207	95,8	96,6	97,9	92,5	98,3	98,6	98,6	98,3	97,6	95,7	96,6	93,5	99,1	97,4	97,5	94,5	94,5	94,5	-	98,6
CP016007	95,2	96,5	97,1	91,7	98,4	97,4	98,2	97,9	97,8	95,7	97,0	93,0	97,9	98,4	98,9	93,6	93,6	93,6	93,6	-

Fonte: Própria autoria.

Quadro 4 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 903 pb do gene *phoA*, entre 11 sequências da amostragem 5 detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de *Escherichia coli* recuperadas do GenBank.

Bactéria	Similaridade/Identidade (%)																			
	OS-5-8	OS-5-10	OS-5-12	OS-5-15	MS-5-1	MS-5-2	MS-5-8	MS-5-11	MS-5-12	MS-5-13	MS-5-14	CP006834	CP007799	CP010186	CP010196	CP010242	CP016007	CP019000	CP019903	CP024886
OS-5-8	-	96,9	98,0	94,2	95,2	96,3	96,3	96,4	92,0	94,3	96,8	96,7	98,3	92,0	92,0	92,0	98,4	97,9	96,8	94,6
OS-5-10	97,1	-	97,5	94,8	95,8	97,2	95,8	97,0	90,4	95,3	95,7	97,2	97,5	93,6	93,6	93,6	98,3	98,2	97,4	94,8
OS-5-12	98,5	97,6	-	95,4	95,0	96,4	95,2	96,3	92,5	94,5	97,2	96,7	99,5	92,2	92,2	92,2	98,4	97,7	96,8	95,8
OS-5-15	95,7	95,4	96,5	-	92,1	93,8	92,8	93,2	90,4	91,7	93,9	93,3	95,9	90,5	90,5	90,5	95,1	94,2	93,4	99,3
MS-5-1	96,5	96,2	96,4	95,3	-	94,9	94,1	95,2	90,3	94,7	95,2	96,1	95,9	90,8	90,8	90,8	96,3	96,6	95,8	92,3
MS-5-2	96,8	97,5	96,8	94,8	95,5	-	97,8	99,1	92,2	95,6	95,8	97,6	96,9	93,0	93,0	93,0	97,7	97,6	97,7	93,8
MS-5-8	97,1	96,2	96,5	94,6	95,4	98,3	-	97,9	92,4	93,9	94,7	96,7	95,8	91,8	91,8	91,8	96,6	96,9	96,8	93,0
MS-5-11	96,9	97,0	96,8	94,1	95,7	99,5	98,4	-	92,4	95,6	96,0	98,0	96,8	92,8	92,8	92,8	97,6	98,0	98,1	93,4
MS-5-12	93,7	91,7	93,7	91,9	92,3	93,6	94,1	93,9	-	89,9	92,2	91,8	92,4	86,5	86,5	86,5	91,7	91,3	91,5	90,5
MS-5-13	95,6	95,6	95,6	93,2	95,2	96,3	95,1	96,3	91,3	-	96,7	96,7	95,0	91,8	91,8	91,8	95,8	96,2	96,3	91,6
MS-5-14	97,2	95,8	97,4	95,4	96,5	95,9	95,7	96,1	93,1	97,3	-	97,3	97,7	92,4	92,4	92,4	91,2	96,8	96,9	94,2
CP006834	97,5	97,2	97,3	94,8	96,5	97,9	97,3	98,1	93,2	97,2	97,5	-	97,2	93,5	93,5	93,5	98,0	98,4	99,6	93,6
CP007799	98,7	97,6	99,5	97,0	91,2	97,1	96,8	97,1	93,7	95,9	98,0	97,6	-	92,6	92,6	92,6	98,9	98,3	97,3	96,3
CP010186	92,3	94,0	92,4	90,8	91,2	93,2	92,1	93,1	87,7	92,4	92,6	93,5	92,6	-	100,0	100,0	93,6	93,5	93,7	91,0
CP010196	92,3	94,0	92,4	90,8	91,2	93,2	92,1	93,1	87,7	92,4	92,6	93,5	92,6	100,0	-	100,0	93,6	93,5	93,7	91,0
CP010242	92,3	94,0	92,4	90,8	91,2	93,2	92,1	93,1	87,7	92,4	92,6	93,5	92,6	100,0	100,0	-	93,6	93,5	93,7	91,0
CP016007	98,8	98,4	98,7	96,1	97,1	98,0	97,2	98,0	93,1	96,8	97,3	98,4	98,9	93,6	93,6	93,6	-	99,1	98,1	95,5
CP019000	98,4	98,3	98,1	95,3	96,9	97,9	97,3	98,1	92,7	96,8	96,9	98,4	98,4	93,5	93,5	93,5	99,3	-	98,5	94,6
CP019903	97,3	97,5	97,2	94,7	96,1	98,0	97,2	98,3	92,8	96,8	97,1	99,6	94,5	93,7	93,7	93,7	98,4	98,5	-	93,7
CP024886	96,0	95,4	96,8	99,6	95,4	94,8	94,8	94,7	92,1	93,3	95,6	94,9	97,3	91,0	91,0	91,0	96,4	95,7	99,7	-

