

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS, IMUNITÁRIOS E
DO PROTEINOGRAMA SÉRICO DA VACINAÇÃO CONTRA
A DOENÇA DE NEWCASTLE EM GANSOS-DA-CHINA
(*Anser cygnoides*). PESQUISA DO ESTADO PORTADOR
DO VÍRUS E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.**

Josie Maria Campioni
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS, IMUNITÁRIOS E
DO PROTEINOGRAMA SÉRICO DA VACINAÇÃO CONTRA
A DOENÇA DE NEWCASTLE EM GANSOS-DA-CHINA
(*Anser cygnoides*). PESQUISA DO ESTADO PORTADOR
DO VÍRUS E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.**

Josie Maria Campioni

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2009

C196e Campioni, Josie Maria
Estudo de parâmetros clínicos, imunitários e do proteinograma sérico da vacinação contra a doença de Newcastle em gansos-da-China (*Anser cygnoides*). Pesquisa do estado portador do vírus e sua importância epidemiológica / Josie Maria Campioni. – – Jaboticabal, 2009
xvii, 74 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Antonio Carlos Paulillo
Banca examinadora: Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho, Márcia Nishizawa
Bibliografia

1. *Anser cygnoides* .- doença de Newcastle 2. Gansos-da-China - vacinações. 3. Gansos-da-China - VDN portador I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.598.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Josie Maria Campioni – Médica Veterinária nascida na cidade de Brodowski – São Paulo, em 26 de setembro de 1980. Filha de Ivo Nadyr Campioni e Maria Adami Campioni. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, com colação de grau em janeiro de 2006. Durante a graduação, nos anos de 2004 a 2006, participou de projetos de pesquisas relacionados à patologia aviária, enfocando principalmente o estudo da Doença de Newcastle em aves silvestres. Em março de 2007 iniciou o curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, (Patologia Animal) ficando lotada no Departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP) no Campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo. Foi bolsista CAPES durante o mestrado.

Atualmente trabalha como médica veterinária da Vigilância Sanitária Municipal de Brodowski.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos”.

(Marcel Proust)

***Aos meus pais,
Ivo e Maria***

As pessoas mais importantes da minha vida, que mesmo diante de dificuldades e limitações, não pouparam esforços para que nada me faltasse durante meus estudos.

Agradeço pelo amor, respeito, confiança e por sempre estarem ao meu lado nessa grande jornada, tanto nos momentos de alegria quanto nos de tristeza.

DEDICO

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Antônio Carlos Paulillo

***Pela amizade e orientação, os meus sinceros
agradecimentos***

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP –Jaboticabal.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo pela transmissão de conhecimentos valiosos e apoio para desenvolvimento do projeto.

À CAPES e FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e pelo auxílio à pesquisa, fundamentais para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, principalmente a Antônio J. dos Santos e Moema Ogassavara.

À Dra. Elizabeth M. dos Santos Schmidt pela essencial colaboração durante todo trabalho.

À Dra. Márcia Nishizawa e ao Dr. Adriano Carrasco pela valiosa ajuda na análise laboratorial.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari pelas orientações e por ter disponibilizado o Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV-UNESP, para as análises bioquímicas

Ao médico veterinário André Santana, pela amizade e auxílio nas análises bioquímicas.

Aos acadêmicos de Medicina Veterinária Alan, Leonardo e André pela colaboração no experimento.

À Ana Carolina dos Reis e Carolina Buzollini pela hospitalidade, apoio, carinho e muitos momentos alegres proporcionados durante a minha estadia em Jaboticabal.

Às minhas fiéis amigas Mônica Costa Oliveira e Pamela Reina por todo apoio e companheirismo, principalmente nas horas mais difíceis.

A todos meus amigos do curso de Pós-Graduação: Viviane, Vanessa, Valéria, Ana Carolina Alves, Kelly , Ingrid e Everton .

As minhas amigas de Vigilância Sanitária: Ana Lúcia, Luciana Gomes, Sandra, Terezinha, Liamara e especialmente, Luciana G. S. Marchió pelo apoio, compreensão e amizade.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

Muito obrigada

AUXÍLIO FINANCEIRO

Este projeto teve bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, sob o processo nº2008/04058-5.

SUMÁRIO

	Pág
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. Doença de Newcastle.....	20
2.2. Patologia clínica de Aves.....	28
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
3.2.1. Experimento 1.....	31
3.2.2. Experimento 2.....	31
3.2.3. Experimento 3.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. EXPERIMENTO 1.....	33
4.1.1. Instalações.....	33
4.1.2. Aves experimentais, manejo e nutrição.....	33
4.1.3. Vacinas e vacinação.....	34
4.1.4 Colheita de sangue.....	36
4.1.5. Reação de inibição da hemaglutinação (HI).....	36
4.1.6. Desafio.....	37
4.1.7. Observação clínica e necropsopia.....	38
4.1.8. Reação de Cadeia de Polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR).....	38
4.1.8.1. Extração do RNA viral.....	38

4.1.8.2. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”).....	39
4.1.8.3 Síntese de DNA complementar Transcrição reversa do RNA viral.....	39
4.1.8.4. Reação de cadeia de polimerase (PCR).....	40
4.1.8.5. Detecção do produto amplificado.....	40
4.1.9. Delineamento experimental.....	40
4.2. EXPERIMENTO 2.....	42
4.2.1. Instalações.....	42
4.2.2. Aves experimentais.....	42
4.2.3. Desafio.....	42
4.2.4. Observação clínica e necropsopia.....	43
4.2.5. Reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR).....	43
4.2.6. Colheita de sangue	43
4.2.7. Reação de inibição da hemaglutinação (HI).....	43
4.3. EXPERIMENTO 3.....	44
4.3.1. Proteinograma sérico.....	44
4.3.3. Delineamento experimental.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1. EXPERIMENTO 1.....	45
5.1.1. Exame físico.....	45
5.1.2. Exame sorológico	46
5.1.3. Desafio.....	48
5.1.4. Pesquisa do genoma viral o VDN.....	52
5.2. EXPERIMENTO 2.....	54
5.2.1. Desafio, observação clínica, necropsopia, RT-PCR e HI.....	54
5.2.1.1. Aves SPF e gansos-da-China inoculados com o VDN.....	54
5.2.2. Observação clínica, necropsopia, Reação de Cadeia de Polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR) do VDN e	

sorologia (HI).....	55
5.2.2.1. Aves SPF conviventes com gansos-da-China inoculados com o VDN.....	55
5.3. EXPERIMENTO 3.....	58
5.3.1. Proteinograma sérico.....	58
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE	
1. Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA – FCAV – Unesp, <i>campus</i> Jaboticabal), protocolo número: 007605- 08 (07/05/2008).....	72
2. Composição percentual e calculada das rações experimentais que foram utilizadas nas diferentes fases do ciclo de vida dos gansos-da-China (<i>Anser</i> <i>cygnoides</i>).....	73
.....	

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Distribuição dos gansos-da-China (<i>Anser cygnoides</i>) em grupos com diferentes tratamentos imunoproliféricos contra a Doença de Newcastle (n=120).....	35
2. Médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) (\log_2) dos soros dos gansos-da-China (<i>Anser cygnoides</i>) submetidos a diferentes programas de vacinação contra Doença de Newcastle, em período compreendido entre sete e 49 dias de idade, nos diferentes grupos.....	48
3. Resultados do desafio com vírus patogênico da Doença de Newcastle, em gansos-da-China (<i>Anser cygnoides</i>), aos 60 dias de idade, nos diferentes grupos.....	49
4. Resultados da presença de genoma viral do vírus de Newcastle, por reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa, a partir de suabes de traquéia e cloaca dos gansos-da-China (<i>Anser cygnoides</i>) vacinados e revacinados contra a Doença de Newcastle, obtidos aos seis, 10 e 20 dias pós-desafio, nos diferentes grupos experimentais.....	53
5. Resultados da presença de genoma viral da estirpe patogênica, do vírus da Doença de Newcastle, por Reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa, em gansos-da-China (<i>Anser cygnoides</i>) não vacinados contra a DN, à véspera do desafio e aos cinco, 10 e 20 dias pós- desafio.....	55
6. Resultados da observação clínica, necropsopia, pesquisa da presença de genoma viral do vírus de Newcastle, e sorologia (HI) das aves SPF conviventes com gansos-da-China inoculados com o vírus de Newcastle decorridos seis (Grupo 1) e 14 (Grupo 2) dias pós-desafio...	57
7. Concentração sérica de proteínas totais (g/dL) de gansos-da-China (<i>Anser cygnoides</i>), submetidos a diferentes programas de vacinação contra a doença de Newcastle, aos sete, 21, 28, 35, 42 e 49 dias de idade.....	59
8. Concentração sérica de albumina (g/dL) em gansos-da-China (<i>Anser cygnoides</i>), submetidos a diferentes programas de vacinação contra a DN, aos sete, 21, 28, 35, 42 e 49 de idade.....	59

9. Concentração sérica de globulina (g/dL) em gansos-da-China (*Anser cygnoides*), submetidos a diferentes programas de vacinação contra a DN, aos sete, 21, 28, 35, 42 e 49 de idade..... 60
10. Proporção Albumina/globulina em gansos-da-China (*Anser cygnoides*), submetidos a diferentes programas de vacinação contra a DN, aos sete, 21, 28, 35, 42 e 49 de idade..... 60

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
Figura 1	Gansos-da-China aos 28 dias de idade em boxe de galpão experimental.....	34
Figura 2	Colheita de sangue de gansos-da-China a partir da punção da veia ulnar cutânea.....	36
Figura 3	Proventrículo e traquéia hemorrágicos de aves SPF colocadas em contato com gansos-da-China inoculados com VDN.....	56

ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS, IMUNITÁRIOS E DO PROTEINOGRAMA SÉRICO DA VACINAÇÃO CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE EM GANSOS-DA-CHINA (*ANSER CYGNOIDES*). PESQUISA DO ESTADO PORTADOR DO VÍRUS E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

RESUMO - Parâmetros clínicos, imunitários, proteinograma sérico e epidemiológicos da vacinação em gansos-da-China foram avaliados por três experimentos. Amostras vacinais Ulster 2C, B1 e La Sota do VDN foram utilizadas. A importância epidemiológica e pesquisa do estado de portador do VDN também foram avaliadas. No experimento 1, foram utilizados 120 gansos-da-China de um dia a 60 dias de idade, distribuídos em 4 tratamentos com 30 animais, submetidos a diferentes esquemas imunoproliféricos. Os resultados dos títulos de anticorpos (HI) mostraram que os programas imunoproliféricos ensaiados foram igualmente eficientes no estímulo da resposta imune humoral. Após o desafio frente a uma estirpe patogênica do VDN, aos 60 dias de vida das aves, em todos os grupos, realizou-se a extração de RNA viral através da reação de cadeia de polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR). No experimento 2, foram utilizadas aves SPF conviventes com gansos-da-China inoculados com uma estirpe patogênica do VDN, decorridos seis, 10 e 20 dias da infecção experimental, após a infecção com o VDN, nas duas espécies, empregou-se a técnica do RT-PCR. Observou-se a transmissão de vírus patogênico (VDN) dos gansos-da-China para as aves SPF conviventes decorridos até 14 dias da infecção experimental com este patógeno, o que vem realçar a importância do ganso-da-China como fonte potencial de infecção de VDN para aves domésticas. No experimento 3, foram determinadas as concentrações séricas das proteínas totais, albumina e globulinas das aves vacinadas e não vacinadas contra a doença de Newcastle. Notou-se que aos 42 dias de idade, de forma geral, os gansos vacinados com as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota apresentaram diferença de forma significativa em relação ao grupo controle para as concentrações séricas de albumina, especialmente o grupo vacinado com a estirpe LaSota.

Palavras-chave: *Anser cygnoides*, Doença de Newcastle, gansos-da-China, vacinação, VDN portador

**STUDY OF CLINICAL, IMMUNOLOGICAL AND THE SERUM PROTEINOGRAM OF
NEWCASTLE DISEASE VACCINATION IN CHINESE GOOSE (*ANSER CYGNOIDES*).
INVESTIGATION OF THE STATE OF VIRUS CARRIER AND ITS RELEVANCE IN
THE EPIDEMIOLOGY OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS**

SUMMARY – The clinical, epidemiological, immunological parameters and the serum proteinogram of vaccination in Chinese geese were investigated using 3 experiments. Ulster 2C, B1 and LaSota vaccines strains of the NDV were used. In experiment 1, 120 one-day-old Chinese geese were used, and divided into 4 different groups with 30 birds per group. They were submitted to different vaccination programs. The immunological responses in these birds were measured by HI test. These birds were also challenged with a pathogenic VDN strain at 60 days of age. After challenge, in all the groups, tracheal and cloacal swabs were collected for RT-PCR. Independent of the group, clinical signs of reaction to the vaccine were not observed. The antibody titers (HI) results showed that the immune vaccine programs adopted were equally efficient in stimulating protective levels of humoral immune responses. Challenged Chinese geese were refractory to the NDV clinical disease. However, a NDV carrier state was shown in this species until 20 days after experimental infection. The vaccinated groups of Chinese geese did not present any genetic material of virus in the RT-PCR. Therefore, these results show the relevance of vaccination in suppressing a NDV carrier state in the Chinese geese. In experiment 2, SPF chickens housed with Chinese geese which were previously inoculated with a pathogenic NDV strain, developed severe and characteristic NDV lesions and died, after five and 14 days. In experiment 3, the serum proteinogram showed significantly differences for albumin concentrations between the vaccinated and the control group at 42 days of age, especially the birds vaccinated with LaSota strain.

