

## ANÁLISE DE VÍRUS EM ÁGUA DE CISTERNAS COMO INDICADOR DE RISCO PARA A SAÚDE DAS AVES

Caroline Hoss<sup>3</sup>, Janaina G. Renostro<sup>1</sup>, Arlei Coldebella<sup>2</sup>, Alexandre Matthiensen<sup>2</sup>, Daiane Voss-Rech<sup>2</sup> e Luizinho Caron<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, bolsista CNPQ/PIBIC na Embrapa Suínos e Aves, [renostroj@gmail.com](mailto:renostroj@gmail.com)

<sup>2</sup>Embrapa Suínos e Aves

<sup>3</sup>Bolsista de Mestrado UFSC

<sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia Molecular, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS

**Palavras-chave:** vírus, cisternas, água da chuva, dessedentação, avicultura.

### INTRODUÇÃO

Na avicultura não apenas a disponibilidade de água na quantidade necessária, mas também as suas características químicas, físicas e microbiológicas adequadas são de importância vital para o bom desempenho e saúde dos lotes. Porém, a água pode desempenhar um papel importante na veiculação de agentes infecciosos como os vírus da influenza aviária, doença de Newcastle, doença de Gumboro, bronquite infecciosa das galinhas, dentre outros. Bactérias como *Salmonella* spp, *E. coli* e outras, além de protozoários e parasitas que também podem afetar a saúde das aves e do consumidor (1). Em áreas onde existe concentração na produção animal como no Oeste de Santa Catarina, a demanda por água é grande e as fontes superficiais ou de poços artesianos podem não ser suficientes o que torna a disponibilidade de água um gargalo para o crescimento da produção. Neste cenário, a construção de cisternas para armazenar água das chuvas para períodos de escassez, ou mesmo complementar períodos de maior demanda é uma alternativa que deve ser explorada. No entanto, este tipo de fonte pode oferecer maior risco sanitário as aves, devido a possibilidade de aves silvestres excretarem no telhado e isso contaminar a cisterna com vírus como influenza aviária. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a presença de vírus viáveis em cisternas de água da chuva, antes e após cloração (nas que cloravam a água) de onze propriedades, assim como a água de um poço superficial e de uma nascente, como indicador de qualidade dessas águas como possível fonte para dessedentação de plantéis de aves.

### MATERIAL E MÉTODOS

Onze propriedades com cisternas foram acompanhadas e neste trabalho mostramos os resultados de 2 colheitas de amostras destas cisternas antes e após cloração, sendo que nem todas cloravam a água (Tabela 1). Em duas propriedades também foram colhidas amostras de água de poço e nascente. As amostras de água foram colhidas em sacos plásticos para este fim e transportadas em caixas de isopor com gelo até o laboratório, onde foram alíquotadas em tubos plásticos estéreis de 50 ml, em duplicata, e armazenadas em ultrafreezer a -70°C. Para o processamento, visando análises para a presença de vírus, foi procedido o descongelamento seguido de ultracentrifugação de 28 ml a 41000 g por 3 horas à 8°C. Após a ultracentrifugação foi ressuspendido o pellet em 2 ml de tampão Tris-EDTA. A partir dessa amostra foram utilizados 200 µl para a extração de ácidos nucleicos para a detecção molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e 400 para inoculação em cultivo celular. Todas as amostras da primeira colheita foram inoculadas em cultivo de células de linhagem *Chicken Embryo Related* (CER) e na segunda colheita em fibroblastos de embrião de galinha (FEG) em placas de 24 poços, sendo realizadas 2 passagens (3 a 5 dias cada) e observado efeito citopático (2). Todas as amostras foram submetidas à PCR para os seguintes vírus: vírus da doença de Gumboro (3), vírus da bronquite infecciosa das galinhas (5) e reovírus das aves (6).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira colheita, 12 de 14 amostras apresentaram efeito citopático (Tabela 1), apenas as amostras 4A e 7 foram não tiveram efeito citopático no cultivo de células. Já na segunda 11 de 15 amostras foram positivas, as amostras 1A, 1B, 4B e 9B foram negativas, sendo que quando na Tabela 1 onde consta de cisterna não tratada e B é a mesma água clorada ou que foi colhida de outra amostra em poço ou nascente, a água de nascente foi colhida apenas na segunda coleta (Tabela 1), ou seja, a grande maioria. Já na PCR dos cultivos celulares com efeito citopático foram obtidas 4 amostras positivas para o vírus da doença de gumboro na primeira colheita (5A cisterna, 5B poço, 6 cisterna e 8 cisterna) e 5 na segunda colheita (4A cisterna, 5A poço, 5B cisterna, 6 cisterna e 11 cisterna) e para reovírus, 1 amostra na primeira colheita (3A cisterna) e 2 na segunda (2A cisterna, não clorada e 2B cisterna clorada). Todas as amostras foram negativas para o vírus da bronquite (Tabela 1). Tanto reovírus como o vírus de gumboro são vírus não envelopados, portanto, mais resistentes às condições ambientais, diferente do vírus da bronquite que é mais facilmente inativado. Mesmo encontrando elevada positividade nas cisternas o estudo explorou apenas 11 propriedades, no entanto, Garcia et al. (2012) encontraram 45% das fontes superficiais positivas para circovírus suíno tipo 2 (PCV-2). O que demonstra a importância do tratamento da água de cisternas para a dessedentação de aves.