Fonte: Própria autoria.

Quadro 5 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 360 pb do gene *eae*, entre 6 sequências detectadas por PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outras cepas de EPEC recuperadas do GenBank.

Bacteria	Similaridade/Identidade (%)																	
	MF981857	MF981858	MF981859	MF981860	MF981861	MF981862	AJ744877	AJ716126	AJ879903	AJ744880	AJ744876	AJ879907	AJ705053	AJ705055	AJ879902	AJ879906	AJ879905	AJ579369
MF981857	-	61,2	65,5	64,6	89,6	60,9	60,0	62,3	65,8	65,8	56,2	60,6	60,0	60,0	60,6	67,6	67,6	88,1
MF981858	61,2	-	60,0	64,3	58,0	99,7	98,3	84,9	78,0	78,0	64,9	62,0	98,8	98,8	62,0	60,3	60,3	58,6
MF981859	64,9	58,3	-	67,0	64,6	59,7	60,9	63,8	67,2	67,2	63,4	65,8	60,6	60,6	65,8	71,3	71,3	66,4
MF981860	64,1	64,3	66,7	-	64,9	64,6	64,1	66,0	64,6	64,6	61,2	60,0	63,8	63,8	60,0	63,9	63,9	65,5
MF981861	88,4	58,0	64,1	64,6	-	57,7	56,8	59,7	62,6	62,6	58,3	61,7	56,8	56,8	61,7	66,1	66,1	85,8
MF981862	60,9	97,1	58,0	64,6	57,7	-	98,6	84,6	78,3	78,3	65,2	62,3	99,1	99,1	62,3	60,6	60,6	58,6
AJ744877	60,0	95,7	58,3	64,1	56,8	95,9	-	85,5	79,1	79,1	66,4	63,5	99,4	99,4	63,5	61,2	61,2	58,0
AJ716126	62,3	82,3	61,2	66,4	59,7	82,0	82,0	-	84,9	84,9	64,7	65,5	85,5	85,5	65,5	63,2	63,2	59,7
AJ879903	65,8	75,4	64,6	64,6	64,6	75,7	75,7	81,4	-	100,0	64,1	65,5	79,1	79,1	65,5	67,0	67,0	64,3
AJ744880	65,8	75,4	64,6	64,6	64,6	75,7	75,7	81,4	96,5	-	64,1	65,5	79,1	79,1	65,5	67,0	67,0	64,3
AJ744876	56,2	62,3	61,2	61,2	58,3	62,9	62,9	67,1	61,2	61,2	-	83,2	66,1	66,1	83,2	59,4	59,4	57,2
AJ879907	60,6	59,4	63,2	60,0	61,7	59,7	60,0	62,6	62,0	62,0	79,7	-	63,2	63,2	100,0	64,1	64,1	61,8
AJ705053	60,0	96,2	58,0	63,8	56,8	96,5	95,9	82,0	75,7	75,7	62,6	59,7	-	100,0	63,2	60,9	60,9	58,3
AJ705055	60,0	96,2	58,0	63,8	56,8	96,5	95,9	82,0	75,7	75,7	62,6	59,7	96,5	-	63,2	60,9	60,9	58,3
AJ879902	60,6	59,4	63,2	60,0	61,7	59,7	60,0	62,6	62,0	62,0	79,7	96,5	59,7	59,7	-	64,1	64,1	61,8
AJ879906	67,0	59,1	68,1	63,5	65,5	59,4	59,4	61,4	63,8	63,8	56,2	60,9	59,1	59,1	60,9	-	100,0	67,0
AJ879905	67,0	59,1	68,1	63,5	65,5	59,4	59,4	61,4	63,8	63,8	56,2	60,9	59,1	59,1	60,9	95,7	-	67,0
AJ579369	86,7	58,0	65,2	64,9	84,3	58,0	57,1	58,8	63,5	63,5	56,8	61,4	57,4	57,4	61,4	65,2	65,2	-

Fonte: Própria autoria.