Key-words: *Anser cygnoides*, Newcastle Disease, China's geese, vaccination, NDV carrier

1. INTRODUÇÃO¹

Os gansos são aves da família *Anatidae* que inclui também os cisnes. Há mais de 40 variedades de gansos. São animais bastante rústicos, exigem muito pouco em termos de investimento, instalações e manejo e oferecem um excelente aproveitamento. São criados para ornamentação, vigilância, corte, industrialização de penas e, até mesmo, como animais de estimação.

A carne do ganso é exótica e atende a um consumidor de maior poder aquisitivo. De consistência firme e saborosa, também é muito gordurosa e típica de regiões mais frias. Os ovos são muito nutritivos. As penas e plumas são usadas na confecção de travesseiros, edredons e casacos. Ruidosos, possuem um forte instinto de vigilância. Ainda assim, a criação de gansos para corte, com criatório confinado e tecnificado no Brasil, é pequena comparada à de países da Europa e da América (SBRT, 2007).

Domesticado no mínimo há três mil anos no antigo Egito para produção de carnes e penas e para fabricação de flechas, é a ave mais popular da França, onde o interesse se concentra principalmente no seu fígado, matéria-prima destinada para a fabricação do sofisticado “foie gras”. Em vários países europeus, o ganso é presença garantida nas ceias de Natal e Ano-Novo.

No Brasil, os gansos além da criação tecnificada e confinada comum na região Sul, ainda são criados principalmente como aves ornamentais e vivem soltos em fazendas, sítios ou chácaras, onde podem ser criados com galinhas caipiras ou com outras aves, engrossando o plantel de muitos criadores de aves.

Uma das raças mais encontradas no país é o ganso-da-China (*Anser cygnoides*, Linnaeus, 1758, Anseriformes: *Anatidae*). São originários da Ásia Oriental. Constitui-se num animal muito bonito e elegante e assim bastante usado

1

Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA – FCAV – Unesp, campus Jaboticabal), protocolo número: 007605-08 (07/05/2008) (APÊNDICE 1).

para ornamentação. A raça tem variedades brancas e pardas, lembrando o porte dos cisnes. São animais precoces que podem chegar aos 4 kg em 10 semanas, quando submetidos a uma boa alimentação (BUCKLAND & GUY, 2002).

Esses animais são adaptáveis ao cativeiro, com elevado potencial zootécnico e são susceptíveis à infecção experimental ao vírus da doença de Newcastle (VDN). Entretanto, até o presente, nada foi feito com relação ao controle sanitário para sua preservação em confinamento.

Semelhantemente à avicultura moderna, a produção de gansos, ainda que em potencial, deverá no futuro assumir características próprias e massivas. Desse modo, a criação intensiva dessas aves, a movimentação e o aumento da concentração dos plantéis deverão, sobretudo favorecer a disseminação do vírus da doença de Newcastle.

Assim sendo, a melhor caracterização e o controle imunoprolático do VDN em gansos-da-China em nosso meio enfatiza “per si” só relevância desta pesquisa - com impacto no setor produtivo.

Paralelamente aos estudos direcionados ao desenvolvimento de programas imunoproláticos e específicos para a espécie *Anser cygnoides*, uma melhor compreensão do papel exercido por esta espécie, no plano epidemiológico, como possível portador de vírus, torna-se imprescindível, sobretudo com relação à disseminação do agente no ambiente e as implicações decorrentes para um adequado controle.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença de Newcastle

A Doença de Newcastle, também conhecida como pseudopeste aviária, desordem neuro-respiratória e, em nível internacional - Newcastle disease, faz parte da lista das enfermidades infecciosas de notificação imediata da “Organização Internacional de Epizootias-OIE”, OIE (2008), sendo seus focos de notificação compulsória.

Tal enfermidade tem sido, e é até hoje, um dos problemas sanitários mais importantes da avicultura industrial, em face dos elevados prejuízos que ocasiona (PAULILLO, 1980; 1984; 1989; PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2000; PAULILLO et al., 2002; DORETTO JÚNIOR, 1997).

Na atualidade, a DN é definida como uma infecção de ave causada por um vírus do sorotipo Parainfluenzavirus aviário tipo 1 (APMV-1) (ICTV, 2007), que reúne os seguintes critérios de virulência: 1) O vírus possui um índice de patogenicidade intra-cerebral (IPIC) maior ou igual a 0,7 ($\geq 0,7$) em pintos (*Gallus gallus domesticus*) SPF (“Specific-pathogen-free”) de um dia de idade; 2) Múltiplos aminoácidos básicos têm sido demonstrados no vírus (diretamente ou por dedução) na fração C-terminal da proteína F2 e fenilalanina no resíduo 117 da fração N-terminal da proteína F1. O termo múltiplos aminoácidos básicos refere-se à, pelo menos, três resíduos de arginina e lisina entre os resíduos 113 e 116. Nesta definição, os resíduos de aminoácidos estão numerados a partir da fração N-terminal da sequência de aminoácidos deduzida da sequência nucleotídica do gene F0, sendo os resíduos 113-116 correspondentes aos resíduos – 4 a –1 no sítio de clivagem (OIE, 2008).

Para fins didáticos, as amostras de VDN têm sido agrupadas em cinco grupos, quais sejam, velogênica viscerotrópica, velogênica neurotrópica, mesogênica, lentogênica e entérica assintomática (BEARD & HANSON, 1984).

A DN apresenta distribuição mundial, com uma ampla variação de hospedeiros onde 27 das 50 ordens de aves existentes, inclusive aves silvestres e

semi-silvestres criadas em cativeiro, têm sido reportada, natural ou experimentalmente, como infectadas por seu agente etiológico (KALETA & BALDAUF, 1988; SPRADBROW, 1988). LUTHGEN (1981) relatou uma alta incidência de portadores do VDN em aves silvestres, onde o virion foi isolado de 117 espécies, abrangendo 18 das 26 classes de aves existentes. Adicionalmente, AWAN et al. (1994) apontaram aves silvestres como importantes fontes de disseminação do VDN, no entanto, ressaltaram o fato desses animais não merecerem atenção dos pesquisadores.

A ocorrência de um surto da DN, além de acarretar elevadas perdas econômicas ao país, constituir-se-á em um grande obstáculo à exportação de produtos avícolas para outros mercados consumidores, uma vez que programas profiláticos concernentes à DN estão enquadrados nos sistemas de biossegurança, em nível mundial, sendo estabelecidas barreiras sanitárias para exportação e importação entre os países (PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2000; DORETTO JÚNIOR & PAULILLO, 2007).

A severidade da doença pode variar de infecções inaparentes até a morte, dependendo não só da patogenicidade do vírus, mas também das condições ambientais e dos hospedeiros (HECKERT et al., 1996).

O VDN possui a capacidade de se difundir por todo o mundo por meio de aves susceptíveis, pessoas, equipamentos, ar, ração e até por espécies não aviárias, entre as quais, pequenos roedores e insetos (LANCASTER, 1964; LANCASTER & ALEXANDER, 1975; ALEXANDER, 1991; ALEXANDER, 1997). Durante o curso da infecção por uma estirpe velogênica, do VDN, a maioria das aves excretam grandes quantidades de vírus nas fezes, que se constituem no principal meio de disseminação do VDN de ave para ave (NISHIZAWA, 2007).

A história da DN é marcada por três grandes panzootias, no entanto, é difícil precisar como e quando esta enfermidade emergiu, bem como determinar o período em que cada panzootia ocorreu. (PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2000)

A primeira se iniciou com a emergência da DN, em 1926, e a sua difusão para a maioria dos países do mundo (KRANEVELD, 1926; DOYLE, 1927). A difusão da

doença nos diferentes países variou consideravelmente. Na Inglaterra, a DN desapareceu em 1928, no entanto, na Ásia e Oriente Médio, a pseudopeste aviária se difundiu de 1926 a 1942 e, ainda, para o resto da Europa, África e América, a difusão da forma asiática (velogênica viscerotrópica) da doença ou da forma de Doyle parece ter ocorrido um pouco mais tarde, entre 1940 e 1950. (PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2000)

A segunda panzootia da DN parece ter surgido no final de 1960, no Oriente Médio. Nessa, a difusão foi consideravelmente mais forte do que a primeira, atingindo todos os continentes e muitos países até o ano de 1973. Essa rápida difusão estava associada ao intenso comércio por via aérea, de espécies de psitacídeos importados das Américas do Sul e Central e Sudeste da Ásia (ALEXANDER, 1988).

A terceira panzootia emergiu inicialmente do Oriente Médio, em 1970, onde foi relatada principalmente como uma doença neurotrópica em pombos, causada por uma amostra de VDN distinguível das outras amostras por anticorpos monoclonais e chamada de “pigeon type” (PPMV-1). A principal forma de difusão deu-se através da exposição, competição e comercialização de pombos e a sua presença foi confirmada em mais de vinte países, incluindo aqueles da Europa, do Canadá, dos EUA, de Hong Kong e do Sudão. Em alguns países, a doença acometeu outras aves silvestres, inclusive a avicultura comercial (McNULTY et al., 1988). Na Inglaterra, em 1984, essa amostra viral foi responsável por vinte surtos da doença em frangos de corte como resultado da contaminação da ração por fezes de pombos infectados que viviam nas fábricas de ração (ALEXANDER, 1988).

A propósito, um surto da DN em aves ornamentais, devido a uma estirpe velogênica viscerotrópica, do VDN, na Califórnia, Estados Unidos da América, em 1998, resultou em proibição das exportações de carne de frango para Rússia, Japão, Estônia, Marrocos, Nova Zelândia e Romênia. A barreira sanitária persistiu até a erradicação total da estirpe patogênica, não havendo sua difusão para aves de exploração comercial, consoante informes de BOCKMA (1998).

Um outro surto da DN em frangos de corte, em Nova Gales do Sul, Austrália, em abril de 1999, acarretou o cancelamento das exportações de todos os produtos avícolas deste país para a China (KING, 1999).

Em março de 2000, vários surtos da DN em aves comerciais e domésticas, causados por uma amostra velogênica do VDN na região de Laguna, no México, culminaram com o sacrifício de 10.360.167 aves. Foram estabelecidas barreiras sanitárias em toda a região de Laguna, como também no restante do Estado de Durango, onde se localizam grandes centros produtores de frangos de corte (OIE, 2008).

O histórico do problema no Brasil começou com o aparecimento do primeiro surto da doença de Newcastle em Belém e Macapá, território do Amapá, em 1953 (SANTOS et al., 1954), e a sua introdução ocorreu, aparentemente, por meio da importação de carcaças de aves congeladas, procedentes dos Estados Unidos da América para um dos hotéis da capital paraense. (PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2000).

Após o primeiro impacto na década de 50, a DN, embora endêmica, foi observada apenas esporadicamente, acometendo plantéis de pequena expressão econômica, controlando-se rapidamente os focos, através de vacinação e medidas profiláticas complementares (SILVA et al., 1961).

Proeminente marco na história da DN foi o estabelecimento da sua etiologia vírica através do diagnóstico e confirmação, no Brasil, por CUNHA & SILVA (1955).

No Brasil, em 1994, foi instituído o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que estabelece normas de biossegurança, vacinação e sacrifício de animais portadores de VDN, abrangendo as principais regiões avícolas (BRASIL, 1994).

No período de 1995 a 1999 foram notificados 17 focos da DN acometendo 582 aves. O baixo número de aves notificadas por foco indica o comprometimento apenas de aves de criações domésticas, ou seja, após o ano de 1995 não foram notificados focos da DN em criações comerciais no Brasil (DORETTO JÚNIOR, 2003).

No ano de 1997, o episódio do isolamento do VDN em avestruzes importadas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia, não foi considerado foco da doença. Da mesma forma, em 1999, no Estado do Paraná foi isolado VDN de aves exóticas importadas, principalmente psitacídeos e palmípedes, contudo, também não foi considerado um foco nacional, por se tratar de aves importadas. Em ambas as ocorrências, todas as aves importadas e os contatos foram sacrificados e destruídos para evitar a disseminação do VDN (DORETTO JÚNIOR, 2003).

Salienta-se que o foco da DN diagnosticado no Rio de Janeiro no ano de 2000, acometeu frangos de corte que abasteciam o comércio local e não estavam vinculados ao sistema integrado de produção. Nesse episódio, o Brasil não sofreu restrições comerciais porque o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) provou que o Estado não possui avicultura comercial expressiva, não exporta, possui barreiras zoonitárias com os Estados vizinhos e geograficamente o foco estava aproximadamente 650 km da avicultura comercial que pratica comércio internacional – princípio da zoonificação (DORETTO JÚNIOR, 2003).

