

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

**ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E IMUNITÁRIOS  
DA VACINAÇÃO CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE E  
SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM PERIQUITOS-  
AUSTRALIANOS (*Melopsittacus undulatus*)**

**Janine Denadai**  
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2010

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

**ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E IMUNITÁRIOS  
DA VACINAÇÃO CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE E  
SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM PERIQUITOS-  
AUSTRALIANOS (*Melopsittacus undulatus*)**

**Janine Denadai**

**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

2010

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JANINE DENADAI** – nasceu em Monte Alto - SP em 29 de dezembro de 1982. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia, com colação de grau em setembro de 2007. Durante a graduação, nos anos de 2004 e 2006, foi bolsista da FAPEMIG, onde participou de vários projetos de pesquisas, enfocando principalmente o estudo da anatomia vascular da *Phrynos geofroanus* e histomorfometria da epiderme e das glândulas sudoríparas do escroto de bovinos mestiços taurino e nelore. Em agosto de 2008, ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP) no Campus de Jaboticabal, Departamento de Patologia Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Paulillo. Foi bolsista da FAPESP durante o mestrado.

*Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.”*

*Jean Cocteau*

*A Deus,*

*Pelo dom da vida, por sempre me guiar pelos caminhos mais extraordinários e proporcionar conquistas como esta.*

*Aos meus pais,*

*Safete e Paulo*

*Meus exemplos de vida, os quais não mediram esforços para realização deste trabalho, meu eterno amor, respeito e admiração.*

*Ao meu pai,*

*Irso*

*Que mesmo não estado mais entre nós, está sempre ao meu lado me guiando e abençoando.*

**DEDICO**

*Às minhas irmãs,*

*Sâmia e Alissa*

*Pelo apoio e carinho, minha mais sincera admiração e amor incondicional.*

*Ao meu namorado,*

*Willian*

*Grande e eterno amor da minha vida, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos.*

**DEDICO**

*Ao meu orientador,*

*Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo,*

*Pela sabedoria, orientação e por ter se tornado um grande amigo.*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP –Jaboticabal

Ao Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco pela colaboração no experimento

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosângela Zacarias Machado pelo auxílio na fase experimental

À Professora Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt pela amizade e colaboração na realização deste trabalho

Aos amigos que direta ou indiretamente me apoiaram, em especial a Gislaine Regina Vieira Martins e Aline Braga Marcussi

Às médicas veterinárias Cinthia e Juliana pela amizade e apoio no manejo dos animais

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

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho

A FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada!



## **AUXÍLIO FINANCEIRO**

Este projeto teve bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, sob o processo nº 2008/52534-0

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE FIGURA</b> .....	xvi
<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	03
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	11
3.1. Objetivo geral.....	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
3.2.1.Experimento1.....	11
3.2.2.Experimento 2.....	11
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	12
4.1. EXPERIMENTO 1.....	12
4.1.1. Instalações.....	12
4.1.2. Aves experimentais, manejo e nutrição.....	12
4.1.3. Vacinas e vacinação .....	13
4.1.4. Colheita de sangue.....	15
4.1.5. Reação de inibição da hemaglutinação.....	16
4.1.6. Desafio.....	16
4.1.7. Observação clínica e necropsia.....	17
4.1.8. Reação de Cadeia de Polimerase pós Transcrição Reversa (RT- PCR).....	17
4.1.8.1. Extração do RNA viral.....	17
4.1.8.2. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”).....	18
4.1.8.3. Síntese de cDNA – Transcrição reversa do RNA viral.....	19
4.1.8.4. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	19

4.1.8.5. Detecção do produto amplificado.....	20
4.1.9. Delineamento experimental.....	20
4.2. EXPERIMENTO 2.....	20
4.2.1. Instalações.....	20
4.2.2. Aves experimentais.....	20
4.2.3. Desafio.....	21
4.2.4. Observação clínica e necropsopia.....	21
4.2.5. Reação de Cadeia de Polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR).....	22
4.2.6. Colheita de sangue .....	22
4.2.7. Reação de inibição da hemaglutinação (HI) .....	22
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
5.1. EXPERIMENTO 1.....	23
5.1.1. Exames clínicos.....	23
5.1.2. Exames sorológicos .....	24
5.1.3. Desafios.....	27
5.1.4. Pesquisa do genoma do vírus de Newcastle (VDN) e reação de inibição da hemaglutinação(HI).....	30
5.2. EXPERIMENTO 2.....	32
5.2.1. Desafio, observação clínica, necropsopia, reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR) e reação de inibição da hemaglutinação (HI) dos periquitos-australianos inoculados com o VDN.....	32
5.2.2. Observação clínica, necropsopia, reação de cadeia de polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR) e reação de inibição da hemaglutinação (HI) das aves SPF conviventes com periquitos-australianos inoculados com o VDN.....	33
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>APÊNDICE</b>	

<b>Apêndice A.</b> Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA – FCAV – Unesp, <i>campus</i> Jaboticabal) protocolo nº007606-08(07/05/2008) .....	49
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabelas	Pág
<p><b>Tabela 1.</b> Distribuição dos periquitos-australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>) em diferentes grupos experimentais, vacinados contra a doença de Newcastle aos cinco meses e revacinados aos sete, oito e meio e dez meses de idade, por via ocular, com diferentes estirpes vacinais (n=72).....</p>	15
<p><b>Tabela 2.</b> Médias geométricas dos títulos (<math>\log_2</math>) de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) dos soros de periquitos-australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>) submetidos a diferentes esquemas de vacinação, contra a Doença de Newcastle, em período compreendido entre cinco e dez meses e meio de idade nos diferentes grupos (n=72) .....</p>	26
<p><b>Tabela 3.</b> Resultados do desafio com vírus patogênico da Doença de Newcastle, em periquitos-australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>), aos 11 meses de idade, nos diferentes grupos (n=24).. .....</p>	28
<p><b>Tabela 4.</b> Pesquisa de genoma viral e de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle, respectivamente, por reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR), a partir de suabes de cloaca, e por reação de inibição da hemaglutinação (HI) em periquitos-australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>) vacinados e revacinados contra a Doença de Newcastle, obtidos 13 e 19 dias dias após-desafio (dpi), nos diferentes grupos experimentais (n=24).. .....</p>	31
<p><b>Tabela 5.</b> Pesquisa de genoma viral e de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle, respectivamente, por reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR), a partir de suabes de cloaca, e por</p>	

reação de inibição da hemaglutinação (HI) em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) não vacinados contra a DN, à véspera do desafio (VD) e aos 13 e 19 dias pós-desafio (dpi)..... 33

**Tabela 6.** Resultados da observação clínica, necropsopia, pesquisa em suabe de cloaca (C) da presença de genoma viral (RT-PCR) do vírus de Newcastle (VDN), e sorologia (HI) das aves SPF conviventes com periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) inoculados com o vírus de Newcastle decorridos 13 (Grupo 1) e 19 (Grupo 2) dias após colocar em convívio com periquitos inoculados (dpi) ..... 35

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Pág</b>
<b>Figura 1.</b> Periquitos-australianos em gaiola experimental.....	13
<b>Figura 2.</b> Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação ( $\text{Log}_2X$ ) dos soros de periquitos-australianos submetidos a diferentes esquemas de vacinação, contra a Doença de Newcastle .....	26

**ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E IMUNITÁRIOS DA VACINAÇÃO CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM PERIQUITOS-AUSTRALIANOS (*Melopsittacus undulatus*)**

**RESUMO** - Foram avaliados parâmetros clínicos, imunitários e epidemiológicos da vacinação contra a Doença de Newcastle em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) através de dois experimentos. Foram utilizadas amostras vacinais Ulster 2C, B1 e La Sota do VDN. No experimento 1, foram utilizados 72 periquitos australianos com cinco meses de idade, distribuídos em 4 tratamentos de 18 animais cada, num total de três repetições, submetidos a diferentes esquemas imunoproliféricos. A resposta imune foi avaliada pelo teste de HI, com posterior desafio frente a estirpe patogênica do VDN, aos 11 meses de vida das aves. Em todos os grupos, coletou-se suabes cloacais para pesquisa de RNA viral através da reação de cadeia de polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR). Independente do grupo experimental, sinais clínicos da reação vacinal não foram observados. Os resultados dos títulos de anticorpos (HI) mostraram que os programas imunoproliféricos ensaiados foram igualmente eficientes no estímulo da resposta imune humoral. Os periquitos-australianos desafiados mostraram-se refratários à enfermidade clínica com o VDN. Entretanto, ficou caracterizado o estado de portador de VDN nesta espécie decorridos até 19 dias da infecção experimental com este patógeno. No experimento 2, foram utilizadas aves SPF conviventes com periquitos-australianos inoculados com uma estirpe patogênica do VDN. Observou-se a transmissão de vírus patogênico (VDN) dos periquitos-australianos para as aves SPF conviventes decorridos até 19 dias da infecção experimental com este patógeno, o que vem realçar a importância do periquito-australiano como fonte potencial de infecção de VDN para aves domésticas.

**Palavras-Chave:** doença de Newcastle, estado de portador, *Melopsittacus undulatus*, periquitos-australianos, reação de inibição da hemaglutinação (HI) e vacinação



**STUDY OF CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF NEWCASTLE  
DISEASE VACCINATION AND ITS RELEVANCE IN THE EPIDEMIOLOGY IN  
BUDGERIGARS (*Melopsittacus undulatus*)**

**SUMMARY** - The clinical, epidemiological, immunological and parameters of vaccination against Newcastle disease in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) were investigated using 2 experiments. Ulster 2C, B1 and LaSota vaccines strains of the Newcastle disease virus (NDV) were used. In experiment 1, 72 budgerigars were used, and divided into 4 different groups with 18 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 11 months of age. In all the groups, 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 budgerigars were refractory to the NDV clinical disease. However, a NDV carrier state was shown in this species until 19 days after experimental infection. In experiment 2, SPF chickens were housed with budgerigars which were previously inoculated with a pathogenic NDV strain. Therefore, the pathogenic virus (NDV) was transmitted from the budgerigars to SPF birds up to 19 days after challenge, showing the importance of the budgerigars as source of dissemination of NDV to domestic birds.

**Keywords:** *Melopsittacus undulatus*, budgerigars, inhibition of hemagglutination test (HI), NDV state of carrier, Newcastle disease, vaccination

## 1. INTRODUÇÃO<sup>1</sup>

---

O Periquito-australiano (*Melopsittacus undulatus*) (SHAW, 1805) pertence à ordem dos Psittaciformes, família Psittacidae, subfamília Psittacinae e ao gênero *Melopsittacus*, sendo o único representante da espécie (FORSHAW, 1977). A classe das aves contém cerca de 9.600 espécies distribuídas em 28 ordens atuais e poucas de ordens fósseis. Pouquíssimas aves ainda não foram descobertas (SICK, 1997; HICKMAN, 2001).

O periquito-australiano é uma ave que mede aproximadamente 18 cm de comprimento e 35 gramas de peso, originária da Austrália, difundida mundialmente como ave de estimação. Há muitas colorações diferentes de plumagem devido a mutações, sendo a plumagem de adulto adquirida entre três e seis meses de idade. Tem como dimorfismo sexual característico a coloração da cera, que é azul em machos e rosa nas fêmeas. Atinge a maturidade reprodutiva em torno dos seis meses de idade (FORSHAW, 1977; HARPER & LOWE, 1998).

São suscetíveis à infecção com o vírus da doença de Newcastle (VDN) (ERICKSON, 1977). Ademais, por serem animais dóceis, curiosos e fáceis de adestrar e reproduzir, é muito comum sua criação em cativeiro nas residências, podendo, com isso, tornar-se um meio de transmissão do VDN a outras espécies domésticas.

Atualmente, a literatura existente apresenta-se bastante escassa quanto ao controle imunitário e epidemiológico do periquito-australiano com relação ao VDN. Adicionalmente, AWAN et al. (1994) apontaram aves silvestres como importantes fontes de disseminação do VDN.

Assim sendo, este trabalho tem como objetivo esclarecer melhor o controle imunoprolático do VDN em periquitos-australianos, como também melhor

---

<sup>1</sup> Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA – FCAV – Unesp, campus Jaboticabal) protocolo nº007606-08 (07/05/2008).

compreender o papel exercido por esta espécie no plano epidemiológico com repercussão na área de sanidade animal.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

A doença de Newcastle (DN), também conhecida como pseudopeste aviária, desordem neuro-respiratória e, internacionalmente como Newcastle disease, faz parte da lista das enfermidades emergenciais do código zoonosológico internacional “Organização Mundial de Saúde Animal- OIE”, sendo seus focos de notificação compulsória (OIE, 2009).

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 et al., 2002; DORETTO JÚNIOR, 1997; PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2009).

Na atualidade, a DN é definida como uma infecção viral de aves causada por um vírus do sorotipo *Paramyxovírus* aviário tipo 1 (APMV -1), pertencente a Família *Paramyxoviridae*, Subfamília *Paramyxovirinae*, Gênero *Avulavirus* (ICTV, 2009), que reúne os seguintes critérios de virulência: 1) O vírus possui um índice de patogenicidade intracerebral (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 posição terminal “C” da proteína F2 e fenilalanina na posição 117 da posição terminal “N” da proteína F1. O termo múltiplos aminoácidos básicos refere-se aos três últimos resíduos de arginina ou lisina entre os as posições 113 e 116 do genoma viral. (OIE, 2009).

O VDN possui morfologia esférica, podendo às vezes apresentar-se ligeiramente pleomórfico, com cerca de 150 a 200 nm de diâmetro e um nucleocapsídeo de 12 a 17 nm de diâmetro. O nucleocapsídeo é revestido por um envoltório constituído por dupla camada lipídica, das quais emergem projeções de origem viral, com atividades específicas de dois tipos: HN e F. A glicoproteína HN compreende as enzimas hemaglutinina e neuraminidase e a glicoproteína F a função de adesão da partícula viral à membrana celular do hospedeiro. A hemaglutinina confere ao VDN a capacidade

de aglutinar eritrócitos, enquanto a neuraminidase atua promovendo a gradual eluição das partículas virais aglutinadas, atividade essas importantes na patogenia da doença. Os anticorpos dirigidos contra a glicoproteína HN do vírion inibem a heaglutinação do vírus à superfície da hemácia e o título de tais anticorpos é utilizado na mensuração da imunidade humoral, passíveis de serem quantificados por meio de testes de Inibição da hemaglutinação (HI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizados no diagnóstico sorológico da DN (ACKERMAN, 1964; KOUWENHOVEN, 1993; LAMB E KOLAKOFSKY, 1996; ALEXANDER, 1997; MILLAR et al., 1998).