Quadro 6 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 120 pb do gene RdRp, entre 8 amostras detectadas por RT-PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outros NoV recuperados do GenBank.

Vírus	Similaridade/Identidade (%)																			
	OS-2-3	MS-2-10	MS-2-12	OS-3-6	OS-3-7	OS-4-1	OS-4-5	OS-4-10	DQ386921	DQ386933	AB291542	DQ078829	KX019854	AB083781	AB240173	AB112306	AF080549	AF414409	AY054299	AF414407
OS-2-3	-	97,8	99,4	97,8	99,4	99,4	98,3	98,3	100,0	98,9	98,9	98,9	98,3	98,3	98,3	98,3	41,0	48,5	41,4	68,0
MS-2-10	94,4	-	98,3	98,9	98,3	98,3	98,3	99,4	97,8	98,9	98,9	98,9	98,3	98,3	97,2	98,3	42,2	46,9	40,9	68,0
MS-2-12	96,1	94,9	-	97,2	100,0	100,0	97,8	98,9	99,4	98,3	98,3	98,3	97,8	97,8	97,8	97,8	40,4	47,9	40,9	67,4
OS-3-6	94,4	95,5	93,8	-	97,2	97,2	98,3	98,6	97,8	98,9	98,9	98,9	98,3	98,3	97,2	98,3	42,7	46,9	41,4	68,5
OS-3-7	96,1	94,9	96,6	93,8	-	96,6	97,8	98,9	99,4	98,3	98,3	98,3	97,8	97,8	97,8	97,8	40,4	47,9	40,9	67,4
OS-4-1	96,1	94,9	96,6	93,8	96,6	-	97,8	98,9	99,4	98,3	98,3	98,3	97,8	97,8	97,8	97,8	40,4	47,9	40,9	67,4
OS-4-5	94,9	94,9	94,4	94,9	94,4	94,4	-	97,8	98,3	99,4	99,4	99,4	98,9	98,9	97,8	98,9	43,3	48,5	44,1	69,1
OS-4-10	94,9	96,1	95,5	94,9	95,5	95,5	94,4	-	98,3	98,3	198,3	98,3	97,8	97,8	96,6	97,8	42,2	46,9	41,8	68,0
DQ386921	96,6	94,4	96,1	94,4	96,1	96,1	94,9	94,9	-	98,9	98,9	98,9	98,3	98,3	98,3	98,3	41,0	48,5	41,4	68,0
DQ386933	95,5	95,5	94,9	95,5	94,9	94,9	96,1	94,9	95,5	-	100,0	100,0	99,4	99,4	98,3	99,4	43,2	47,9	42,0	68,5
AB291542	95,5	95,5	94,9	95,5	94,9	94,9	96,1	93,8	95,5	96,6	-	100,0	99,4	99,4	98,3	99,4	43,2	47,9	42,0	68,5
DQ078829	95,5	95,5	94,9	95,5	94,9	94,9	96,1	94,9	95,5	96,6	96,6	-	99,4	99,4	98,3	99,4	43,2	47,9	42,0	68,5
KX019854	94,9	94,9	94,4	94,9	94,4	94,4	95,5	94,4	94,9	96,1	96,1	96,1	-	98,9	97,8	99,4	43,2	48,7	40,6	69,1
AB083781	94,9	93,8	94,4	94,9	94,4	94,4	95,5	94,4	94,9	96,1	96,1	96,1	95,5	-	97,8	98,9	41,5	49,5	42,5	68,0
AB240173	94,9	94,9	94,4	93,8	94,4	94,4	94,4	93,3	94,9	94,9	94,9	94,9	94,4	94,4	-	98,9	40,4	47,9	41,4	68,5
AB112306	94,9	94,9	94,4	94,9	94,4	94,4	95,5	94,4	94,9	96,1	96,1	96,1	95,5	95,5	95,5	-	43,2	47,9	42,0	68,5
AF080549	42,1	43,8	41,6	44,4	41,6	41,6	45,5	43,8	42,1	44,9	44,9	44,9	44,9	44,9	42,7	44,9	-	68,1	66,9	42,9
AF414409	52,8	51,1	52,2	51,1	52,1	52,2	52,8	51,1	52,8	52,2	52,2	52,2	52,2	52,2	52,2	52,2	69,7	-	70,8	43,5
AY054299	42,1	41,6	41,6	42,1	41,6	41,6	46,1	43,3	42,1	42,7	42,7	42,7	42,7	42,7	42,1	42,7	66,9	70,8	-	43,8
AF414407	64,6	64,6	64,0	65,2	64,0	64,0	65,7	64,6	64,6	65,2	65,2	62,5	65,7	64,6	65,2	65,2	46,1	45,5	47,8	-