Da mesma forma, no ano de 2001, foi notificado um foco da DN na região norte de Goiás, sendo que este estava restrito a uma região de assentamento rural, envolvendo tão somente aves de fundo de quintal com o sacrifício das aves para impedir a difusão do VDN (DORETTO JÚNIOR, 2003).

Em maio de 2006 foi detectado um foco da DN em aves de fundo de quintal na cidade de Vale Real (RS), localizada a 90 km de Porto Alegre (OIE, 2008; MAPA, 2006). A propriedade não atende frigoríficos e nem faz parte da cadeia produtiva do setor industrial. Segundo o Departamento de Saúde Animal (DSA), o diagnóstico virológico foi confirmado no dia 4 de julho pelo Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro) de Campinas (SP). Foi estabelecida uma zona de proteção, num raio de 3 km ao redor do foco, e zona de vigilância, num raio de 10 km. Todas as medidas sanitárias previstas no Plano Nacional de Contingência à influenza aviária e à DN foram adotadas, incluindo ações de restrição de trânsito de animais e produtos de risco (MAPA, 2006).

O MAPA divulgou no dia 15 de agosto de 2006 a ocorrência de infecção pelo VDN em patos numa propriedade localizada próximo ao parque industrial de Manaus (AM). O caso foi identificado durante atividades de monitoramento para influenza aviária e DN em propriedades com populações avícolas de subsistência, localizadas no raio de 10 km ao redor de sítios de internada de aves migratórias. Foram diagnosticados nove patos e seis galinhas positivas. Após a confirmação laboratorial, todas as medidas previstas no Plano Nacional de Contingência foram adotadas, incluindo ações de restrição de trânsito de animais e produtos de risco. A última movimentação de aves ocorreu no dia 11 de julho de 2006. Todas as aves da propriedade foram sacrificadas (MAPA, 2006).

O controle da DN é frequentemente realizado, em aves reprodutoras, frangos de corte e poedeiras comerciais, mediante vacinação e princípios de manejo que evitem a disseminação do vírus e eliminem a infecção de uma região após um surto. Porém, tais medidas nem sempre são suficientes, pois a história tem demonstrado que, de tempos em tempos, amostras de VDN emergem de fontes desconhecidas, existindo evidências de surtos da doença em aves domésticas e isolamento do vírus patogênico de aves exóticas em algumas partes do mundo, devido ao relaxamento da política de controle sanitário (PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2000; DORETTO JÚNIOR & PAULILLO, 2007).

Atualmente, no Brasil, em gansos-da-China, não existem relatos da ocorrência de surtos da doença de Newcastle por uma amostra velogênica viscerotrópica originada de galinhas.

Relatos sobre o emprego de vacinas preparadas com as estirpes B1, Ulster 2C e LaSota (inativada ou não) do VDN, são abundantes na literatura (BORLAND & ALLAN, 1980; PAULILLO, 1980; 1984; 1989; PAULILLO et al., 1996; FASSI-FEHRI, 1985; RAJESWAR & MASILLAMONY, 1993; SILVA, 1995; DORETTO JÚNIOR, 1997).

Dada a relevância então da DN no âmbito da patologia aviária, principalmente no que tange à imunidade e à epidemiologia, esta enfermidade foi amplamente estudada em reprodutoras, frangos de corte e poedeiras comerciais. Entretanto, o

papel de aves ornamentais, migratórias, silvestres, semi-silvestres e outras espécies domésticas na perpetuação do VDN no ambiente constituem ainda um campo de estudo pouco explorado em nosso meio, seja enfocando-se o agente isoladamente, seja particularizando-se características de imunoproteção.

Tal fato adquire particular importância quando se constata contemporaneamente, um crescente aumento da exploração zootécnica de outras espécies aviárias, até então considerada parcial ou totalmente silvestres.

Nesse contexto, insere-se a espécie *Anser cygnoides*, popularmente conhecido como ganso-da-China, cuja criação comercial tem se desenvolvido no Brasil.

Em adição, essas outras espécies, em criações comerciais, são submetidas a programas de imunoprofilaxia, fundamentadas inúmeras vezes, por conhecimentos oriundos de investigações com espécies aviárias estritamente domésticas, desprezando-se características epidemiológicas e de susceptibilidade fundamentais para a efetiva prevenção e controle da enfermidade. Desse modo, torna-se patente à necessidade de desenvolvimento de programas imunoproláticos, efetivos, factíveis e condizentes com os atuais sistemas de criação de gansos-da-China.

De outra parte, aves silvestres ou semi-silvestres/domésticas podem albergar agentes infecciosos sem manifestação clínica, podendo atuar como fonte de infecção não somente para outras aves, mas também para mamíferos. Ademais, em linhas gerais, podem atuar como portadores de vários agentes virais, tornando possível o surgimento de novas amostras patogênicas e sua disseminação entre aves domésticas e comerciais.

A propósito, NISHIZAWA (2007) demonstrou experimentalmente que os marrecos-de-Pequim (*Anas platyrhynchos*) não manifestaram sinais clínicos quando desafiados com uma amostra patogênica do VDN. Contudo, infectaram-se e permaneceram no estado de portador decorrido 30 dias da infecção experimental com este patógeno, o qual também tem sido demonstrado em outras espécies domésticas, tais como perdizes (PAULILLO et al., 1999), patos (FRANZO et al.,

2004), codornas (LIMA et al., 2004a, 2004b), galinhas d'angola (LIMA, 2005) e em muitas aves silvestres e migratórias (ALEXANDER, 1997).

Por outro ângulo, a grande importância das aves silvestres como disseminadoras de agentes infecciosos que acometem aves domésticas e, direta ou indiretamente, o homem, associada ao crescente interesse pelo estudo profilático e epidemiológico de moléstias respiratórias, em particular a influenza aviária, evocado em parte pela emergência, em 1997, na população humana de Hong Kong do vírus da influenza com segmentos de genes aviários, qual seja, vírus influenza A/Hong Kong/156/97 (H5N1) (CLASS, 1998) e a expectativa então do aparecimento de uma provável pandemia de influenza humana, tornam imperiosa a realização de pesquisas que venham a contribuir para ampliar o conhecimento e a experiência nessa área de investigação.

No que concerne ao comportamento da espécie *Anser cygnoides* quanto à condição de portador e/ou de transmissor de VDN, as literaturas nacional e internacional consultadas são escassas, o que impõem que esforços sejam realizados, visando uma efetiva avaliação do papel dessa espécie, no plano epidemiológico, como possível disseminadora de VDN, bem como a adoção de medidas que evitem a disseminação de VDN no ambiente, para um apropriado controle da doença.

Nesse aspecto, portanto, pouco se sabe a respeito do estado de portador de VDN em gansos-da-China, bem como sua importância epidemiológica, como fonte de infecção de VDN ou fator desencadeante de surtos da enfermidade para populações de frangos de corte, poedeiras comerciais e outras espécies de aves domésticas, semi-domésticas ou silvestres conviventes ou próximas a seu hábitat natural e/ou em confinamento.

Nesse prisma, a efetiva realização de estudos sobre o tema torna-se relevante, especialmente em face da necessidade de esclarecer o real papel exercido pela espécie *Anser cygnoides*, dentro da perspectiva de portador e/ou de fonte de infecção de VDN, trazendo-se assim contribuições para melhor caracterização da epidemiologia e do controle do agente. Para tanto, pesquisa de

material genético do VDN a partir de suabes traqueais e/ou cloacais colhidos tanto de gansos-da-China inoculados experimentalmente com uma estirpe patogênica, do VDN, quanto de aves SPF conviventes, complementar-se-ão aos dados obtidos com as provas de desafio e os testes sorológicos. Tal fato adquire maior importância ao se considerar que os trabalhos de infecção experimental controlados e, em condições que mais se assemelham às naturais, são os mais adequados para obtenção de dados clínicos, laboratoriais e patológicos sobre enfermidades, principalmente, no que tange à profilaxia e à epidemiologia.

Portanto, devem ser realizados maiores estudos com o objetivo de ampliar o conhecimento no campo da imunoprofilaxia contra a DN em gansos-da-China e na perpetuação do VDN nesta espécie animal, para estabelecer com maior exatidão as relações dentro do sistema vírus-hospedeiro-ambiente envolvidas nessa enfermidade.

2.2 Patologia clínica de aves

As provas laboratoriais do sangue podem servir como ferramentas importantes para auxiliar o monitoramento da saúde das aves, o diagnóstico de doenças e também para avaliação pré-operatória, tratamento e das condições de saúde do organismo (SCHMIDT, 2008).

Além da utilização das provas bioquímicas do sangue na clínica de aves selvagens, há a possibilidade de se intensificar o uso destas ferramentas no auxílio diagnóstico de enfermidades em avicultura. Pois, paralelamente ao crescimento da atividade avícola, ocorreu grande desenvolvimento dos métodos de diagnóstico e de profilaxia das doenças aviárias. Entretanto, aspectos básicos relacionados à fisiologia e avaliações clínico-laboratoriais foram pouco estudados.

Em linhas gerais, o estudo da bioquímica sanguínea permite avaliar a resposta do organismo às infecções, reações vacinais e entender como as doenças podem alterar as funções sanguíneas dos organismos animais. (SCHMIDT, 2008).

Os valores sanguíneos podem ser influenciados pelo estado nutricional, sexo, idade, habitat, estação do ano, estado reprodutivo, trauma, criação e estresse

ambiental (CAMPBELL, 2004). Por isso é necessário conhecer essas variações o momento da avaliação dos parâmetros sanguíneos na clínica das aves.

O perfil bioquímico do sangue é utilizado para acessar o estado fisiológico dos pacientes (CAMPBELL, 2004). Os exames laboratoriais do sangue ajudam, muitas vezes, o médico veterinário a diagnosticar precocemente quadros de sintomatologia subclínica. Alguns autores destacam que o seu pequeno uso na prática veterinária corre, em muitos casos, por deficiência de observações sobre os valores bioquímicos do sangue das espécies animais, o que não permite adequada interpretação dos resultados obtidos (KANEKO, HARVEY & BRUSS, 2008).

As concentrações sanguíneas das proteínas totais em aves são menores do que em mamíferos, variando de 2,5 a 4,5 g/dL. A albumina representa de 40 a 50% da proteína plasmática total das aves (teores normais variam de 0,8 a 2,0 g/dL) e é sintetizada no fígado. É importante lembrar que a albumina se liga e transporta ânions, cátions, ácidos graxos, hormônios (KANEKO, HARVEY & BRUSS, 2008). Assim, a hipoalbuminemia também afeta as concentrações desses compostos. De forma geral, os principais fatores que afetam as concentrações das proteínas totais em aves são: idade, sazonalidade, condições de criação (manejo) e doenças (LUMEIJ, 2008).

As imunoglobulinas produzidas por linfócitos B e plasmócitos representam um componente significativo da concentração das proteínas plasmáticas totais (CAMPBELL, 2004).

Apesar das limitações em relação à quantidade de sangue necessária para realizar provas diagnósticas e o volume de sangue obtido das aves, principalmente em animais jovens, essas condições não devem impedir que os testes sanguíneos sejam utilizados como ferramenta útil no monitoramento de diversas enfermidades que acometem aves. Por outro lado, as interpretações dos resultados dos exames laboratoriais em aves ainda precisam de mais estudos, pois tais interpretações apresentam ampla variação de acordo com a espécie, além do que diversas espécies ainda não foram pesquisadas. Adicionalmente, a literatura é escassa sobre

o perfil de parâmetros laboratoriais em aves, associados com doenças bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias, bem como com vacinações (SCHMIDT, 2008).

Nesse aspecto, pouco se sabe a respeito da resposta imunológica e do proteinograma sérico de gansos-da-China submetidos à vacinação experimental contra a doença de Newcastle.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudar comparativamente os aspectos clínicos, imunitários e do proteinograma sérico da vacinação experimental em gansos-da-China (*Anser cygnoides*) submetidos às estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do VDN, investigando também, o seu eventual estado de portador do VDN.

Adicionalmente, uma melhor compreensão do proteinograma sérico de *Anser cygnoides* vacinados ou não contra a doença de Newcastle, vem exarcebar a importância deste estudo – com reflexos positivos na área de sanidade animal.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Experimento 1

1. Registrar sinais clínicos de reação vacinal às estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota administradas em gansos-da-China, em diferentes programas imunoproliféricos contra a DN;
2. Avaliar a resposta imune às estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota administradas em gansos-da-China, em diferentes programas imunoproliféricos contra a DN;
3. Pesquisar o estado de portador de VDN em gansos-da-China;
4. Esclarecer a importância da imunoprolifaxia contra a DN em gansos-da-China.

3.2.2 Experimento 2

1. Esclarecer a importância epidemiológica do estado de portador de VDN em gansos-da-China
2. Pesquisar a duração do estado de portador de VDN em gansos-da-China

3.2.3. Experimento 3

1. Avaliar as alterações do proteinograma sérico (proteínas séricas totais, albumina e globulina) em gansos-da-China submetidos a diferentes programas imunoproláticos contra a DN.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. EXPERIMENTO 1

4.1.1. Instalações

O experimento foi conduzido no aviário experimental do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal (DPVE -FCAV-Unesp).