O genoma viral codifica duas glicoproteínas estruturais de superfícies (HN e F), além de outras quatro proteínas, ou seja, proteína de matriz viral (M), proteína polimerase grande (L), proteína do nucleocapsídeo (NP) e uma fosfoproteína associada ao nucleocapsídeo (P) (KOUWENHOVEN, 1993; LEEUW e PEETERS, 1999). A proteína F, conforme anteriormente citado é a responsável pela fusão do envoltório viral a receptores da membrana plasmática da célula hospedeira e sua consequente penetração. Tal atividade só é possível pela clivagem do precursor  $F_0$ , por meio de uma enzima do hospedeiro, em dois polipeptídios ligados,  $F_1$  e  $F_2$  (MERZ et al., 1981). As  $F_0$  das amostras virulentas de VDN são clivadas em uma grande variedade de células do hospedeiro, enquanto aquelas das amostras não virulentas são clivadas somente em limitados tipos celulares. A capacidade de replicação das amostras virulentas em diversos grupos celulares torna o VDN capaz de disseminar extensivamente através de uma gama enorme de hospedeiros (TOYODA et al., 1987; JESTIN, V. E JESTIN, A., 1991; SEAL et al., 1995; SEAL et al., 1996; KANT et al., 1997; OBERDÖRFER e WERNER, 1998; ALDOUS e ALEXANDER, 2001; CAVANAGH, 2001). Portanto, a virulência dos APMV-1 está associada diretamente ao sítio de clivagem da proteína  $F_0$ , ponto este responsável pela patogenicidade da estirpe viral (CREELAN et al., 2002).

Para fins didáticos, as amostras de VDN têm sido agrupadas em cinco patotipos, com base nos sinais clínicos observados nas aves infectadas: velogênico viscerotrópico, velogênico neurotrópico, mesogênico, lentogênico ou vacinal e entérico assintomático (BEARD & HANSON, 1984).

Além das aves, o VDN pode infectar diversas espécies de répteis e mamíferos, entre os quais o homem (DORETTO JUNIOR & PAULILLO, 2007)

A DN apresenta distribuição mundial, com uma ampla variação de hospedeiros onde 27 ordens de aves existentes, inclusive aves silvestres criadas em cativeiro, têm sido reportadas, 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.

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, 2009).

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).

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).

O controle da DN é freqüentemente 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, 2009).

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 et al., 2007).

A história da DN é marcada por três grandes panzootias, a primeira se iniciou na Inglaterra, com a emergência da DN, em 1926, e a sua difusão para a maioria dos países do mundo (KRANEVELD, 1926; DOYLE, 1927). Na Inglaterra, a DN desapareceu em 1928, no entanto, na Ásia e Oriente Médio, a DN 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 (velogênica viscerotrópica) parece ter ocorrido um pouco mais tarde, entre 1940 e 1950.

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).

No que diz respeito ao periquito-australiano, um estudo realizado por ERICKSON et al. (1977), ao qual periquitos-australianos foram expostos ao VDN velogênico viscerotrópico, demonstrou que estes animais desenvolveram sinais clínicos sugestivos da DN.

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, 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 (SANTOS, 1954).

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, 1961).

Proeminente marco na história da DN foi o estabelecimento da sua etiologia vírica através do diagnóstico e confirmação da DN, 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 todas as regiões avícolas do país (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.

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. As ações da Defesa Sanitária Animal foram implantadas, culminando 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, 2009; MAPA, 2009). 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, 2009).

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, 2009).

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

A DN no âmbito da patologia aviária, principalmente no que tange à imunidade e à epidemiologia, foi amplamente estudada em reprodutoras, frangos de corte e poedeiras comerciais. Entretanto, aves ornamentais, migratórias, silvestres, semi-silvestres, exóticas e outras espécies domésticas envolvidas na perpetuação do VDN no ambiente constituem ainda um campo de estudo pouco explorado em nosso meio.

LIMA (2005) demonstrou experimentalmente que galinhas d'angola (*Numida meleagris galeata*) não manifestaram sinais clínicos quando desafiadas com uma amostra patogênica do VDN. Contudo, infectaram-se e permaneceram no estado de portador decorridos 30 dias da infecção experimental com este patógeno. Situação semelhante foi demonstrada em outras espécies domésticas, tais como perdizes (PAULILLO et al., 1999), patos (FRANZO et al., 2004), codornas (LIMA et al., 2004a, 2004b) e em aves silvestres e migratórias (ALEXANDER et al., 1997).

Nesse contexto, para a espécie *Melopsittacus undulatus*, que é a ave de estimação que mais se cria no mundo (VINER, 2000), não há nenhum esquema imunoprolático proposto para a DN para estas aves.

Espécies de aves silvestres/semisilvestres, 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. Assim, torna-se evidente a importância de estudos para o desenvolvimento de programas imunoproláticos efetivos em periquitos-australianos.

Aves silvestres, semisilvestres, exóticas e domésticas podem albergar agentes infecciosos sem manifestação clínica, podendo atuar como fonte de infecção. 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.

Portanto, em face da literatura compulsada, este estudo teve como objetivo principal ampliar o conhecimento no campo da imunoprolaxia contra a DN em periquitos-australianos e na perpetuação do VDN nessa espécie animal, para estabelecer com melhor exatidão as relações dentro do sistema vírus-hospedeiro-ambiente envolvidos nessa enfermidade.

### **3. OBJETIVOS**

---

#### **3.1. Objetivo geral**

Estudar comparativamente os aspectos clínicos e imunitários da vacinação experimental contra a DN em periquitos-australianos submetidos às estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do VDN, investigando também, o seu eventual estado de portador do VDN.

#### **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 periquitos-australianos, em diferentes programas imunoproliféricos contra a DN;
2. Avaliar a resposta imune às estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota administradas em periquitos-australianos, em diferentes programas imunoproliféricos contra a DN;
3. Pesquisar o estado de portador de VDN em periquitos-australianos;
4. Esclarecer a importância da imunoprolifaxia contra a DN em periquitos-australianos.

##### **3.2.2 Experimento 2**

1. Esclarecer a importância epidemiológica do estado de portador de VDN em periquitos-australianos;
2. Pesquisar a duração do estado de portador de VDN em periquitos-australianos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **4.1. EXPERIMENTO 1**

#### **4.1.1. Instalações**

As aves foram alojadas no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Unesp, Câmpus de Jaboticabal (DPVE-FCAV-Unesp), Câmpus de Jaboticabal – UNESP, mantidas em gaiolas de arame galvanizado, contendo bebedouro, comedouro e um recipiente para banho (Figura 1).

#### **4.1.2. Aves experimentais, manejo e nutrição**

Foram utilizados 72 periquitos-australianos machos e fêmeas com 5 meses de idade.