Fonte: Própria autoria.

Quadro 7 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para o fragmento de 120 pb do gene RdRp, entre 8 amostras detectadas por RT-PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de NoV recuperadas do GenBank.

Vírus	Similaridade/Identidade (%)																			
	OS-4-11	OS-4-13	MS-4-5	MS-4-8	OS-5-8	OS-5-10	MS-5-12	MS-5-15	DQ386921	DQ386933	AB291542	DQ078829	KX019854	AB083781	AB240173	AB240174	AF080549	AF414409	AY054299	AF414407
OS-4-11	-	98,3	98,9	98,3	98,3	98,3	98,3	98,9	98,3	98,3	98,3	98,3	97,8	97,8	97,8	97,8	40,5	48,5	43,0	68,0
OS-4-13	94,9	-	97,2	98,9	98,9	98,9	97,8	98,3	100	98,9	98,9	98,9	98,3	98,3	98,3	98,3	41,0	48,5	41,4	68,0
MS-4-5	95,5	93,8	-	98,3	98,3	98,3	99,4	98,9	97,2	98,3	98,3	98,3	97,8	97,8	96,6	97,8	42,2	47,4	43	68,5
MS-4-8	94,9	95,5	94,9	-	97,8	98,9	97,8	98,3	98,9	98,9	98,9	98,9	98,3	98,3	97,2	98,3	43,3	48,5	44,1	69,1
OS-5-8	94,9	95,5	94,9	94,4	-	98,9	98,9	99,4	98,9	98,9	98,9	98,9	98,3	98,3	98,3	98,3	40,4	47,9	40,9	68,0
OS-5-10	94,9	95,5	94,9	95,5	95,5	-	97,8	99,4	98,9	97,8	97,8	97,8	97,2	97,2	97,2	97,2	40,5	48,5	43,9	68,5
MS-5-12	94,9	94,4	96,1	94,4	95,5	94,4	-	98,3	97,8	98,9	98,9	98,9	98,3	98,3	97,2	98,3	42,2	46,9	40,9	68,0
MS-5-15	95,9	94,9	95,5	94,9	96,1	96,1	94,9	-	98,3	98,3	98,3	98,3	97,8	97,8	97,8	97,8	40,5	48,5	43,0	68,5
DQ386921	94,9	96,6	93,8	95,5	95,5	95,5	94,4	94,9	-	98,9	98,9	98,9	98,3	98,3	98,3	98,3	41,0	48,5	41,4	68,0
DQ386933	94,9	95,5	94,9	95,5	95,5	94,4	95,5	94,9	95,5	-	100,0	100,0	99,4	99,4	98,3	99,4	43,2	47,9	42,0	68,5
AB291542	94,9	95,5	94,9	95,5	95,5	94,4	95,5	94,9	95,5	96,6	-	100,0	99,4	99,4	98,3	99,4	43,2	47,9	42,0	68,5
DQ078829	94,9	95,5	94,9	95,5	95,5	94,4	95,5	94,9	95,5	96,6	96,6	-	99,4	99,4	98,3	99,4	43,2	47,9	42,0	68,5
KX019854	94,4	94,9	94,4	94,9	94,9	93,8	94,9	94,4	94,9	96,1	96,1	96,1	-	98,9	97,8	98,9	43,2	48,7	40,6	69,1
AB083781	94,4	94,9	94,4	94,9	94,9	93,8	94,9	94,4	94,9	96,1	96,1	96,1	95,5	-	97,8	98,9	41,5	49,5	42,5	68,0
AB240173	94,4	94,9	93,3	93,8	94,9	93,8	93,8	94,4	94,9	94,9	94,9	94,9	94,4	94,4	-	97,8	40,4	47,9	41,4	68,5
AB112306	94,4	94,9	94,4	94,9	94,9	93,8	94,9	94,4	94,9	96,1	96,1	96,1	95,5	95,5	95,5	-	43,2	47,9	42,0	68,5
AF080549	42,1	42,1	44,4	45,5	41,6	42,1	43,8	42,1	42,1	44,9	44,9	44,9	44,9	44,9	42,7	44,9	-	68,1	66,9	42,9
AF414409	52,8	52,8	51,7	52,8	52,2	52,8	51,1	52,8	52,8	52,2	52,2	52,2	52,2	52,2	52,2	52,2	69,7	-	70,8	43,5
AY054299	44,9	42,1	44,9	46,1	41,6	46,6	41,6	44,9	42,1	42,7	42,7	42,7	42,7	42,7	42,1	42,7	66,9	70,8	-	43,8
AF414407	64,9	64,6	65,2	65,7	64,9	65,2	64,9	65,2	64,6	65,2	65,2	62,5	65,7	64,6	65,2	65,2	46,1	45,5	47,8	-