4.1.2. Aves experimentais, manejo e nutrição

Foram utilizados 120 gansos-da-China provenientes do Criadouro Buss, São Bernardo do Campo - SP durante o seu ciclo de vida (de 1 a 60 dias de idade), alojados em um galpão de alvenaria convencionalmente utilizado em ensaios com frangos de corte, permanecendo 10 animais por boxe de galpão (Figura 1).

Os gansos, ao início do período experimental, foram pesados individualmente para a formação de parcelas homogêneas e distribuídos, aleatoriamente, em quatro tratamentos (grupos) e três repetições com 10 aves por parcela. O mesmo critério foi adotado para os gansos do grupo controle, que desde o início de sua criação constituíram-se em um grupo à parte; todavia, mantido em condições de manejo idêntico ao utilizado para os demais grupos.

Durante o período experimental, os grupos de gansos foram mantidos isolados entre si. As aves receberam água e ração à vontade. A dieta à base de milho e farelo de soja seguiu as recomendações de exigências nutricionais, conforme o NRC (National Research Council) (1994). A composição percentual de alimentos na ração, conforme ROSTAGNO et al. (1983) foi calculada e utilizada nas diferentes fases (crescimento e engorda) do ciclo de vida dos gansos (Apêndice 2).

De modo geral, os animais foram submetidos às similares condições do manejo usual empregado na criação de gansos-da-China.



Figura 1. Gansos-da-China aos 28 dias de idade em boxe de galpão experimental

4.1.3. Vacinas e vacinação

Foram utilizadas vacinas vivas atenuadas provenientes de um mesmo laboratório e que constavam de frascos de uma única partida, estando todos no início de sua validade. As vacinas (liofilizadas) preparadas com as estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do VDN foram empregadas no experimento. O título dessas vacinas foi obtido, mediante determinação de sua dose infectante 50% (EID₅₀) em ovos embrionados de galinhas SPF, com oito a 10 dias de incubação.

Para tanto, prepararam-se diluições de 1×10^{-1} a 1×10^{-10} do vírus em solução salina tamponada (PBS) em pH 7,2, as quais foram mantidas em banho de gelo até o momento da inoculação. Presumindo-se o título do vírus, cuja EID₅₀ se procurou determinar, selecionaram-se quatro diluições próximas a esse título. A inoculação foi realizada na cavidade alantóide de ovos embrionados SPF com oito a 10 dias de

incubação. Com auxílio de seringa tipo tuberculina, injetou-se 0,1 mL de cada diluição do inóculo em cada um de sete ovos utilizados por diluição. Após a inoculação, esses ovos foram observados diariamente. Os que apareciam mortos antes das 24 horas de incubação eram desprezados. Para todas as estirpes vacinais deste ensaio, anotaram-se os embriões mortos nos dias subseqüentes, até o sétimo dia, quando então se efetuava a pesquisa de hemaglutinina viral, mediante o emprego do teste de hemaglutinação (HA) e o cálculo da EID₅₀. A determinação da EID₅₀ das estirpes vacinais em estudo foi, respectivamente, segundo o método de REED & MUENCH (1938):

$$\text{EID}_{50} (\text{Ulster 2C}) = 10^{7,15}/0,1 \text{ mL}$$

$$\text{EID}_{50} (\text{B1}) = 10^{7,20}/0,1 \text{ mL}$$

$$\text{EID}_{50} (\text{LaSota}) = 10^{7,35}/0,1 \text{ mL}$$

A vacinação, via ocular, foi realizada a partir da diluição das vacinas liofilizadas, utilizando-se água destilada como diluente, na proporção de 30mL/1000 doses vacinais/1000 aves, correspondente a 0,03mL de dose vacinal ocular, conforme metodologia utilizada por PAULILLO (1980; 1984 e 1989) e por PAULILLO et al. (1982; 1987; 1996 e 2002).

De acordo com a natureza do experimento, as aves foram distribuídas, aleatoriamente, em quatro grupos de 30 animais cada, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos gansos-China (*Anser cygnoides*) em grupos com diferentes tratamentos imunoprolifáticos contra a Doença de Newcastle (n=120).

Grupo	Vacinação (7 dias)	Via de administração	Revacinação ocular (28 dias)	via
I	Ulster 2C	Ocular	Ulster 2C	
II	B1	Ocular	B1	
III	LaSota	Ocular	LaSota	
IV*	Controle	-----	-----	

*Grupo Controle – não recebeu vacina

Todos os grupos foram observados duas vezes ao dia. Qualquer manifestação clínica foi devidamente anotada.

4.1.4. Colheita de sangue

Foram colhidas 252 amostras de sangue a partir do sétimo dia de idade das aves, com intervalos regulares de sete dias, totalizando sete colheitas. As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia ulnar superficial (Figura 2). Os soros obtidos foram inativados a 56°C, por 30 minutos, colocados em tubos Eppendorf e armazenados a – 20°C até o momento do uso, para pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação para a DN.



Figura 2. Colheita de sangue de gansos-da-China a partir da punção da veia ulnar superficial.

4.1.5. Reação de inibição da hemaglutinação

O antígeno (vivo) usado na reação de inibição da hemaglutinação foi a estirpe lentogênica LaSota do VDN, mantida em laboratório por passagens sucessivas em líquido alantóide de embrião de galinha SPF, com oito a 10 dias de desenvolvimento.

Para esta reação, empregou-se o método β , utilizando-se a microtécnica, com pequeno consumo de reagentes e leitura rápida dos resultados, sendo a técnica padronizada por CUNNINGHAM (1971).

Com auxílio de pipetador multicanal calibrado (25 μ L), seguiram-se diluições duplas dos soros em solução salina tamponada (PBS), pH 7,2. Acrescentou-se a cada diluição do soro 25 μ L do antígeno contendo quatro unidades hemaglutinantes (UHA) e incubou-se o sistema à temperatura de 4°C, durante 20 minutos. Decorrido este prazo, adicionaram-se 25 μ L de suspensão de hemácias de galinha a 0,5%, padronizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 545nm, para uma absorbância entre 0,18 e 0,20. A seguir, incubou-se novamente o sistema a 4°C, e procedeu-se à leitura após a deposição total de hemácias nos testemunhos (cerca de 45 minutos).

O título foi expresso mediante a multiplicação do número de UHA usadas pela recíproca da maior diluição do soro que inibia completamente a hemaglutinação e transformados em log de base 2.

4.1.6. Desafio

Aos 60 dias de vida dos animais, dois gansos de cada repetição/tratamento, perfeitamente identificados com anilhas metálicas numeradas e colocadas na região da asa direita, foram desafiados com uma estirpe velogênica viscerotrópica (patogênica para galinhas) do VDN, com tempo médio de morte embrionária (TMM) e índice de patogenicidade intracerebral (IPIC), respectivamente, de 48 horas e de 1,78, cujo título foi obtido mediante determinação de sua dose infectante 50% (EID₅₀) em ovos embrionados de galinha de oito a 10 dias de incubação, conforme técnica descrita no item 4.1.3.1. Duzentos microlitros da suspensão do vírus contendo 10^{8,15} EID₅₀/0,1mL foram administrados por via óculo-nasal, de acordo com o que preconiza o "CODE OF FEDERAL REGULATIONS" (1993).

Para controle da patogenicidade da estirpe velogênica, do VDN, foi empregado um grupo de 12 aves SPF com 30 dias de idade e sem histórico de vacinação contra a DN, comprovado pelo teste de inibição da hemaglutinação

(HI/VDN). Nesses animais, criados em condições experimentais idênticas àquelas empregadas nos desafios dos gansos-da-China, também foram inoculadas com a estirpe virulenta em apreço.

O desafio foi realizado nas dependências do DPVE-FCAV-Unesp.

As aves foram alojadas em isoladores de pressão negativa, convencionalmente utilizados para infecções experimentais com patógenos aviários, com ar filtrado, água e ração à vontade.

A resistência ao desafio foi expressa em porcentagem de proteção total e refere-se não só à ausência de qualquer sinal clínico, como também de mortalidade nos gansos-da-China desafiados.

É importante enfatizar que ao término do experimento, as aves remanescentes foram sacrificadas e eliminadas obedecendo aos critérios de biossegurança, inclusive com a destruição dos restos das aves necropsiadas.

4.1.7. Observação clínica e necropsia

Após o desafio, as aves foram observadas, diariamente, durante 20 dias, para o registro dos sinais clínicos e da mortalidade. Em todas as aves submetidas e sucumbidas ao desafio, foram realizados exames necroscópicos.

4.1.8. Reação de Cadeia de Polimerase pós Transcrição Reversa (RT- PCR)

4.1.8.1. Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada a partir de amostras de suabes cloacais e traqueais (total de 96 suabes) colhidas de gansos-da-China, à véspera do desafio e decorridos 6, 10 e 20 dias após a inoculação dos gansos, e acondicionadas em tampão PBS e armazenadas à temperatura de -70°C. Para a extração foi utilizado o kit de extração QIAmp Viral RNA Mini Kit, Quiagem, USA. No momento da extração, as amostras foram descongeladas à temperatura de 4°C e 8°C e homogeneizadas em vortex por 15 segundos. Foram utilizados 140µL da amostra para a extração, conforme recomenda o kit de extração do fabricante.

4.1.8.2. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)

Os primers utilizados na presente investigação foram descritos por TOYODA et al. (1989) e utilizados por KANT et al. (1997), OBERDORFER & WERNER (1998), DEMÉTRIO (2002) e SOARES (2002). Tais primers reconhecem uma região do genoma viral que faz parte da porção responsável pela transcrição da proteína F₀, próximo ao sítio de clivagem desta proteína, os quais são capazes de identificar todas as estirpes do VDN já descritas, independentemente da amostra, da patogenicidade ou do hospedeiro envolvido. A localização destes primers no genoma viral foi descrita por TOYODA et al (1989). Os produtos finais da RT-PCR são fragmentos de nucleotídeos de 362 pb. Todos os primers foram sintetizados pela Invitrogen®, conforme sequência apresentadas a seguir:

PRIMER	LOCALIZAÇÃO(pb)	SEQUÊNCIA(5' - 3')
P1F(Sense)	141-159	TTG ATG GCA GGC CTC TTG C
P2R(Anti-Sense)	485-503	GGA GGA TGT TGG CAG CAT T

4.1.8.3. Síntese de cDNA – Transcrição reversa do RNA viral

Para a síntese de cDNA necessário se fez uma reação de pré transcrição, na qual 4µL do RNA extraído foram adicionados a 5µL do primer P1 F na concentração de 50 pMol e a 1µL de Água Mili Q autoclavada. A mistura foi submetida ao termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystems), com ciclo inicial de 95° C, por 3 minutos, a 50°C por 25 minutos e a 4° C até a amostra ser retirada da máquina. Após a retirada da máquina, foram adicionados os seguintes reagentes para a reação de transcrição reversa: 8,0 µL de First-strand buffer (5x - Invitrogen®); 4,0 µL de DTT – Dithiothreitol (10mM - Invitrogen®); 6,0 µL de dNTP (10mM - Biotools®); 0,5 µL de RnaseOUT (40U/ µL – Invitrogen®) e 1 µL de Superscript II (200U/ µL - Invitrogen®). As amostras foram submetidas ao seguinte programa do termociclador: 60 minutos a 42° C, 5 minutos a 95°C e a 4° C

até a retirada da máquina. O cDNA, quando não utilizado imediatamente foi acondicionado à temperatura de -70 °C até a realização da reação.

4.1.8.4. Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)

A amplificação foi efetuada a partir de 5,0 µL de cDNA, adicionado de 2 µL do primer sense e anti-sense (50 pMol), 8 µL de d NTP (1,25mM - Biotools®); 1,0 µL de TTH – DNA Polimerase (1U/ µL - Biotools®); 5 µL de Standard Buffer® (75 mM tris HCl; 2 mM MgCl; 50mM KCl; 20 mM (NH)₄ SO₄ – Biotools® e 27 µL de água Milli Q® autoclavada. A amplificação foi efetuada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*®). O programa consta de uma etapa de 94^oC por 5' (desnaturação inicial e ativação da enzima), seguida de 35 ciclos de 94^oC por 1'00"/ 50^oC por 1'30"/ 72^oC por 1' e uma etapa final de 72^oC por 5'. Após esta etapa final, a temperatura permaneceu a 4^oC até a retirada da amostra.

4.1.8.5. Detecção do produto amplificado

Os fragmentos gerados na PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen®). Para tanto, uma mistura de 8,0 µL de cada produto amplificado com 2 µL de tampão de corrida foi colocada em um poço do gel, preparado a 1,5% (peso/volume) em tampão TBE 1x(45mM de Tris-Borato e 1mM de EDTA, pH 8,0), com brometo de etídio numa concentração final de 0,5 µg/mL. O gel era submetido à eletroforese sob voltagem de 100 volts, durante 50 minutos e o produto amplificado (amplicons) visualizados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta.

4.1.9. Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, três repetições e 10 aves por parcela.

Na verificação do grau de imunidade pós-vacinal nos diferentes lotes de gansos-da-China experimentais, aplicou-se um modelo de análise de variância descrito por STEEL & TORRIE (1980).