Os periquitos-australianos foram distribuídos, aleatoriamente, em 4 tratamentos (grupos) e três repetições com 6 aves por parcela. O mesmo critério foi adotado para os periquitos-australianos controle, que desde o início de sua criação constituíram um grupo à parte, para evitar a influência de um tratamento vacinal sobre o outro, todavia, mantido em condições de manejo idêntico ao utilizado para os demais grupos.

A alimentação foi à base de mistura de sementes, suplemento vitamínico, verduras e minerais.



Figura 1. Periquitos-australianos em gaiola 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.

Foram utilizadas vacinas (liofilizadas) preparadas com as estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do VDN. O título dessas vacinas foi obtido, mediante determinação de sua dose infectante 50% (EID<sub>50</sub>) em ovos embrionados de galinhas SPF, com oito a 10 dias de incubação.

Para tanto, prepararam-se diluições de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-10}$  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 EID<sub>50</sub> se procurou determinar, selecionaram-se quatro diluições próximas a esse título ( $1 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  e  $1 \times 10^{-9}$ ). A inoculação foi realizada na cavidade alantóide de ovos

embrionados SPF com oito a 10 dias de incubação. Com auxílio de uma seringa de 1 mL, 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 EID<sub>50</sub>. A determinação da EID<sub>50</sub> 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 2001).

De acordo com a natureza do experimento, as aves foram separadas, aleatoriamente em quatro grupos, com três repetições, sendo 6 aves por parcela, (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) em diferentes grupos experimentais, vacinados contra a doença de Newcastle aos cinco meses e revacinados aos sete, oito e meio e dez meses de idade, por via ocular, com diferentes estirpes vacinais (n=72)

Grupo	Vacinação (5 meses de idade)	Revacinação via ocular (7; 8,5 e 10 meses de idade)
I	Ulster 2C	Ulster 2C
II	B1	B1
III	LaSota	LaSota
IV*	Controle	-----

\*não recebeu vacina

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

#### 4.1.4. Colheita de sangue

Foram colhidas 264 amostras de sangue, aos cinco, seis, seis e meio, sete, sete e meio, oito, oito e meio, nove, nove e meio, dez e dez e meio meses de idade. As amostras de sangue, correspondentes a seis aves/colheita de cada grupo, foram colhidas pela técnica do corte de unha, segundo KRAUTWALD-JUNGHANNS, (2007), impregnadas em 1,5 cm<sup>2</sup> de papel-filtro (Whatmann n<sup>o</sup>1), correspondente a um volume de 75 µL de sangue. Posteriormente, os papéis foram embalados em sacos de papel e armazenados em temperatura ambiente por 24 horas para a secagem do sangue.

Subdividiu-se o papel-filtro em duas partes iguais e cada parte foi hidratada em 187,5 µL de solução salina fosfatada (PBS; NaCl 8,5g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 1,55g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 0,23g, H<sub>2</sub>O q.s.p.1000 mL, pH 7,2), *overnight*, a 4 °C. Testes iniciais demonstraram a obtenção de 12,5 µL de soro em cada metade do papel, que ao ser reconstituído com a solução salina, resultava em uma diluição 1:16 do soro. Finalmente, os eluídos (1:16) de papel-filtro eram submetidos aos testes sorológicos de



inibição da hemaglutinação (HI) para a pesquisa de anticorpos específicos para o VDN (FONSECA et al., 2007).

#### **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  $\beta$ , 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 $\mu$ L), seguiram-se diluições duplas dos soros em solução salina tamponada (PBS), pH 7,2. Acrescentaram-se a cada diluição do soro 25  $\mu$ 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  $\mu$ L de suspensão de hemácias de perus a 0,5%, padronizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 545nm, para uma absorbância entre 0,3 e 0,33. 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 logaritmo de base 2.

#### **4.1.6. Desafio**

Aos 11 meses de vida dos animais, dois periquitos-australianos de cada repetição/tratamento (24 aves no total) 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% (EID<sub>50</sub>) em ovos embrionados de galinha de oito a 10 dias de incubação, conforme técnica descrita no item 4.1.3. Duzentos microlitros da suspensão do vírus contendo 10<sup>8,15</sup> EID<sub>50</sub>/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 5 aves SPF com 30 dias de idade e sem histórico de vacinação contra a DN, comprovado pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI/VDN). Esses animais, mantidos em condições experimentais idênticas àquelas empregadas no desafio dos periquitos-australianos, também foram inoculados 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 referiu-se não só à ausência de qualquer sinal clínico, como também de mortalidade nos periquitos-australianos 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 necropsopia**

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 para pesquisa de material genético do vírus desafiado a partir de um “pool” de amostras de suabes cloacais colhidas dos periquitos-australianos e aves SPF, decorridos 13 e 19 dias após a inoculação dos periquitos-australianos, acondicionadas em tampão PBS e armazenadas à temperatura de -70°C. Para a extração foi utilizado o kit de extração NucleoSpin® RNA Vírus, MN, conforme recomenda o kit do fabricante. No momento da extração, as amostras eram descongeladas às temperaturas de 4° C a 8° C e homogeneizadas em vortex por 15 segundos. Foram utilizados 150µL da amostra para a extração a partir do kit do fabricante.

#### 4.1.8.2. Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores (“primers”)

Os primers utilizados na presente investigação foram os descritos por TOYODA et al. (1989) e utilizados por KANT et al. (1997); OBERDORFER e 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 F<sub>0</sub>, 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 SIGMA®, conforme sequência apresentadas a seguir:

<b>PRIMER</b>	<b>LOCALIZAÇÃO(pb)</b>	<b>SEQUÊNCIA(5' - 3')</b>
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 esse procedimento, 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 - Invitrogen®); 0,5 µL de RnaseOUT (40U/ µL – Invitrogen®) e 1 µL de Superscript II (200/ 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 obtido, quando não utilizado imediatamente, foi acondicionado à temperatura de -70°C até a realização da reação.

#### 4.1.8.4. Reação em Cadeia pela 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 dNTP (1,25mM - Invitrogen®); 1,0 µL de TTH – DNA Polimerase (1U/ µL - Invitrogen®); 5 µL de tampão 10x PCR Buffer( 200 mM tris HCl; 500mM KCl, Invitrogen®), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 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°C por 5 minutos (desnaturação inicial e ativação da enzima), seguida de 35 ciclos de 94°C por 1minuto/ 50°C por 1 minuto e 30 segundos/ 72 °C por 1 minuto e uma etapa final de 72 °C por 5 minutos. Após esta etapa final, a temperatura permaneceu a 4°C 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 1,8% (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 60 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 seis aves por parcela.

Na verificação do grau de imunidade pós-vacinal nos diferentes lotes de periquitos-australianos experimentais, aplicou-se o modelo de análise de dados ANOVA e aqueles com diferença significativa, foram executados contrastes, pelo teste de Tukey, com 5% de significância ( $p < 0,05$ ), pelo Statview® (versão 5.0).