Fonte: Própria autoria.

Quadro 8 - Valores de NMP de coliformes totais e termotolerantes em 100 g das amostras de ostras e mexilhões em NMP/g.

Código da Amostra	Ostras		Código da Amostra	Mexilhões	
	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes		Coliformes totais	Coliformes termotolerantes
OS-1-1	23	-	MS-1-1	23	-
OS-1-2	-	-	MS -1-2	43	-
OS-1-3	-	-	MS -1-3	23	-
OS-1-4	-	-	MS -1-4	9.2	-
OS-1-5	-	-	MS -1-5	23	-
OS-1-6	-	-	MS -1-6	43	-
OS-1-7	-	-	MS -1-7	23	-
OS-1-8	9.2	-	MS -1-8	1100	-
OS-1-9	-	-	MS -1-9	23	3.6
OS-1-10	-	-	MS -1-10	23	3.6
OS-1-11	-	-	MS -1-11	9.2	-
OS-1-12	9.2	-	MS -1-12	43	-
OS-1-13	-	-	MS -1-13	43	-
OS-1-14	15	3	MS -1-14	9.2	3.6
OS-1-15	-	-	MS -1-15	23	-
Média	14.1	3	Média	97.4	3.6
OS-2-1	240	-	MS -2-1	240	-
OS-2-2	23	-	MS -2-2	240	-
OS-2-3	93	3	MS -2-3	93	-
OS-2-4	23	3.6	MS -2-4	240	-
OS-2-5	43	-	MS -2-5	240	-
OS-2-6	23	-	MS -2-6	240	-
OS-2-7	23	-	MS -2-7	93	-
OS-2-8	240	-	MS -2-8	43	-
OS-2-9	43	-	MS -2-9	43	9.2
OS-2-10	240	3.6	MS -2-10	240	43
OS-2-11	240	-	MS -2-11	93	15
OS-2-12	93	23	MS -2-12	240	15
OS-2-13	240	9.2	MS -2-13	93	-
OS-2-14	240	3.6	MS -2-14	240	3.6
OS-2-15	240	3.6	MS -2-15	240	7.4
Média	136.3	7.1	Média	174.5	15.5
OS-3-1	14	63	MS -3-1	100	-
OS-3-2	74	63	MS -3-2	110	150
OS-3-3	43	63	MS -3-3	150	3.6
OS-3-4	93	-	MS -3-4	130	7.4
OS-3-5	93	43	MS -3-5	275	3.6
OS-3-6	21	43	MS -3-6	46	11
OS-3-7	28	7.4	MS -3-7	46	3.6
OS-3-8	7.4	-	MS -3-8	110	-