### CONCLUSÕES

No cultivo celular 12 de 14 amostras foram positivas na primeira coleta e na segunda 11 de 15, sendo a maioria das cisternas e inclusive a de poço superficial apresentaram efeito citopático. Assim, mesmo com estes resultados preliminares fica demonstrada a importância da aplicação de um tratamento para a água das cisternas que seja efetivo também contra vírus não envelopados que são mais resistentes, como foi o caso da amostra 2A e 2B que continuou positiva para reovírus, mesmo após clorada. As células CER são híbridos de células de camundongo e galinha, assim podem ser infectadas mais facilmente também por vírus de mamíferos, por isso sua maior positividade neste estudo. Assim, além da cloração é importante se pensar em outros sistemas de tratamento de água que elimine também vírus não envelopados como o reovírus e outros vírus não envelopados mais resistentes.

### REFERÊNCIAS

1. AMARAL, L.A. Drinking water as a risk factor to poultry health. **Brazilian Journal of Poultry Science**. 6:4. 2004. DOI: 10.1590/S1516-635X2004000400001.
2. GIRARDI, V., DEMONLINER, M., RIGOTTO, C. et al. Assessment of diversity of adenovirus DNA polymerase gene in recreational waters facilitated by ultracentrifugal concentration. **J. of Water Health**. 16:1, 2018. DOI: 10.2166/wh.2017.144
3. HAYASHI, M.M. **Sequenciamento do gene VP2 e VP5 do vírus da doença de Gumboro**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia)) - Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. 2003.
4. GARCIA, L.A.T., VIANCELLI, A., RIGOTTO, C. Surveillance of human and swine adenovirus, human norovirus and swine circovirus in water samples in Santa Catarina, **Brazil. J. Water and Health**. 10:3, 2012. doi: 10.2166/wh.2012.190
5. LI, H., YANG, H. Sequence analysis of nephropathogenic infectious bronchitis virus strains of the Massachusetts genotype in Beijing. **Avian Pathol**. 30:5, 535-541. 2001. DOI: 10.1080/03079450120078734
6. CATERINA, K.M., FRASCA JR., S. GIRSHICK, T., KHAN, M.I. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. **Mol. Cell Probes**. 18:5, 293-298. 2004. DOI: 10.1016/j.mcp.2004.04.003

### Agradecimentos

Agradecemos as pessoas que trabalharam na realização das análises como Tânia P. Klein e aos empregados que foram realizar as colheitas de água e a FAPESC que deu suporte financeiro para a realização do trabalho através do financiamento de DEMANDA ESPONTÂNEA – PESQUISA 2017 TR 1776, onde a atividade de avaliação da presença de vírus na água de cisternas é parte integrante.

**Tabela 1.** Resultado de PCR e cultivo celular para os respectivos vírus nas colheitas 1 (C1) e 2 (C2)

Amostra	Origem	PCR Gumboro		PCR Bronquite		PCR Reovírus		Isolamento celular	
		C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1 (CER)	C2 (FEG)
1A	Cisterna	-	-	-	-	-	-	+	-
1B	Cisterna clorada	-	-	-	-	-	-	+	-
2A	Cisterna	-	-	-	-	-	+	+	+
2B	Cisterna clorada	-	-	-	-	-	+	+	+
3	Cisterna	-	-	-	-	+	-	+	+
4A	Cisterna	-	+	-	-	-	-	-	+
4B	Nascente	NC	-	NC	-	NC	-	NC	-
5A	Cisterna	+	+	-	-	-	-	+	+
5B	Poço	+	+	-	-	-	-	+	+
6	Cisterna	+	+	-	-	-	-	+	+
7	Cisterna	-	NC	-	NC	-	NC	-	NC
8	Cisterna	+	-	-	-	-	-	+	+
9A	Cisterna	-	-	-	-	-	-	+	+
9B	Cisterna clorada	-	-	-	-	-	-	+	-
10	Cisterna	-	-	-	-	-	-	+	+
11	Cisterna	NC	+	NC	-	NC	-	NC	+

NC: Não colhido