## **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.

### **4.2.2. Aves experimentais**

Foram utilizadas aves SPF (“Specific-pathogen-free”) conviventes com periquitos-australianos inoculados com uma estirpe velogênica viscerotrópica do VDN, patogênica para galinhas. Para o Experimento 2, foram utilizadas dez aves SPF e cinco periquitos-australianos. Foram empregados periquitos-australianos com 4 meses de idade, sem histórico de vacinação ou contato com o VDN, comprovado pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI), alojados em gaiolas, sem cobertura do fundo, posicionadas, com o auxílio de um suporte, acima da aves SPF, no interior dos isoladores de pressão negativa.

Decorridos cinco dias após a inoculação dos periquitos-australianos com uma estirpe virulenta do VDN, dez aves SPF foram alojadas junto ao grupo de periquitos-australianos, abaixo das gaiolas, havendo contato direto entre as fezes dos periquitos-australianos e as aves SPF, para o esclarecimento do real papel exercido pela espécie, na condição de possível disseminadora de VDN para aves domésticas conviventes.

#### **4.2.3. Desafio**

Após uma semana de aclimação dos animais nos isoladores, os periquitos-australianos foram inoculados com uma estirpe patogênica do VDN, caracterizada no item 4.1.6. (Experimento 1). Desse modo, 200  $\mu$ L da suspensão do vírus contendo  $10^{8,15}$  EID<sub>50</sub>/0,1 mL foram administrados, via óculo-nasal a cada periquito, 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 cinco 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 necropsia**

As aves SPF conviventes com periquitos-australianos inoculados com a amostra patogênica do VDN foram observadas, diariamente, durante 20 dias, para o registro dos sinais clínicos e da mortalidade.

#### **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 “pool” de suabes cloacais, no total de 6 amostras, colhidas de periquitos-australianos e aves SPF, à véspera do desafio e decorridos 13 e 19 dias após a inoculação dos periquitos, e usadas conforme técnica descrita no item 4.1.8 (Experimento 1).

#### **4.2.6. Colheita de sangue**

À véspera do desafio e sucedidos oito e 14 dias após o alojamento das aves SPF junto aos periquitos-australianos, foram colhidas amostras de sangue de 100,0% das aves SPF mediante punção da veia jugular. Os soros obtidos, provenientes de três colheitas de sangue, no total, foram então acondicionados em tubos tipo 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 4.1.5. (Experimento 1).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1. EXPERIMENTO 1

#### 5.1.1. Exames clínicos

Os periquitos-australianos 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 periquitos-australianos 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 periquitos-australianos 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, CAMPIONI, 2008) respectivamente em pintos de corte, galinhas d'angola e gansos-da-china 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 periquitos-australianos estão presentes na Tabela 2 e Figura 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 cinco meses de idade. A partir dos seis meses de idade, os títulos de anticorpos dos soros dos periquitos-australianos (Grupos I a III) já eram decorrentes da imunização ativa, através do emprego das estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota, conforme o grupo.

Analisando a Tabela 2 e Figura 2, nota-se que o grupo controle não apresentou níveis de anticorpos séricos detectáveis contra a VDN. De outra parte, todos os lotes de periquitos-australianos 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 pela reação de HI. No entanto, observaram-se títulos nulos de HI aos seis meses e meio, sete e oito meses e meio de idade, conforme os dados consignados na Tabela 2 e Figura 2. As revacinações aos sete, oito meses e meio e dez meses de idade elevaram os títulos de anticorpos durante o período experimental, porém a elevação após os oito meses e meio de idade foi inferior às elevações observadas após os sete e dez meses de idade. Observou-se ainda que não houve títulos nulos entre os oito meses e meio e dez meses de idade.

Os títulos elevados em sua maioria não condizem com o baixo poder de difusão da estirpe Ulster 2C (McFERRAN & NELSON, 1971) e a baixa capacidade de invasão da estirpe B1 para galinhas (HOFSTAD, 1951). Por outro lado, títulos elevados de anticorpos detectados para os periquitos vacinados com a estirpe LaSota, estão compatíveis com o grande potencial de difusão desta cepa também para alinhas (WINTERFIELD et al., 1957).

De um modo geral então, os resultados estatísticos não evidenciaram, em linhas gerais, pelo teste ANOVA e Tukey, diferenças significativas entre os lotes de periquitos-australianos vacinados com as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota (Tabela 2).

Considerando-se que esses resultados possam ser transferidos à atividade produtiva, parece razoável especular que ficou evidenciado o valor prático dos programas imunoproláticos ensaiados, mediante o uso de vacinas preparadas com as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota, como agente imunizante para periquitos-australianos, estabelecendo-se assim caminhos mais seguros para a criação dessas aves e conseqüentemente reflexos positivos no setor produtivo.

Tabela 2. Médias aritméticas dos títulos ( $\log_2$ ) de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) dos soros de periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) submetidos a diferentes esquemas de vacinação, contra a Doença de Newcastle, em período compreendido entre cinco e dez meses e meio de idade nos diferentes grupos (n=72).

Grupo	Vacinação Via Ocular (5 meses)	Revacinação Via Ocular (7, 8,5 e 10 meses)	Médias aritméticas dos títulos de HI ( $\log_2$ )										
			Idade das aves (meses)										
			5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5
I	Ulster 2C	Ulster 2C	0,0	4,4a	0,0	0,0	7,5a	7,6a	0,0	3,0a	6,0a	7,0a	8,1a
II	B1	B1	0,0	7,2a	0,0	0,0	7,4a	8,8a	0,0	2,8a	5,0a	6,5a	7,5ab
III	LaSota	LaSota	0,0	4,0a	0,0	0,0	7,0a	7,6a	0,0	3,1a	7,4ac	7,4a	6,6b
IV*	-	-	0,0	0,0b	0,0	0,0	0,0b	0,0b	0,0	0,0b	0,0b	0,0b	0,0c

\* Grupo controle – não recebeu vacina.

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

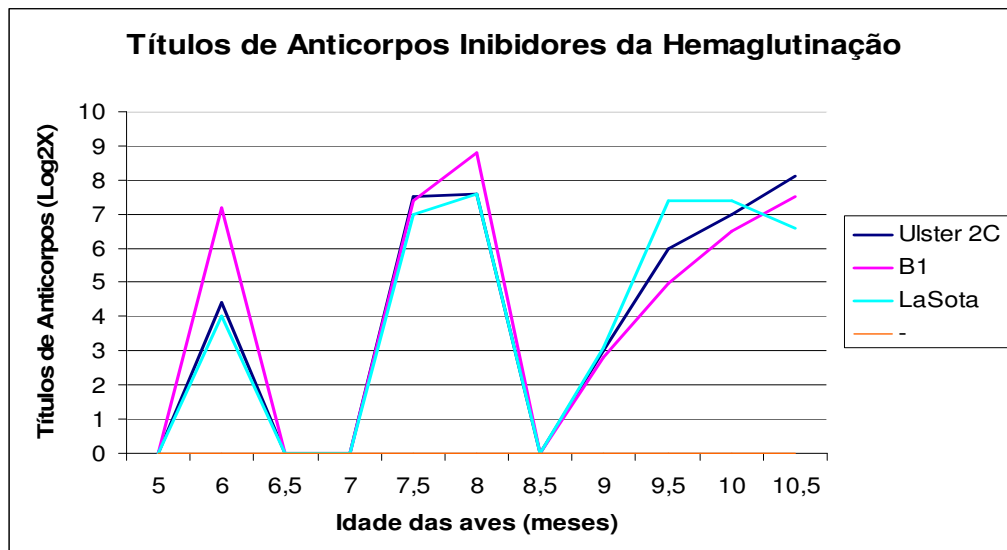


Figura 2. Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação ( $\log_2 X$ ) dos soros de periquitos-australianos submetidos a diferentes esquemas de vacinação contra a Doença de Newcastle.