Nos casos em que foram constatadas diferenças significativas, foram executados contrastes, através do teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

4.2. EXPERIMENTO 2

4.2.1. Instalações

O experimento foi realizado no aviário experimental do DPVE-FCAV-Unesp.

As aves foram alojadas em isoladores de pressão negativa, convencionalmente utilizados para infecções experimentais com patógenos aviários, permanecendo nove aves por isolador.

4.2.2. Aves experimentais

Foram utilizadas aves SPF conviventes com gansos-da-China inoculados com uma estirpe velogênica viscerotrópica do VDN, patogênica para galinhas. Cada grupo foi constituído por seis aves SPF e três gansos. Foram empregados gansos com sete dias de idade, sem histórico de vacinação ou contato com o VDN, comprovado pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI).

Decorridos seis (Grupo 1) e 14 (Grupo 2) dias após a inoculação dos gansos-da-China com uma estirpe virulenta do VDN, seis aves SPF foram alojadas junto a cada grupo de gansos-da-China, havendo contato direto/íntimo entre as espécies, para o esclarecimento do real papel exercido pela espécie *Anser cygnoides*, na condição de possível disseminadora de VDN para aves domésticas conviventes.

4.2.3. Desafio

Após aclimatação dos animais nos isoladores, os gansos de todos os grupos foram inoculados com uma estirpe patogênica do VDN, caracterizada no item 4.1.8. (EXPERIMENTO 1). Desse modo, 200 µL da suspensão do vírus contendo $10^{8,15}$ EID₅₀/0,1 mL foram administrados, via óculo-nasal a cada ganso-da-China, de acordo com o que preconiza o "CODE OF FEDERAL REGULATIONS" (1993).

Para controle da patogenicidade da estirpe patogênica, do VDN, um lote constituído por seis aves SPF também foi inoculado com o vírion e alojado em isolador distinto daqueles dos grupos de animais em estudo.

4.2.4. Observação clínica e necropsopia

Após o desafio, em cada grupo, as aves SPF conviventes com gansos-da-China inoculados com a amostra patogênica do VDN, foram observadas, diariamente, durante 20 dias, para o registro dos sinais clínicos e da mortalidade. Necropsopia foi realizada nas aves SPF mortas durante o ensaio.

4.2.5. Reação de Cadeia de Polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR)

A extração do RNA viral foi realizada a partir de amostras de suabes cloacais no total de 36 amostras, colhidas de gansos-da-China e aves SPF, à véspera do desafio e decorridos seis, 10 e 20 dias após a inoculação dos gansos, e usadas conforme técnica descrita no item 4.1.10 (EXPERIMENTO 1).

4.2.6. Colheita de sangue

Decorridos cinco a seis dias após o alojamento das aves SPF junto a cada grupo de gansos-da-China e/ou três dias após o aparecimento ou não de sintomatologia sugestiva da moléstia de Newcastle em aves SPF conviventes com gansos-da-China inoculados com uma estirpe patogênica do VDN, amostras de sangue de 100,0% das aves SPF, colhidas de todos os grupos, mediante punção da veia jugular/ulnar, foram então processadas, de acordo com a técnica descrita no item 4.1.6. (EXPERIMENTO 1). Os soros obtidos, provenientes de três colheitas de sangue, no total, foram então acondicionados em tubos Eppendorf e armazenados a -20°C até o momento do uso.

4.2.7. Reação de inibição da hemaglutinação (HI)

As amostras de soro obtidas no período experimental foram submetidas à reação de inibição da hemaglutinação (HI), conforme descrito no item 4.1.7. (EXPERIMENTO 1).

4.3. EXPERIMENTO 3

Os itens correspondentes às instalações, manejo e nutrição, vacinas vivas, vacinação via ocular, esquemas de vacinação e exames clínicos seguiram a mesma metodologia adotada no EXPERIMENTO 1.

4.3.1 Proteinograma sérico

Alíquotas de soro foram separadas durante as colheitas para determinação das concentrações de proteínas totais, albumina e globulinas. Foram dosadas as concentrações séricas de proteínas totais e albumina, e calculadas as concentrações de globulinas e a proporção albumina/globulina, aos sete, 21, 28, 35, 42 e 49 dias de idade. Em cada data, foram colhidas 36 amostras de soro, sendo nove por tratamento, totalizando 216 amostras.

Os testes foram realizados utilizando-se conjuntos de reagentes de uso comercial (Labtest Diagnóstica®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Labquest, Labtest®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasi) semi-automático, com comprimentos de onda específicos para cada constituinte, sendo de 545nm para proteínas totais e 645nm para albumina.

As concentrações das proteínas séricas totais foram determinadas pelo método do biureto. Albumina pelo método do verde de bromocresol. As concentrações das globulinas foram determinadas pela diferença entre a concentração das proteínas totais e da albumina. A proporção albumina/globulina foi calculada pela divisão da concentração da albumina pela concentração da globulina.

4.3.2.Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, três repetições e três aves por parcela.

Os dados foram analisados pelo ANOVA e aqueles com diferença significativa foram submetidos ao teste de Tukey, com 0,05% de significância ($p < 0,05$), pelo Statview® (versão 5.0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EXPERIMENTO 1

5.1.1. Exame físico

Lotes de gansos-da-China vacinados e revacinados, via ocular, com as estirpes Ulster 2C (Grupo I), B1 (Grupo II) ou LaSota (Grupo III) não mostraram sinais clínicos de reação pós-vacinal ou qualquer alteração sugestiva de reações respiratórias pós-vacinais.

A gravidade e a extensão das reações pós-vacinais dependem de inúmeros fatores, tais como, da amostra de vírus vacinal, da presença ou não de outros agentes infecciosos, como o *Mycoplasma gallisepticum* e da via de administração da vacina (BEARD et al., 1993).

Em aves jovens, principalmente em pintos de corte, as reações pós-vacinais causadas pela administração de estirpes lentogênicas ou vacinais contra a DN, dependem principalmente da via ou processo vacinal empregado, conforme LANCASTER, 1964. Com relação a esse aspecto, dentre os métodos de imunização aplicados, o aerossol tem sido o mais incriminado em casos de reações pós-vacinais, sendo freqüentemente associado às reações respiratórias graves e mortalidade variável observadas após o seu emprego. Tal reação pode ser ainda exacerbada quando o diâmetro da gota nebulizada é demasiadamente pequeno, facilitando sua penetração no parênquima pulmonar e sacos aéreos, ou quando se têm outras infecções respiratórias latentes, que se acentuam pelo estímulo vacinal, conforme relatos de DUEE & DIERS (1967); MEULEMANS (1975) e VILLEGAS et al. (1976).

Por outro lado, os métodos ocular e oral têm sido associados com mínimas reações respiratórias pós-vacinais (BEARD & HANSON, 1984; SILVA, 1995; DORETTO JÚNIOR, 1997).

À observação clínica então, os gansos-da-China vacinados e revacinados com as estirpes B1 (Grupo II) e LaSota (Grupo III), via ocular, não apresentaram

qualquer alteração sugestiva de reações respiratórias pós-vacinais. Neste aspecto, parece prudente a suposição que a não constatação de estresses respiratórios pós-vacinais em gansos-da-China tenham sofrido influência da ausência de infecções concomitantes com outros agentes infecciosos, como o *Mycoplasma sp.*; não provocando assim reações respiratórias pós-vacinais associadas às condições controladas do experimento.

A propósito, literatura pertinente (DORETTO JÚNIOR, 1997, LIMA, 2005) respectivamente em pintos de corte e galinhas d'angola de diferentes idades, indica ausência de sinais clínicos de reação vacinal com o emprego da amostra Ulster 2C, pelos métodos spray, ocular e oral, enquanto que com a aplicação da mesma estirpe vacinal, pelo processo aerossol, foram observadas tão somente alterações muito suaves de natureza respiratória.

5.1.2. Exame sorológico

As médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) dos soros dos gansos-da-China estão presentes na Tabela 2. As aves deste ensaio, procedentes de matrizes não imunizadas contra a doença de Newcastle, independentemente do tratamento vacinal, apresentaram-se destituídas de anticorpos passivos (maternos) aferidos pela reação de HI aos sete dias de idade. A partir dos 21 dias de idade, os títulos de HI dos soros dos gansos-da-China (Grupos I a III) já eram decorrentes da imunização ativa, através do emprego das estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota, conforme o grupo (Tabela 2).

Analisando a Tabela 2, nota-se que o grupo controle não apresentou níveis de anticorpos séricos detectáveis contra a DN. Este resultado era esperado, pois tais aves não foram imunizadas contra a DN. De outra parte, todos os lotes de gansos-da-China que receberam vacinas preparadas com as amostras Ulster 2C, B1 e LaSota, em processo de vacinação e revacinação contra a DN (Grupos I, II e III), em linhas gerais, responderam ao estímulo antigênico, produzindo títulos de anticorpos aferidos pelo HI, os quais permaneceram até o final do período experimental. Conforme os dados consignados na Tabela 2, as melhores médias

registradas (5,8; 6,0 e 6,4) foram moderadas, sendo obtidas aos 21 ou 35 dias de idade, com as estirpes Ulster 2C e B1.

Nesse contexto, as características das amostras vacinais ensaiadas, quais sejam, a baixa invasibilidade da estirpe B1 (HOFSTAD, 1951) e o baixo potencial de difusão da estirpe Ulster 2C (McFERRAN & NELSON, 1971) estão compatíveis com os títulos moderados de anticorpos aferidos pelo teste de HI e detectados nos soros dos gansos-da-China (Grupos I e II).

Por outro lado, os títulos também moderados de anticorpos detectados nos soros dos gansos-da-China vacinados com a cepa LaSota (Grupo III) não estão compatíveis com o grande potencial de difusão desta estirpe (WINTERFIELD et al., 1957). Em linhas gerais, tais reflexões coincidem substancialmente com os resultados estatísticos em questão que não evidenciaram, diferenças significativas ($p > 0,05$), entre os lotes de gansos-da-China vacinados com as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota (grupo I a III).

Considerando-se que esses e os outros resultados anteriores possam ser transferidos à atividade produtiva, parece razoável especular que ficou evidenciado o valor prático dos programas imunoproliféricos ensaiados, mediante o uso de vacinas preparadas com as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota, como agente imunizante para gansos-da-China, estabelecendo-se assim caminhos mais seguros para a produção de proteínas de origem animal – com reflexos positivos no setor produtivo.

Tabela 2. Médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) (\log_2) dos soros dos gansos-da-China (*Anser cygnoides*) submetidos a diferentes esquemas de vacinação, contra a Doença de Newcastle, em período compreendido entre sete e 49 dias de idade nos diferentes grupos (n=120).

Grupo	Vacinação	Revacinação Via ocular	Médias geométricas dos títulos de HI (\log_2)								
			7 dias	28 dias	Idade das aves (dias)						
					7	14	21	28	35	42	49
I	Ulster 2C	Ulster 2C	0,0	0,0	4,0 ^a	3,0 ^{ad}	5,8 ^a	3,0 ^a	3,6 ^b		
II	B ₁	B ₁	0,0	0,0	6,0 ^a	3,6 ^b	6,4 ^a	4,0 ^a	2,6 ^a		
III	LaSota	LaSota	0,0	0,0	4,8 ^{ab}	3,0 ^a	4,2 ^a	3,2 ^a	2,8 ^{ab}		
IV*	-	-	0,0	0,0	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^c		

* Grupo controle – não recebeu vacina.

¹ Médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.1.3. Desafio

Os resultados do desafio com vírus patogênico da DN, em gansos-da-China, aos 60 dias de vida, estão presentes na Tabela 3.

Para controle da patogenicidade da estirpe virulenta, do VDN, foi utilizado um grupo de aves SPF, comprovado pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI). Neste lote, como pode ser observado na Tabela 3, 100,0% das aves sucumbiram ao desafio.

Nas aves SPF, os sinais clínicos mais evidentes, com início 72 horas após a inoculação do VDN, foram caracterizados, a princípio, por apatia, anorexia, penas eriçadas e conjuntivite, seguidos de espirros e crepitações. Na seqüência, foram observados sinais clínicos mais severos, como dispnéia, diarreia profusa com fezes

esverdeadas, corrimento naso-ocular abundante e mucóide, terminando com prostração e morte.

Já as alterações anatomopatológicas mais observáveis, via de regra, foram aquelas de natureza hemorrágica. Transtornos circulatórios constituíram a faceta dominante ao exame anatomopatológico “post-mortem”, compondo o principal quadro lesional da DN. Desse modo, foram observados processos hemorrágicos na mucosa do proventrículo sob a forma de sufusões. Similarmente, alterações severas de caráter necrótico-hemorrágicas foram constatadas em nível intestinal e de tonsilas cecais.

Os distúrbios circulatórios de vias aéreas superiores foram caracterizados por hemorragias entre os anéis traqueais, acompanhados de exsudato catarral luminal, estando compatíveis com o descrito por PAULILLO & DORETTO JÚNIOR (2000) e DORETTO JÚNIOR & PAULILLO (2007).

Tabela 3. Resultados do desafio com vírus patogênico da Doença de Newcastle, em gansos-da-China (*Anser cygnoides*), aos 60 dias de idade, nos diferentes grupos.