OS-3-9	15	49	MS -3-9	130	7.4
OS-3-10	1300	-	MS -3-10	46	7.4
OS-3-11	240	43	MS -3-11	130	3.6
OS-3-12	21	-	MS -3-12	130	7.4
OS-3-13	35	63	MS -3-13	130	-
OS-3-14	240	-	MS -3-14	130	3.6
OS-3-15	93	-	MS -3-15	130	3.6
Média	154.5	48.6	Média	119.5	17.7
OS-4-1	93	17	MS -4-1	1000	3.6
OS-4-2	9.2	-	MS -4-2	1240	9.2
OS-4-3	93	-	MS -4-3	1030	-
OS-4-4	9.2	-	MS -4-4	1030	-
OS-4-5	9.2	12	MS -4-5	640	3.6
OS-4-6	23	-	MS -4-6	1000	3.6
OS-4-7	3.6	18	MS -4-7	1400	-
OS-4-8	-	-	MS -4-8	400	240
OS-4-9	9.2	-	MS -4-9	1400	43
OS-4-10	23	18	MS -4-10	460	43
OS-4-11	-	-	MS -4-11	1100	1300
OS-4-12	-	-	MS -4-12	1000	20
OS-4-13	23	-	MS -4-13	1300	23
OS-4-14	-	-	MS -4-14	1050	9.2
OS-4-15	-	14	MS -4-15	1300	23
Média	29.5	15.8	Média	1023.3	143.4
OS-5-1	23	23	MS -5-1	1300	1300
OS-5-2	3.6		MS -5-2	1300	1300
OS-5-3	15	9.2	MS -5-3	1300	240
OS-5-4	-	-	MS -5-4	1300	93
OS-5-5	9.2	9.2	MS -5-5	1300	93
OS-5-6	23	9.2	MS -5-6	1300	240
OS-5-7	23	3.6	MS -5-7	1300	240
OS-5-8	240	15	MS -5-8	1300	1300
OS-5-9	9.2		MS -5-9	1300	1300
OS-5-10	43	43	MS -5-10	1300	1300
OS-5-11	9.2	9.2	MX-5-11	1300	1300
OS-5-12	150	9.2	MS -5-12	1300	1300
OS-5-13	150	23	MS -5-13	1300	1300
OS-5-14	-	-	MS -5-14	1300	1300
OS-5-15	23	3.6	MS -5-15	1300	1300
Média	55.5	14.3	Média	1300	927.1

Fonte: Própria autoria.

Quadro 9 - Listagens das amostras positivas para o gene *phoA* e *eae*.

Amostragem	Local	Código da amostra	Gene <i>phoA</i>	Gene <i>eae</i>
1	Itapanhoapina	MS-1-9	+	-
		MS-1-10	+	-
		MS-1-14	+	-
2	Itapanhoapina	OS-2-3	+	-
		OS-2-4	+	-
		OS-2-10	+	-
		OS-2-12	+	-
		OS-2-13	+	-
		OS-2-15	+	-
		MS-2-10	+	-
		MS-2-12	+	-
3	Resex do Mandira	OS-3-2	+	-
		OS-3-3	+	-
		OS-3-5	+	-
		OS-3-6	+	-
		OS-3-7	+	-
		OS-3-11	+	-
		MS-3-2	+	-
		MS-3-6	+	-
		MS-3-7	+	-
		MS-3-9	+	-
		MS-3-11	+	-
		MS-3-14	+	-
		MS-3-15	+	-
4	Resex do Mandira	OS-4-1	+	-
		OS-4-5	+	-
		OS-4-7	+	-
		OS-4-10	+	-
		MS-4-1	+	+
		MS-4-5	+	+
		MS-4-6	+	-
		MS-4-8	+	-
		MS-4-9	+	-
		MS-4-10	+	-
		MS-4-13	+	-
		MS-4-14	+	-
		MS-4-15	+	-
5	Resex do Mandira	OS-5-8	+	+
		OS-5-10	+	+
		OS-5-12	+	-
		OS-5-15	+	-

		MS-5-1	+	+
		MS-5-2	+	+
		MS-5-8	+	-
		MS-5-11	+	-
		MS-5-12	+	-
		MS-5-13	+	-
		MS-5-14	+	-
Total			48	6

Fonte: Própria autoria.

Quadro 10 - Listagens das amostras positivas para norovírus.

Amostragem	Local	Código da amostra	NoV	Sequenciadas NoV
2	Itapanhoapina	OS-2-3	+	+
		OS-2-12	+	-
		MS-2-10	+	+
		MS-2-12	+	+
		MS-2-13	+	-
3	Resex do Mandira	OS-3-6	+	+
		OS-3-7	+	+
4	Resex do Mandira	OS-4-1	+	+
		OS-4-5	+	+
		OS-4-7	+	-
		OS-4-10	+	+
		OS-4-11	+	+
		OS-4-13	+	+
		MS-4-5	+	+
		MS-4-8	+	+
		MS-4-13	+	-
5	Resex do Mandira	OS-5-8	+	+
		OS-5-10	+	+
		OS-5-12	+	-
		MS-5-12	+	+
		MS-5-15	+	+
Total			21	16

Fonte: Própria autoria.