### 5.1.3. Desafio

Os resultados do desafio com vírus patogênico da DN em periquitos-australianos estão presentes na Tabela 3.

Foi utilizado um grupo de aves SPF, sem histórico de vacinação contra a DN, comprovado pelo resultado negativo do teste de HI, para controle da patogenicidade da estirpe virulenta do VDN. Neste lote, 100% das aves sucumbiram ao desafio, como mostra a Tabela 3.

Nas aves SPF, os sinais clínicos mais evidentes, com início no quinto dia após a inoculação do VDN, foram caracterizados, a princípio, por apatia, anorexia, penas eriçadas e conjuntivite, seguidos de espirros. Na seqüência, foram observados sinais clínicos mais severos, como dispnéia, diarréia profusa com fezes esverdeadas, corrimento naso-ocular abundante e mucóide, terminando com prostração e morte.

As alterações macroscópicas mais observáveis foram de natureza hemorrágica, observando-se processos hemorrágicos na mucosa do proventrículo sob a forma de sufusões. Similarmente, alterações severas de caráter necrótico-hemorrágicos 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 os descritos por DORETTO JÚNIOR & PAULILLO (2007) e PAULILLO & DORETTO JÚNIOR (2009).

Ainda com relação aos resultados do desafio dos periquitos vacinados ou não contra o VDN (Grupos I a IV) (Tabela 3), constatou-se que os animais do grupo controle (Grupo IV) não evidenciaram sinais e lesões sugestivos da DN, mostrando-se refratários à doença clínica com o VDN.

Os resultados da presente pesquisa estão discordantes com aqueles obtidos no trabalho realizado por ERICKSON et al. (1977), no qual periquitos-australianos foram expostos ao VDN velogênico viscerotrópico. Estes animais desenvolveram sinais clínicos como apatia, inapetência e penas arrepiadas após três dias a duas semanas de exposição. Os sinais clínicos progrediram iniciando com conjuntivite, seguidos de

descarga nasal serosa, diarreia e manifestações clínicas sugestivas de encefalomielite viral. Além disso, observou-se que os sinais predominantes nos periquitos-australianos foram tremores de pescoço e cabeça, inclinação das asas, paralisia das pernas e ataxia. Observou-se todavia, à necropsia, que não foram encontradas lesões sugestivas da DN semelhantes às aquelas observadas em galinhas sucumbidas pelo VDN velogênico viscerotrópico.

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 periquitos-australianos à enfermidade de Newcastle.

Já nos grupos de animais vacinados (Grupos I a III), como se poderia esperar, o percentual médio de proteção ao desafio foi total-100,0% (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados do desafio com vírus patogênico da Doença de Newcastle, em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*), aos 11 meses de idade, nos diferentes grupos (n=24)

<b>Grupo</b>	<b>Vacinação Via ocular (5 meses)</b>	<b>Revacinação Via ocular (7, 8,5 e 10 meses)</b>	<b>Nº de Aves Testadas</b>	<b>% média de Proteção ao desafio com o VDN</b>
<b>I</b>	Ulster 2C	Ulster 2C	6	100,0
<b>II</b>	B1	B1	6	100,0
<b>III</b>	LaSota	LaSota	6	100,0
<b>IV*</b>	Controle	- - -	6	100,0
<b>AVES SPF**("Specific-pathogen-free")</b>			5	0,0

\*Grupo controle – não vacinado

\*\* Controle da patogenicidade do VDN

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.

Neste enfoque, parece sensato concluir que estirpes patogênicas do VDN oriundas de frango de corte, somente evidenciam sua real patogenicidade após sua adaptação em periquitos-australianos, o que poderia explicar a discrepância de resultados e de deduções deste trabalho com as assertivas de ERICKSON et al. (1977).

Outro aspecto pertinente está associado ao fenômeno da mutação presente em amostras do VDN, após passagens sucessivas, originando novas estirpes desse vírus, provavelmente com alteração da seqüência dos aminoácidos básicos presentes no sítio de clivagem F0. Infelizmente, 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 ERICKSON et al. (1977).

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 cloacal utilizado 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) e reação de inibição da hemaglutinação(HI)**

Os resultados da RT-PCR e da reação de HI dos periquitos-australianos após o desafio, nos diferentes grupos, estão presentes na Tabela 4.

Examinando a Tabela 4, com particular atenção ao lote de periquitos-australianos controle (Grupo IV), observa-se a não detecção de material genético do VDN dos suabes cloacais. Justifica-se tal resultado pela eliminação intermitente do VDN. Por outro lado, detectaram-se títulos de HI aos 13 e 19 dias do período pós-desafio, o que vem confirmar a susceptibilidade desta espécie ao VDN. Em contraste, nos lotes de periquitos-australianos vacinados (Grupos I a III), decorridos 13 e 19 dias após a inoculação da estirpe virulenta, a pesquisa de material genético do VDN, bem como o título de HI foram nulos.

Pelos resultados sorológicos obtidos, neste estudo, com os periquitos-australianos controle (Grupo IV), ficou demonstrado o estado de portador de VDN por esta espécie animal, durante o período avaliado, decorridos 19 dias da infecção experimental com este patógeno (Tabela 4).

O fato de não ter sido revelado material genético do VDN e nenhum título de HI em periquitos-australianos 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 periquitos-australianos (Grupos I a III), indubitavelmente, contribuiu

efetivamente para a não detecção de material genético do VDN e títulos sorológicos (HI) nesta espécie animal. Em verdade, a instituição de programas imunoprolifáticos contra a enfermidade de Newcastle e específicos para criação de periquitos-australianos, ao menos, neste estudo, passaram 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 em periquitos-australianos e a importância da imunoprolifaxia na supressão deste estado.

Tabela 4. Pesquisa de genoma viral e de anticorpos para o vírus da Doença de Newcastle, respectivamente, por reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR), a partir de suabes de cloaca, e por reação de inibição da hemaglutinação (HI) em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) vacinados e revacinados contra a Doença de Newcastle, obtidos 13 e 19 dias após-desafio (dpi), nos diferentes grupos experimentais (n=24)

Grupo	Vacinação (5 meses)	Revacinação Via ocular (7, 8,5 e 10 meses)	Genoma viral do VDN (RT-PCR) e HI			
			13 dpi		19 dpi	
			RT-PCR	HI	RT-PCR	HI
I	Ulster 2C	Ulster 2C	-	0	-	0
II	B1	B1	-	0	-	0
III	LaSota	LaSota	-	0	-	0
IV*	Controle	- - -	-	5 <sup>1</sup>	-	5

\*Grupo controle – não vacinado

- = ausência da estirpe patogênica do VDN

1= título (log<sub>2</sub>)



## **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) dos periquitos-australianos 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 do VDN através da RT-PCR, bem como o teste de HI, conforme técnica e critérios estabelecidos, respectivamente, no item 4.1.8. e 4.1.5 (Experimento 1).