Grupo	Vacinação (7 dias)	Via de Administração	Revacinação Via ocular (28 dias)	Nº de Aves Testadas	% média de Proteção ao desafio com o VDN
I	Ulster 2C	Ocular	Ulster 2C	6	100,0
II	B1	Ocular	B1	6	100,0
III	LaSota	Ocular	LaSota	6	100,0
IV*	Controle	---	---	6	100,0
AVES “SPF” (“Specific pathogen free”) **				12	0,0

*Grupo controle – não vacinado

** Controle da patogenicidade do VDN

Outro aspecto pertinente diz respeito aos resultados do desafio dos gansos-da-China vacinados ou não contra a DN (Grupos I a IV) (Tabela 4). Curiosamente,

os animais do grupo controle (Grupo IV) não evidenciaram sinais e lesões sugestivos da DN, mostrando-se refratários à doença clínica com o VDN.

Nesse aspecto, os termos da presente pesquisa estão parcialmente compatíveis com a asserção de REIS & NÓBREGA (1956). Segundo esses autores, em gansos, resultados positivos e negativos têm sido reportados. De um modo geral, os gansos podem ou não contrair a doença clínica com o VDN.

Também nesse aspecto, os resultados da presente pesquisa estão discordantes daqueles obtidos por WAN et al (2004). Esses autores reproduziram experimentalmente a DN em gansos não somente com duas amostras originárias de ganso, mas também com cepas da DN originárias de galinha e pertencentes aos genótipos VI, VII, VIII e IX e observaram a morte em 75% dos gansos e em 100% das galinhas.

Parece razoável especular que esses fatos estejam ligados ao fenômeno da recombinação genética presente em populações e subpopulações de partículas virais do VDN, com reflexo na resistência dos gansos-da-China à enfermidade de Newcastle.

Nos lotes de animais vacinados (Grupos I a III), como se poderia esperar, o percentual médio de proteção aos desafios foi elevado - 100,0% (Tabela 3).

A propósito, existe alguma evidência de que estirpes patogênicas, do VDN, provenientes de outras espécies, somente demonstram sua verdadeira patogenicidade após sua primeira passagem em frangos de corte (ALEXANDER, 1997), ou após sua adaptação ao novo hospedeiro. Resultados semelhantes foram descritos por ISLAM et al. (1994), que indicam o aumento da patogenicidade de amostras mesogênicas ou patogênicas do VDN, isoladas de codornas e passadas para galinhas, indução essa possível graças à aquisição de propriedades de neurotropismo e pantropismo através da passagem intracerebral em galinhas susceptíveis.

Neste enfoque, parece sensato concluir que estirpes patogênicas do VDN oriundas de frangos de corte, somente evidenciam sua real patogenicidade após sua adaptação em gansos-da-China (*Anser cygnoides*), o que poderia explicar a

discrepância de resultados e de deduções deste trabalho com as assertivas de REIS & NÓBREGA (1956) e de WAN et al. (2004).

Outro aspecto pertinente está associado ao fenômeno da mutação presente em amostras do VDN, originando novas cepas desse vírus, provavelmente com alteração da seqüência dos aminoácidos básicos presentes no sítio de clivagem F0. Infortunadamente, a freqüência de tal evento, qual seja, a taxa de mutação do VDN, é desconhecida na história da enfermidade de Newcastle (KING, 1999). Certamente, a freqüência de mutação do VDN é muito inferior à observada em outros sistemas, quais sejam, doença infecciosa da bursa e bronquite infecciosa das galinhas, o que vem enfatizar a importância dos achados desta pesquisa e possivelmente justificar sua divergência parcial com a asserção também de REIS & NÓBREGA (1956) e WAN et al.(2004).

É oportuno enfatizar que a coabitação de aves infectadas com o vírus patogênico da doença de Newcastle com aves sadias (vacinadas ou não) é a situação que mais simula o que realmente acontece em condições de campo. Entretanto, no presente ensaio, as aves foram infectadas, individualmente, por instilação óculo-nasal de vírus patogênico. A escolha de tal via deu-se, sobretudo, com o intuito de melhor reproduzir a via de infecção normal. Desse modo, pode-se afirmar que todas as aves desafiadas receberam a mesma quantidade de vírus, com o mesmo título infectante, em idênticas condições experimentais, o que não aconteceria se o modo de desafio simulasse a infecção natural.

É importante frisar, mais uma vez, que 100,0% das aves SPF sucumbiram ao desafio. À observação clínica e à necropsopia, as aves apresentaram sinais clínicos e lesões sugestivas da DN (forma patogênica), o que demonstra que o vírus utilizado na prova virulenta foi adequado e reforça a validade dos resultados obtidos.

A propósito, também nesse lote de aves SPF, através da RT-PCR, foi detectada a estirpe virulenta, do VDN, a partir de exsudato traqueal e cloacal utilizados na prova de desafio, como também “identificada”, mediante o emprego das reações de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (HI). Tal amostra

do VDN, quando inoculada em aves SPF, resultava em mortalidade de 100,0% dos animais.

5.1.4. Pesquisa do genoma do vírus de Newcastle (VDN)

Os resultados da RT-PCR, dos gansos-da-China, após o desafio, nos diferentes grupos, estão presente na Tabela 4.

Examinando a Tabela 4, com particular atenção ao lote de gansos-da-China controle (Grupo IV), observa-se que a detecção de material genético do VDN da cloaca e traquéia ocorreu aos 20 dias do período pós-desafio, confirmando assim a susceptibilidade desta espécie ao VDN, consoante REIS & NÓBREGA (1956). Em contraste, nos lotes de gansos-da-China vacinados (Grupos I a III), decorridos seis, 10 e 20 dias após a inoculação da estirpe virulenta do VDN, a pesquisa de material genético do VDN foi nula.

Pelos resultados obtidos, neste estudo com os gansos-da-China (*Anser cygnoides*) controle (Grupo IV), ficou demonstrado o estado de portador de VDN por esta espécie animal, decorridos 20 dias da infecção experimental com este patógeno (Tabela 4)

O fato de não ter sido revelado material genético do VDN de gansos-da-China vacinados (Grupos I a III) torna evidente a importância da vacinação nesta espécie, pois estando as aves vacinadas, não haveria possibilidade de replicação do VDN em quantidade suficiente para a infecção posterior de outras espécies de aves domésticas ou silvestres conviventes.

Nesse enfoque, ressalte-se aqui, mais uma vez, que a ampla cobertura vacinal recebida pelos gansos-da-China (*Anser cygnoides*) (Grupos I a III), indubitavelmente, contribuiu efetivamente para a detecção de material genético do VDN nesta espécie animal. Em verdade, a instituição de programas imunoproláticos contra a enfermidade de Newcastle e específicos para criação de gansos-da-China, ao menos, neste estudo, passou a se constituir, ainda que em potencial, fator limitante para criações de aves domésticas conviventes.

Os dados em questão suscitam a reflexão para um aspecto epidemiológico de fundamental importância na doença de Newcastle, qual seja, o estado portador de VDN do ganso-da-China e a importância da imunoprofilaxia na supressão deste estado.

Finalmente, deveriam ser realizados estudos em gansos-da-China inoculados experimentalmente com o VDN, para estabelecer a importância do seu estado do portador.

Tabela 4. Resultados da presença de genoma viral do vírus de Newcastle, por reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa, a partir de suabes de traquéia e cloaca dos gansos-da-China (*Anser cygnoides*) vacinados e revacinados contra a Doença de Newcastle, obtidos aos seis, 10 e 20 dias pós-desafio, nos diferentes grupos experimentais

Grupo	Vacinação (7 dias)	Revacinação Via ocular (28 dias)	Genoma viral do VDN (RT-PCR)					
			6		10		20	
			T	C	T	C	T	C
I	Ulster 2C	Ulster 2C	-	-	-	-	-	-
II	B1	B1	-	-	-	-	-	-
III	LaSota	LaSota	-	-	-	-	-	-
IV*	Controle	- - -	-	-	-	-	+	+

*Grupo controle – não vacinado
dpi – dias pós inoculação/desafio
T = suabe colhido da região traqueal
C = suabe colhido da região cloacal
+ = isolamento da estirpe patogênica do VDN
- = ausência da estirpe patogênica do VDN
RT-PCR=Reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa

5.2. EXPERIMENTO 2

5.2.1. Desafio, observação clínica, necropsopia, reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR) e reação de inibição da hemaglutinação (HI)

5.2.1.1. Aves SPF e gansos-da-China inoculados com o VDN

As aves SPF utilizadas para controle da patogenicidade da estirpe virulenta, do VDN, sucumbiram três dias após o desafio. Sinais clínicos e lesões sugestivas da DN foram similares àqueles descritos no item 5.1.3. (EXPERIMENTO 1), seguindo-se a pesquisa de genoma viral do VDN através da RT-PCR e a “identificação” do VDN, conforme técnica e critérios estabelecidos, respectivamente, no item 4.1.10. (EXPERIMENTO 1).

Por outro lado, 100,0% dos gansos-da-China de cada grupo não apresentaram sinais clínicos e lesões sugestivas da DN, mostrando-se refratários à doença clínica com o VDN, sendo, portanto, tais dados similares aos resultados obtidos no EXPERIMENTO 1.

O tempo de replicação da estirpe patogênica, do VDN, em gansos-da-China, também foi estudado neste experimento. Assim, são apresentados, na Tabela 5, os resultados da presença de genoma viral do VDN, por RT-PCR, em gansos-da-China, em período pós-desafio ou não. Analisando a Tabela 5, verifica-se que a detecção de material genético do VDN das fezes ocorreu aos 20 dias pós-desafio.

Da mesma forma, também em gansos-da-China, à véspera do desafio a pesquisa de material genético do VDN das fezes foi nula (Tabela 6), permitindo considerá-las isentas de infecção pelo VDN.

O fato de ter sido detectado material genético da estirpe virulenta do VDN em gansos-da-China e tendo em vista o número de amostras examinadas, permitiu caracterizar o estado de portador de VDN desta espécie animal, 20 dias após a infecção experimental com este patógeno. Esses resultados, analisados dentro do enfoque epidemiológico da doença de Newcastle, induzem à ponderação de que os gansos-da-China (*Anser cygnoides*), possuem estado de portador do VDN, a partir

dos 20 dias pós-desafio. Tal fato pode se constituir em um problema para a avicultura comercial.

Tabela 5. Resultados da presença de genoma viral da estirpe patogênica, do vírus da Doença de Newcastle, por Reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa, em gansos-da-China (*Anser cygnoides*) não vacinados contra a DN, à véspera do desafio e aos seis, 10 e 20 dias pós-desafio.

Aves	Exame de material genético do VDN			
	VD	6dpi	10dpi	20dpi
Gansos-da- China (<i>Anser cygnoides</i>)	-	-	-	+

5.2.2. Observação clínica, necropsopia, Reação de Cadeia de Polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR) e sorologia (HI)

5.2.2.1. Aves SPF conviventes com gansos-da-China inoculados com o VDN

Os dados apresentados na Tabela 6 mostram que 100,0% das aves SPF conviventes com gansos-da-China infectados com uma estirpe patogênica do VDN, decorridos seis (Grupo 1) e 14 (Grupo 2) dias pós-desafio sucumbiram após o contato direto com gansos desafiados. Os sinais clínicos e lesões sugestivas da DN (Figura 3) foram semelhantes àqueles outros observados e expostos no item 5.1.3. (EXPERIMENTO 1), confirmados pela pesquisa de material genético do VDN, de acordo com a metodologia e critérios aplicados, respectivamente, nos itens 4.1.3.1. e 4.1.10. (EXPERIMENTO 1), além do título médio de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) obtido (da ordem de \log_2 4,50) conforme técnica descrita no item 4.1.7.2. (EXPERIMENTO 1).

Por tais resultados, é certo que os gansos-da-China inoculados com o VDN, embora não tenham contraído ou manifestado a doença clínica, eliminaram vírus em

quantidade suficiente para induzir infecção e doença clínica nas aves SPF conviventes. Além disso, obviamente, as aves SPF conviventes com os gansos-da-China inoculados com o VDN não eram vacinadas contra a enfermidade de Newcastle e, portanto, não possuíam imunidade para impedir a infecção e o surgimento da sintomatologia clínica sugestiva da DN. Em adição, nas aves domésticas, algumas estirpes patogênicas do VDN causam mortalidade logo após à introdução de apenas pequena quantidade de unidades infecciosas do VDN, enquanto outras necessitam de um milhão ou mais de unidades infecciosas de vírus para induzir mortalidade (BEARD & HANSON, 1984).



Figura 3. Proventrículos e traquéias hemorrágicos de aves SPF colocadas em contato com gansos-da-China inoculados com o vírus da doença de Newcastle.

Tabela 6. Resultados da observação clínica, necropsopia, pesquisa da presença de genoma viral do vírus de Newcastle, e sorologia (HI) das aves SPF conviventes com gansos-da-China inoculados com o vírus de Newcastle decorridos seis (Grupo 1) e 14 (Grupo 2) dias pós-desafio.