Já os periquitos-australianos 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.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da pesquisa de genoma viral do VDN, por RT-PCR, bem como os resultados dos títulos de HI em periquitos-australianos, em período pós-desafio ou não.

Analisando a Tabela 5, verifica-se que não houve a detecção de material genético do VDN das fezes, assim como título sorológico de HI para periquitos-australianos, à véspera do desafio, o que vem comprovar que os periquitos-australianos estavam isentos de infecção pelo VDN.

O fato de ter sido detectado títulos sorológicos (HI) em periquitos-australianos permite caracterizar o estado de portador de VDN desta espécie animal, 19 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 periquitos-australianos possuem estado de portador do VDN, 19 dias pós-desafio. Tal fato pode se constituir em um problema para a avicultura comercial e ou para criação de aves silvestres, semisilvestres e exóticas criadas em cativeiro.

Examinando ainda a Tabela 5, observa-se que não houve a detecção de material genético do VDN dos suabes cloacais, aos 13 e 19 dias pós-desafio. Tal fato pode ser justificado pela eliminação intermitente do VDN.

Tabela 5. Pesquisa de genoma viral e de anticorpos para o vírus da Doença de Newcastle, respectivamente, por reação de cadeia de polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR), a partir de suabes de cloaca, e por reação de inibição da hemaglutinação (HI) em periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) não vacinados contra a DN, à véspera do desafio (VD) e aos 13 e 19 dias pós-desafio (dpi)

Aves	Exame de material genético do VDN e HI					
	VD		13 dpi		19 dpi	
	RT-PCR	HI	RT-PCR	HI	RT-PCR	HI
Periquitos-australianos ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	-	-	-	+	-	+

HI =  $(\log_2 5)$

+ = teste positivo

- = teste negativo

### 5.2.2. Observação clínica, necropsopia, reação de cadeia de polimerase pós Transcrição Reversa (RT-PCR) e reação de inibição da hemaglutinação (HI) das aves SPF conviventes com periquitos-australianos inoculados com o VDN

Os dados apresentados na Tabela 6 mostram que nenhuma das aves SPF conviventes com periquitos-australianos infectados com uma estirpe patogênica do VDN, decorridos 13 (Grupo 1) e 19 (Grupo 2) dias pós-desafio sucumbiram após o contato direto com periquitos desafiados. Observou-se ainda a ausência de sinais clínicos e lesões sugestivas da DN. Porém, foram obtidos resultados positivos na pesquisa de material genético do VDN, de acordo com a metodologia e critérios aplicados no item 4.1.8. (Experimento 1), além do título médio de anticorpos inibidores

da hemaglutinação (HI) obtido (da ordem de  $\log_2 5$ ) conforme técnica descrita no item 4.1.5. (Experimento 1).

Por tais resultados, é certo que os periquitos-australianos inoculados com o VDN, embora não tenham contraído ou manifestado a sintomatologia sugestiva de Newcastle, eliminaram vírus em quantidade suficiente para induzir infecção nas aves SPF conviventes. Além disso, obviamente, as aves SPF conviventes com os periquitos-australianos inoculados com o VDN não eram vacinadas contra a enfermidade de Newcastle e, portanto, não possuíam imunidade para impedir a infecção. 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).

Pelos achados alcançados então, neste trabalho, empregando-se animais de experimentação, quais sejam, aves SPF em contato direto com periquitos-australianos inoculados com o VDN, ficou patente a transmissão de vírus desta última espécie, decorridos 19 dias da infecção experimental com este patógeno, para aves SPF conviventes, o que vem realçar a importância dos periquitos-australianos, do ponto de vista epidemiológico, como fonte disseminadora de VDN para aves domésticas em convívio ou próximas a sua criação.

Por outro ângulo, o fato de aves SPF conviventes com periquitos-australianos inoculados com o VDN terem se infectado com o VDN, passados 19 dias da infecção experimental com este patógeno, vem enfatizar o real papel exercido pela espécie *Melopsittacus undulatus*, no plano epidemiológico, ainda que em potencial, 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 ou silvestres em convívio ou próximas a seu hábitat natural e/ou em confinamento.

Em linhas gerais então, é pertinente notar que o esclarecimento de importantes aspectos epidemiológicos da enfermidade de Newcastle, entre eles, o papel representado pelos periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) como fonte de infecção de VDN para aves domésticas conviventes, abre novas fronteiras para

investigação dessa enfermidade em outras espécies aviárias domésticas, semi-domésticas, silvestres, exóticas e/ou migratórias, em confinamento ou não.

Tabela 6. Resultados da observação clínica, necropsopia, pesquisa em suabe de cloaca (C) da presença de genoma viral (RT-PCR) do vírus de Newcastle (VDN), e sorologia (HI) das aves SPF conviventes com periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) inoculados com o vírus de Newcastle decorridos 13 (Grupo 1) e 19 (Grupo 2) dias após o convívio com periquitos inoculados (dpi)

Parâmetros avaliados	Aves SPF conviventes com periquitos-australianos ( <i>Melopsittacus undulatus</i> ) inoculados com o VDN	
	13 dpi	19dpi
Sinais clínicos sugestivos da DN	-	-
Mortalidade (%)	0	0
Lesões sugestivas da DN	-	-
RT-PCR (C)	+	+
Sorologia (HI-log <sub>2</sub> 5)	+	+

+ = teste positivo

- = teste negativo

## 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 periquitos-australianos;
2. Os programas imunoproliféricos ensaiados, mediante o emprego das amostras vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota foram igualmente eficientes no estímulo da resposta imune humoral (HI);
3. Os periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) mostraram-se refratários à enfermidade clínica após o desafio com VDN patogênico;
4. Os periquitos-australianos mostram-se sensíveis à infecção experimental com o VDN patogênico;
5. Ficou demonstrado o estado de portador de VDN dos periquitos-australianos, decorridos 19 dias da infecção experimental com este patógeno;
6. Ficou caracterizada a importância da imunoprolifaxia na supressão do estado de portador do VDN do periquitos-australianos;
7. Ficou evidenciada a importância do periquito-australiano do ponto de vista epidemiológico, como fonte disseminadora do VDN para aves SPF conviventes, decorridos até 19 dias da infecção experimental com este patógeno.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ACKERMAN, W.W. Cell surface phenomena of Newcastle Disease virus. In: HANSON, R.P., Ed. **Newcastle Disease Virus. An Envolving Pathogen**. Madison: University Wisconsin Press, p. 153-166, 1964.

ALDOUS, E.W.; ALEXANDER, D.J. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). **Avian Pathology**, v.30, p.117-128, 2001).

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease virus - An avian paramyxovirus. In: ALEXANDER, D. J. **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**. 9<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, p. 496-519, 1991.

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

AWAN, M. A.; OTTE, M. J.; JAMES, A. D. The epidemiology of Newcastle disease rural poultry: a review. In: **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<sup>o</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, p. 452-470, 1984.

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

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 - MAPA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. Atos Legais. Brasília, 81p, 1994.

CAMPIONI, J. M.; PAULILLO, A.C.; SCHIMIDT, E.M.S.; NISHIZAWA, M. Clinical and Immunological Parameters of Newcastle Disease Vaccination in Chinese Goose (*Anser cygnoides*), **International Journal of Poultry Science**, v.7, p. 676-677, 2008.

CAVANAGH, D. Innovation and discovery: the application of nucleic acid-based technology to avian virus detection and characterization. **Avian Pathology**, v.30, p.581-598, 2001.

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

CREELAN, J.L.; GRAHAM, D.A.; MCCULLOUGH, S.J. Detection and differentiation of pathogenicity of avian Paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, v.31, p. 493-499, 2002.

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. 260p, 1971.

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 B<sub>1</sub>, do vírus da doença de Newcastle**. 1997. 97f. 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. 65f. 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, p. 168-181, 2007.

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 B<sub>1</sub> par nebulization. **Record Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 143, p. 337-342, 1967.

ERICKSON, G.A. Interaction between Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease Virus and pet birds of six espécies I. Clinical and sorological responses, and viral excretion. **Avian Disease**, v 21, p 642-654, 1977.

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.

FONSECA, F.; HUBNER, S.O.; VARGAS, G.D.; FISCHER, G. ; VIDOR, T. Avaliação do uso de sangue em papel-filtro para detecção e quantificação de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.2, p.319-324, 2007.

FORSHAW, J.M. **Parrots of the world**. 2. ed. Neptune: T.F.H. Publications, 1977.

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

HARPER, E.J.; LOWE, B. Hematology values in a colony of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and changes associated with aging. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.128, n.12,p.2639S-2640S, 1998.

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.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L.S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11. ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>>. Acesso em: 27 jan. 2010.

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

JESTIN, V.; JESTIN, A. Detection of Newcastle Disease Virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR). **Archives of Virology**, v.118, p. 151-161, 1991.

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

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, Lima. **Anais...** p.56-62, 1999.

KOWUENHOVEN, B. Newcastle Disease. In: MCFERRAN, J.B.; MCNULTY, M.S. (Ed.). **Virus Infection in Birds**. 3<sup>rd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science. p. 341-361, 1993.

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

KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. Aids to Diagnosis In: **Essentials of Avian Medicine and Surgery** 3<sup>rd</sup> ed Blookwell Publishing: Oxford, p.56-71, 2007.

LAMB, R.A.; KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUSS, S.E. (Ed.). **Fields Virology**, 3<sup>rd</sup> ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. p. 1177-1204, 1996.

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: Departament of Agriculture, 1975.

LEEuw, O.; PEETERS, B. Complete nucleotide sequence of Newcastle Disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily *Paramyxovirinae*. **Journal of General Virology**, v.80, p131-136, 1999.

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.

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.

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

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:<<http://agricultura.gov.br/>> Acesso em 27 jun. 2009.

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.

MERZ, D.V.; SCHEID, A.S.; CHOPPIN, P.W. Immunological studies of the functions of Paramyxovirus glycoproteins. **Virology**, v.109, p.94-96, 1981.

MILLAR, N.S.; CHAMBERS, P.; EMMERSON, P.T. Nucleotide sequence of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle Disease virus, strain Ulster: Molecular basis of variations in pathogenicity between strains. *Journal of General Virology*, v.69, p. 613-620, 1988.

NISHIZAWA, M. ; PAULILLO, A. C. ; NAKAGHI, L. S. O. ; NUNES, A. D. ; CAMPIONI, J. M. ; DORETTO JUNIOR, L. . Newcastle disease in with 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. World Organization for Animal Health - **Enfermedades de la Lista de la OIE**. Disponível em :< [http://www.oie.int/esp/maladies/es\\_classification2007.htm?e1d7](http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification2007.htm?e1d7)> Acesso em 27 jun. 2009.

PAULILLO, A. C. **Doença de Newcastle: estudo experimental da resposta imune às estirpes vacinais B1 e LaSota.** 1980. 84 f. 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. 129 f. 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. 116 f. Tese (Livre Docência em Ornitopatologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1989.

PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; DORETTO JUNIOR, L.; MEIRELES, M. V.; KRONKA, S. N.; ARIKI, J.; SAKOMURA, N. K.; RIBEIRO, R. C. Estudos zootécnicos e imunológicos 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. p.388-390, 1996.

PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; MORO, M. E. G.; DORETTO JÚNIOR, L., MEIRELES, M. V.; SHOCKEN-ITURRINO, R. P.; SOUSA, R. L. M. Importância 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, Lima. **Memorias** ...p. 291-293, 1999.

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<sup>º</sup>, 2002, La Habana. 1 CD-room.

PAULILLO, A.C.; DORETTO JÚNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M.(Ed.) **Doenças das aves**. 2<sup>a</sup> ed Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 267-281, 2009.

PAULILLO, A.C.; PINTO, A. A.; ARIKI, J.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Doença de Newcastle. I . Estudo experimental da resposta imune às estirpes vacinais B<sub>1</sub> 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.; LIMA, F.S.; DORETTO JÚNIOR, L., MORAES, V.M.B.; SOUSA, R.L.M.; MONTASSIER, H.J.; GAMA, N.M.S.Q.; AMOROSO, L. Estudio de la vacunación experimental en codornices (*Coturnix coturnix japonica*) contra la enfermedad de Newcastle y investigación del estado de portador del virus. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 17<sup>º</sup>, Ciudad de Guatemala. **Memorias** ...p. 497-503, 2001.

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.

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

SEAL, B.S.; KING, D.J.; BENNET, J.D. Characterization of Newcastle Disease Virus isolates by reverse transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence data base for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2624-2630, 1995.

SEAL, B.S.; KING, D.J.; BENNET, J.D. Characterization of Newcastle disease virus vaccines by biological properties and sequence analysis of the hemagglutinin-neuraminidase protein gene. **Vaccine**, v.14, n.8, p. 761-766, 1996.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. 3. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997.

SILVA, R. A. 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. p. 247-255, 1988.

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.

TOYODA, T.; SAKAGUCHI, T.; IMAI, K.; INOCÊNCIO, N.M.; GOTOH, B.; HAMAGUCHI, M.; NAGAI, Y. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle Disease virus. **Virology**, New York, v. 158, p. 242–247, 1987.

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

VINER, B. **Tudo sobre seu periquito-australiano**. São Paulo: Livraria Nobel S. A.. 32p, 2000.

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

Apêndice A. Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA – FCAV – Unesp, *campus* Jaboticabal) protocolo nº007606-08 (07/05/2008).


 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
 CÂMPUS DE JABOTICABAL
 

**CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 007606-08 do trabalho de pesquisa intitulado "Estudo de parâmetros clínicos e imunitários da vacinação contra a doença de Newcastle e sua importância epidemiológica em periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*)", 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 (CBEA) 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 Lúcio de Araújo**  
 Presidente - CEBEA

  
**Msc. Vet. Maria Alice de Campos**  
 Secretária - CEBEA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil  
 tel. 3509-2600 fax. 3509-4275 www.fcav.unesp.br