Parâmetros avaliados	Aves SPF conviventes com gansos-da-China Inoculados com o VDN	
	6 dpi	14 dpi
Sinais clínicos sugestivos da DN	+	+
Mortalidade (%)	100	100
Lesões sugestivas da DN	+	+
RT-PCR (T e C)	+	+
Sorologia (HI)	+	+

dpi = dias pós inoculação/desafio

VDN = vírus da doença de Newcastle

T = suabe da traquéia

C = suabe da cloaca

HI = Teste de inibição da hemaglutinação

+ = positiva = presente (s)

- = negativa = ausente (s)

RT-PCR: Reação em cadeia pela polimerase pós transcrição reversa

5.3.EXPERIMENTO 3

5.3.1. Proteinograma sérico

Os resultados estatísticos não evidenciaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores de proteínas totais (Tabela 7), globulinas (Tabela 9) e proporção albumina/ globulinas (Tabela 10), dos lotes de gansos-da-China controle e vacinados com as estirpes Ulster 2C, B1 e Lasota, nas diferentes idades avaliadas.

No entanto, nota-se que aos 42 dias de idade (Tabela 8), de forma geral, os gansos vacinados com as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle para as concentrações séricas de albumina, especialmente o grupo vacinado com a estirpe LaSota. Pode-se supor, em linhas gerais, que as vacinações, independentemente da estirpe vacinal, causaram diminuição das concentrações de albumina sérica. Infecções virais podem diminuir a concentração sérica de proteínas em aves. A diminuição da concentração de albumina foi observada em aves inoculadas com o VDN (RIVETZ et al; 1977). Aparentemente, esta alteração está relacionada com a redução da ingestão de alimentos, causada por anorexia, uma vez que a estirpe vacinal LaSota tem maior poder de difusão (WINTERFIELD et al.,1957) quando comparada as demais estirpes vacinais utilizadas neste estudo.

Por outro lado, a albumina é uma proteína de fase aguda negativa que apresenta diminuição gradual de sua concentração nos casos de inflamação crônica (ECKERSALL, 2008). No entanto, seria necessário determinar o perfil eletroforético das proteínas pela técnica SDS-PAGE dos gansos-da-China vacinados ou não contra a DN para que fossem possível esclarecer o real motivo da hipoalbuminemia nas aves vacinadas com a estirpe LaSota aos 42 dias de idade.

Tabela 7. Concentração sérica de proteínas totais (g/dL) de gansos-da-China (*Anser cygnoides*), submetidos a diferentes programas de vacinação contra a doença de Newcastle, aos sete, 21, 28, 35, 42 e 49 dias de idade.

Grupo	Vacinação	Revacinação	Médias e desvios-padrão proteínas (g/dL)					
			7 dias	28 dias	Idade das aves (dias)			
					7	21	28	35
I	Ulster 2C	Ulster 2C	3,77± 0,35 ^a	3,78± 0,87 ^a	4,36± 0,04 ^a	4,63± 0,77 ^a	4,08± 0,31 ^a	4,14± 0,31 ^a
II	B ₁	B ₁	4,15± 0,93 ^a	4,20± 0,71 ^a	4,24± 0,40 ^a	4,23± 0,28 ^a	4,16± 0,78 ^a	4,14± 0,28 ^a
III	LaSota	LaSota	3,89± 0,14 ^a	4,32± 0,68 ^a	4,56± 1,0 ^a	4,21± 0,26 ^a	3,98± 1,1 ^a	4,20± 0,43 ^a
IV*	-	-	4,01± 0,52 ^a	4,18± 0,29 ^a	4,36± 0,96 ^a	4,43± 0,43 ^a	4,38± 0,55 ^a	4,20± 0,66 ^a

*Grupo controle – não recebeu vacina

¹Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Tabela 8. Concentração sérica de albumina (g/dL) em gansos-da-China (*Anser cygnoides*), submetidos a diferentes programas de vacinação contra a DN, aos sete, 21, 28, 35, 42 e 49 de idade.

Grupo	Vacinação	Revacinação	Médias e desvios-padrão albumina (g/dL)					
			7 dias	28 dias	Idade das aves (dias)			
					7	21	28	35
I	Ulster 2C	Ulster 2C	1,48± 0,18 ^a	1,21± 0,87 ^a	1,39± 0,02 ^a	1,57± 0,41 ^a	1,27± 0,15 ^{ab}	1,23± 0,38 ^a
II	B ₁	B ₁	1,47± 0,34 ^a	2,13± 0,67 ^a	1,40± 0,11 ^a	1,39± 0,43 ^a	1,20± 0,31 ^{ab}	1,19± 0,72 ^a
III	LaSota	LaSota	1,17± 0,56 ^a	1,88± 0,32 ^a	1,48± 0,47 ^a	1,43± 0,41 ^a	1,06± 0,27 ^b	1,23± 0,92 ^a
IV*	-	-	1,32± 0,22 ^a	1,76± 0,27 ^a	4,36± 0,96 ^a	1,50± 0,45 ^a	1,49± 0,38 ^a	1,24± 0,34 ^a

*Grupo controle – não recebeu vacina

¹Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Tabela 9. Concentração sérica de globulinas (g/dL) em gansos-da-China (*Anser cygnoides*), submetidos a diferentes programas de vacinação contra a DN, aos sete, 21, 28, 35, 42 e 49 de idade.

Grupo	Vacinação	Revacinação	Médias e desvios-padrão globulina (g/dL)					
			Idade das aves (dias)					
			7	21	28	35	42	49
I	Ulster 2C	Ulster 2C	2,29± 0,51 ^a	2,57± 0,90 ^a	2,96± 0,06 ^a	3,14± 0,55 ^a	2,81± 0,26 ^a	2,76± 0,54 ^a
II	B ₁	B ₁	2,67± 1,1 ^a	2,07± 0,53 ^a	2,83± 0,43 ^a	2,84± 0,35 ^a	2,95± 0,62 ^a	2,94± 0,23 ^a
III	LaSota	LaSota	2,72± 0,09 ^a	2,43± 0,76 ^a	3,08± 0,66 ^a	2,78± 0,36 ^a	2,92± 0,87 ^a	2,97± 0,41 ^a
IV*	-	-	2,68± 0,61 ^a	2,41± 0,45 ^a	2,77± 0,60 ^a	2,92± 0,41 ^a	2,89± 0,46 ^a	2,95± 0,44 ^a

*Grupo controle – não recebeu vacina

¹Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

Tabela 10. Proporção Albumina/globulina em gansos-da-China (*Anser cygnoides*), submetidos a diferentes programas de vacinação contra a DN, aos sete, 21, 28, 35, 42 e 49 de idade.

Grupo	Vacinação	Revacinação	Médias e desvios-padrão albumina (g/dL)					
			Idade das aves (dias)					
			7	21	28	35	42	49
I	Ulster 2C	Ulster 2C	0,67± 0,20 ^a	0,51± 0,17 ^a	0,48± 0,02 ^a	0,50± 0,10 ^a	0,45± 0,07 ^a	0,49± 0,25 ^a
II	B ₁	B ₁	0,66± 0,44 ^a	1,09± 0,46 ^a	0,51± 0,08 ^a	0,51± 0,20 ^a	0,42± 0,10 ^a	0,41± 0,02 ^a
III	LaSota	LaSota	0,43± 0,01 ^a	0,83± 0,35 ^a	0,49± 0,06 ^a	0,59± 0,30 ^a	0,38± 0,04 ^b	0,43± 0,06 ^a
IV*	-	-	0,53± 0,24 ^a	0,75± 0,24 ^a	0,57± 0,02 ^a	0,53± 0,41 ^a	0,53± 0,10 ^a	0,43± 0,09 ^a

*Grupo controle – não recebeu vacina

¹Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

6. CONCLUSÕES

Os resultados, discutidos e interpretados à luz da bibliografia compulsada, conduzem às seguintes inferências:

1. As vacinações utilizando as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota não se mostraram associadas com sinais clínicos da reação vacinal em gansos-da-China;
2. Os programas imunoproláticos ensaiados, mediante o emprego das amostras vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota foram igualmente eficientes no estímulo da resposta imune humoral (HI);
3. Os gansos-da-China (*Anser cygnoides*) mostraram-se refratários à enfermidade clínica após o desafio com VDN patogênico;
4. Os gansos-da-China (*Anser cygnoides*) mostram-se sensíveis à infecção experimental com o VDN patogênico;
5. Ficou demonstrado o estado de portador de VDN dos gansos-da-China, decorridos 20 dias da infecção experimental com este patógeno;
6. Ficou caracterizada a importância da imunoprolaxia na supressão do estado de portador do VDN do ganso-da-China;
7. Ficou evidenciada a importância do ganso-da-China (*Anser cygnoides*) do ponto de vista epidemiológico, como fonte disseminadora do VDN para aves SPF conviventes, decorridos até 14 dias da infecção experimental com este patógeno;
8. As concentrações de albumina sérica em gansos-da-China foram afetadas pelas estirpes vacinais, especialmente a LaSota, aos 42 dias de idade, após a revacinação contra a DN.

7. REFERÊNCIAS²

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease virus - An avian paramyxovirus. In: 6. **Newcastle disease**. Boston: Kluwer Academic, 1988. p. 11-22.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: HOFSTAD, M.S.; BARNES, H.J.; CALNEK, B.W.; REID, W.M.; YODER, H.N. **Diseases of poultry**. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 496-519.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: HOFSTAD, M.S.; BARNES, H.J.; CALNEK, B.W.; REID, W.M.; YODER, H.N. **Diseases of poultry**. 10th ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 541-569.

AWAN, M. A.; OTTE, M. J.; JAMES, S. A. D. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 23, p. 405-423, 1994.

BEARD, C. W.; HANSON, R. P. Newcastle disease. In : HOFSTAD, M.S.; BARNES, H.J.; CALNEK, B.W.; REID, W.M.; YODER, H.N. (Ed.). **Diseases of poultry**. 8 ed. Ames: Iowa State University Press, 1984, p. 452-470.

BEARD, C. W.; VILLEGAS, P.; GLISSON, J. R. Comparative efficacy of the B₁ and VG-GA vaccine against velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 37, p. 222-225, 1993.

BOCKMA, B. Report of the committee on transmissible diseases of poultry and other avian species. In: THE UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION (USAHA), 1998. **Proceedings ...** p. 638-639.

² Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023: informação e documentação, referência elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BORLAND, L. J.; ALLAN, W. H. Laboratory tests for comparing live lentogenic Newcastle disease vaccines. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 9, n. 1, p. 45-59, 1980.

BRASIL - Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MAA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola: atos legais**. Brasília, 1994. 81 p.

BUCKLAND, R.; GUY, G. **Goose production**: F.A.O Animal Production Health Paper. Rome, 2002, p. 154.

CAMPBELL, T. W. Clinical Chemistry of Birds. In: THRALL, M. A. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Philadelphia; Lippincott, Williams & Wikins, 2004. p. 479-492.

CLASS, E. C. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. **Lancet** **351**, London, v. 910, p. 427-437, 1998.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS. **Animal and animal products**. Washington: National Archives and Records Administration, 1993, 818 p.

CUNHA, R. G.; SILVA, R. A. Isolamento e identificação do vírus da doença de Newcastle no Brasil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 23, p. 17-33, 1955.

CUNNINGHAM, C. H. **Virologia practica**. 6. ed. Zaragoza: Acribia, 1971. 260p.

DEMÉTRIO, C. **Levantamento sorológico pesquisa do vírus da doença de Newcastle em irerês migratórios, *Dendrocygna viduata* (Anseriformes: Anatidae), na cidade de São Paulo**. Dissertação de (Mestrado em Medicina Veterinária) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 62 f., 2002.

DORETTO JÚNIOR, L. **Aspectos clínicos, zootécnicos e imunológicos da vacinação experimental em frangos de corte com as estirpes lentogênicas Ulster 2C e B₁, do vírus da doença de Newcastle.** 1997. 97 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

DORETTO JÚNIOR, L. **Caracterização antigênica e epizootiológica de estirpes do vírus da doença de Newcastle isoladas no Brasil.** 2003. 65 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

DORETTO JUNIOR, L.; PAULILLO, A. C. Doença de Newcastle. In: ANDREATTI FILHO, R. L. (Ed.). **Saúde aviária e doenças.** 1ª ed São Paulo: Editora Roca, 2007, p. 168-181.

DOYLE, T. M. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. **Journal Comparative Pathology and Therapeutics**, n. 40, p. 144-169, 1927.

DUEE, J. P.; DIEERS, R. Accident devaccination après utilisation de la souche Hitchner B₁ par nebulization. **Record Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 143, p. 337-342, 1967.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 6 ed., San Diego, Academic Press, 2008, p. 117-155.

FASSI-FEHRI, M. Influence de l'âge du mode d'administration et de la nature de la souche vaccinale sur l'immunisation de masse du poulet de chair contre la maladie de Newcastle. **Revue Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 136, n. 3, p. 213-222, 1985.

FRANZO, V. S.; GAMA, N. M. S. Q.; ARTONI, S. M. B.; SILVA, P. L.; AMOROSO, L.; PAULILLO, A. C. Importância dos patos (*Anas platyrhynchos*) na epidemiologia experimental da doença de Newcastle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Santos, supl. 6, p.190, 2004.

HECKERT, R. A.; COLLINS, M. S.; MANVELL, R. J.; STRONG, I.; PEARSON, J. E.; ALEXANDER, D. J. Comparison of Newcastle disease viruses isolated from Cormorants in Canada and the USA in 1975, 1990 and 1992. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 60, p. 50-54, 1996.

HOFSTAD, M. S. A quantitative study of Newcastle disease virus in tissues of infected chickens. **American Journal Veterinary Records**, v. 12, p. 334-339, 1951.

ICTV – The International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>>. Acesso em: 25 fev. 2007.

ISLAM, M. A.; ITO, T.; TAKAKUWA, H.; TAKADA, A.; ITAKURA, C.; KIDA, H. Acquisition of pathogenicity of a Newcastle disease virus isolated from a Japanese quail by intracerebral passage in chickens. **Japanese Journal Veterinary Research**, v.42, n. 3-4, p. 147-156, 1994

KALETA, E. F.; BALDAUF, C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: ALEXANDER, D.J. **Newcastle disease**, Boston: Kluwer Academic, 1988. p. 197-246.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed., San Diego: Academic Press, 928 p, 2008.

KANT, A.; G. KOCH.; VAN ROOZELAAR, D. J.; BALK F.; TERHURNE, A. 1997. Differentiation of virulent and nonvirulent strains of Newcastle disease virus within 24

hours by polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 26, p. 837-849, 1997.

KING, D. J. Enfermedad de Newcastle. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 16°. **Anais...** Lima, 1999. p.56-62.

KRANEVELD, F. C. A poultry disease in the Dutch East Indies. **Nederlands Indisch Bladen voor Diergeneeskunde**, n. 38, p. 448-450, 1926.

LANCASTER, H. J. E. Newcastle disease control by vaccination. **Veterinary Bulletin**, Oxon, v. 34, n. 2, p. 57-76, 1964.

LANCASTER, J. E.; ALEXANDER, D. J. **Newcastle disease**: virus and spread: a review of some of the literature. Ottawa: Department of Agriculture, 1975.

LIMA, F. S. **Estudo de parâmetros clínicos, epidemiológicos, imunitários e patológicos da vacinação contra a moléstia de Newcastle em galinhas d'angola industriais para corte (*Numida meleagris galeata*)**. 2005. 64f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

LIMA, F. S.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Evaluation of different programs of Newcastle disease vaccination in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 5, p. 354-356, 2004a.

LIMA, F. S.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) as Newcastle disease carrier. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 7, p. 483-484, 2004b.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed., San Diego: Academic Press, 2008. p. 839-872.

LUTHGEN, W. Newcastle disease in parrots and parakeets. **Advances in Veterinary Medicine**, Frankfurt, v. 31, p. 1-100, 1981.

MAPA – Ministério da Agricultura e Abastecimento. Disponível em:<<http://agricultura.gov.br/>> Acesso em 15 set. 2006.

McFERRAN, J.B.; NELSON, R. Some properties of an avirulent Newcastle disease virus. **Arch. Ges. Virusforsch.**, v. 34, p. 64-74, 1971

McNULTY, M. S.; ADAÍR, B. M.; O'LOAN, C. J.; ALLAN, G. M. Isolation of an antigenically unusual paramyxovirus type 1 from chickens. **Avian Pathology**, n. 17, p. 509-513, 1988.

MEULEMANS, G. Vaccination contre la maladie de Newcastle. Application de la technique d'aerosol a la vaccination de poussins d'un jour, Porteurs d'anticorps homologues d'origine maternelle. **Annales Médecine Vétérinaire**, Bruxelles, v. 119, n. 3, p.159-166, 1975.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Poultry**. 9 ed. revised edition. Washington: National Academy Press, 1994.

NISHIZAWA, M. ; PAULILLO, A. C. ; NAKAGHI, L. S. O. ; NUNES, A. D. ; CAMPIONI, J. M. ; DORETTO JUNIOR, L. . Newcastle disease in white Pekin ducks :response to experimental vaccination and challenge. **Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 09, p. 123-125, 2007.

OBERDORFER, A.; WERNER. O. Newcastle disease virus: detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 27, p. 237-243.1998

OIE - Disponível em :< <http://oie.int/>> Acesso em 10 dez 2008.

PAULILLO, A. C. **Doença de Newcastle: estudo experimental da resposta imune às estirpes vacinais B₁ e LaSota**. 1980. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.

PAULILLO, A. C. **Estudo experimental da resposta imunitária às vacinas inativada (oleosa) e viva (amostra LaSota) contra a doença de Newcastle**. 1984. 129f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

PAULILLO, A. C. **Avaliação da resposta imune e da performance zootécnica de poedeiras vacinadas experimentalmente contra a doença de Newcastle**. 1989. 116f. Tese (Livre Docência em Ornitopatologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1989.

PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M.(Ed.) **Doenças das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000, p. 267-281.

PAULILLO, A.C.; PINTO, A. A.; ARIKI, J.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Doença de Newcastle. I . Estudo experimental da resposta imune às estirpes vacinais B₁ e LaSota. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ Universidade São Paulo**, São Paulo, v.19, n.1, p.9-43, 1982.

PAULILLO, A. C.; MONTASSIER, H. J.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; ARIKI, J.; RICHTZENHAIN, L.J.; NAKAGHI, L. S. O.; BARBOSA, J. C.; QUINTANA, J. L. Doença de Newcastle. IV. Ensaio experimental de diferentes vias de vacinação com a estirpe lentogênica LaSota em frangos de corte. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.3, n.1, p.73-79, 1987.

PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; DORETTO JUNIOR, L.; MEIRELES, M. V.; KRONKA, S. N.; ARIKI, J.; SAKOMURA, N. K.; RIBEIRO, R. C. Estudos zootécnico e imunológico de aves de corte submetidas a diferentes programas de vacinação contra a doença de Newcastle In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA 33, 1996, Fortaleza, **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. p.388-390.

PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; MORO, M.E.G.; DORETTO JÚNIOR, L., MEIRELES, M. V.; SHOCKEN-ITURRINO, R. P.; SOUSA, R. L. M. Importancia de la vacunación experimental en perdices (*Rhynchotus rufescens*) contra la enfermedad de Newcastle y investigación del estado de portador del virus. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 16^o, 1999, Lima. **Memorias...**p. 291-293.

PAULILLO, A. C.; LIMA, F. S.; DORETTO JÚNIOR, L.; MORAES, V. M. B.; GAMA, N. M. S. Q.; NISHIZAWA, M.; POLVEIRO, W. J.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Importância de las codornices japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) en la epidemiología experimental de la enfermedad de Newcastle. In: CONGRESO CENTROAMERICANO DEL CARIBE DE AVICULTURA, 17^o, 2002, La Habana. 1 CD-room.

RAJESWAR, J. J.; MASILLAMONY, P. R. Spray vaccine against Newcastle disease. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 70, p. 402-404, 1993.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating percent and points. **American Journal Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REIS, J.; NÓBREGA, P. **Tratado de Ornitopatologia**. Melhoramentos.1956.

RIVETZ, B.; BOGIN, E.; HORNSTEIN, K.; MERDINGER, M. **Research in Veterinary Science**, v. 22, n.3, p. 285-291, 1977

ROSTAGNO, H.S ; outros autores. **Composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos: (tabelas brasileiras)**. Viçosa: UFV, 1983. 59p.

SANTOS, J.A; outros autores. A ocorrência da doença de Newcastle no Brasil (nota prévia). **Revista de Produção Animal**, v. 1, n. 1, p. 5-12, 1954.

SCHMIDT, E. M. S. **Parâmetros hematológicos, bioquímicos séricos e imunitários de faisões-de-coleira (*Phasianus colchicus*) controle e vacinados experimentalmente contra a doença de Newcastle**. 2008.151f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SBRT. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. **Criação de gansos**. Disponível em: <<http://sbrt.ibict.br/>> Acesso em 10 mar. 2007.

SILVA, R. A ; outros autores. Novos focos da doença de Newcastle no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 4, p. 109-114, 1961.

SILVA, G. S. **Doença de Newcastle: Ensaio experimental de diferentes programas de vacinação com as estirpes lentogênicas Ulster 2C, B₁ e LaSota em frangos de corte**. 1995. 66 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

SOARES, P. B. M. **Padronização da RT-PCR duplex para detecção dos vírus da Influenza Aviária e Doença de Newcastle em aves migratórias**. 2002. 69 f. Dissertação (Mestrado em Febre Aftosa), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SPRADBROW, P. B. Geographical distribution. In: ALEXANDER, D.J. **Newcastle disease**, Boston: Kluwer Academic, 1988. p. 247-255.

STELL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. 2thed. New York: McGraw-Hill Book, 1980. 633 p.

TOYODA, T.; SAKAGUCHI, T.; HIROTA, H.; GOTOH, B.; KUMA, K.; MIYATA, T.; NAGAI, Y. Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. **Virology**, New York, v. 169, n.2, p. 273–282, 1989.

VILLEGAS, P.; KLEVEN, S. H.; ANDERSON, D. P. Effect of route of Newcastle vaccination on the incidence of airsacculitis in chickens infected with *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 21, n. 1, p. 16-25, 1976.

WAN, H.; CHEN, L.; WU, L.; LIU, X. Disease in geese: natural occurrence and experimental infection Newcastle. **Avian Pathology**, Huntington, v. 33, n. 2, p. 216-221, 2004.

WINTERFIELD, R. W.; GOLDMAN, C. L.; SEADALE, E. H. Newcastle disease immunization studies: vaccination of chickens with B1, F and LaSota strains of Newcastle disease virus administered through the drinking water. **Poultry Science**, Champaign, v. 36, p. 1076-1088, 1957.

APÊNDICE 1. Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA – FCAV – Unesp, *campus* Jaboticabal), protocolo número: 007605-08 (07/05/2008)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

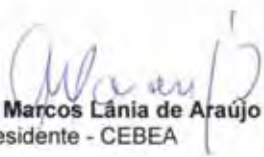



CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 007605-08 do trabalho de pesquisa intitulado "**Estudo de parâmetros clínicos e imunitários da vacinação contra a doença de Newcastle em gansos da China (*Anser cygnoides*). Pesquisa do estado de portador do vírus e sua importância epidemiológica**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião ordinária de 7 de maio de 2008.

Jaboticabal, 08 de maio de 2008.


Prof. Dr. Marcos Lânia de Araújo
Presidente - CEBEA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEBEA

APÊNDICE 2. Composição percentual e calculada das rações experimentais que foram utilizadas nas diferentes fases do ciclo de vida dos gansos-da-China (*Anser cygnoides*).

Ingredientes (%)	Ração inicial (1 ^a a 4 ^a SV)	Ração engorda (a partir da 5 ^a SV)
Milho	59.888	72.913
Farelo de soja 45	37.056	19.650
Farelo de trigo	0.000	5.028
Calcário	0.418	0.710
Fosfato bicálcico	1.523	1.026
Sal	0.268	0.285
Suplemento mineral	0.050 ¹	0.050 ¹
Suplemento vitamínico	0.300 ²	0.300 ³
Óleo	0.439	0.000
DL-Metionina 99	0.058	0.038
Total	100.000	100.000
Composição Calculada		
Proteína bruta (%)	20,00	16,00
Energia metabolizável (Mcal/Kg)	2900	3000
Matéria seca (%)	87.809	87.617
Cálcio (%)	0.650	0.600
Fósforo disponível(%)	0.400	0.300
Fibra (%)	3.362	3.036
Metionina + cistina (%)	0.750	0.584
Lisina (%)	1.180	0.760
Sódio (%)	0.150	0.150

SV= semanas de vida

1- Suplemento mineral (quantidade/Kg do produto): Mn – 150.000 mg, Zn – 100.000mg, Fe – 100.000 mg, Cu – 16.000 mg, I – 1500 mg.

2- Suplemento vitamínico (quantidade/Kg do produto): Vit A – 2.666.000 UI, Vit B – 600 mg, Vit B2 – 2.000 mg, Vit B6 – 933,10 mg, Vit B12 – 4000 mcg, Vit D3 – 666,50 mg, Vit E – 5000 UI, Vit K – 600 mg, Ácido fólico – 333,25 mg, Ácido pantotênico – 5000 mg, Biotina – 20 mg, Colina – 133.330 mg, Niacina – 13.333 mg, Selênio – 100 mg, Antioxidante – 7,5 g, Cocidiostático – 33,332 g, Promotor de crescimento – 20 g, Veículo Q.S.P.

3 – Suplemento vitamínico (quantidade/Kg do produto): Vit A – 2.332.750 UI, Vit B – 533,20 mg, Vit B2 – 1.666,25 mg, Vit B6 – 866,45 mg, Vit B12 – 3.332,50 mcg, Vit D3 – 500 mg, Vit E – 4000 UI, Vit K – 500 mg, Ácido fólico – 233,275 mg, Ácido pantotênico – 4.332,250 mg, Colina – 99.975 mg, Niacina – 11.663 mg, Selênio – 100 mg, Antioxidante – 5,0 g, Cocidiostático – 20 g, Promotor de crescimento – 13,33 g, Veículo Q.S.P.