

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**“ESTUDO DOS ESTADOS IMUNE E DE PORTADOR EM
MARRECOS DE PEQUIM (*Anas platyrhynchos*) FRENTE AO VÍRUS
DA DOENÇA DE NEWCASTLE”**

Márcia Nishizawa

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de DOUTOR EM MEDICINA
VETERINÁRIA – Área de Concentração em
PATOLOGIA ANIMAL.**

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MÁRCIA NISHIZAWA – nasceu em São Caetano do Sul - SP em 26 de julho de 1976. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Jaboticabal, com colação de grau em janeiro de 2000. Durante a graduação, nos anos de 1998 e 1999, foi bolsista da FAPESP, onde participou de vários projetos de pesquisas relacionados à biologia molecular, enfocando principalmente o estudo das proteínas de estresse (Hsp70 e Hsp90) em ratos de laboratório. Titulou-se Mestre pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, Departamento de Patologia Animal, em fevereiro de 2003, com a dissertação intitulada “Aspectos clínicos, imunológicos e patológicos da vacinação experimental em frangos de corte com estirpes do vírus da doença infecciosa da bursa”. Tal trabalho foi realizado com apoio técnico e financeiro da empresa Fort Dodge Saúde Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Paulillo.

No ano de 2003, ingressou profissionalmente como docente no curso de Medicina Veterinária na Universidade Metodista de São Paulo e na Fundação Municipal de ensino Superior de Bragança Paulista, onde atua até hoje.

Ingressou no doutorado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, Departamento de Patologia Animal, em março de 2003, também sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Paulillo.

AGRADEÇO A DEUS,

***PELA MINHA EXISTÊNCIA E POR SEMPRE ESTAR
AO MEU LADO, ILUMINANDO O MEU CAMINHO AO LONGO
DA VIDA***

Aos meus pais,

Koiti e Kimie

*Pelo exemplo de honestidade, dignidade, perseverança e por
sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas*

DEDICO

Aos meus irmãos,

Eliana e Cláudio

Pelo carinho e apoio

Ao meu namorado

Alexandre Angrisano

*Por ser o grande amor da minha vida, uma pessoa que eu
tanto amo*

*...Ofereço meu amor e alegria por mais uma etapa
cumprida*

Ao Orientador

Prof. Dr. Antônio Carlos Paulillo

Pela amizade e orientação, os meus sinceros agradecimentos

AGRADECIMENTOS

- À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP –Jaboticabal
- Ao Luciano Doretto pela colaboração no experimento
- À Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi, pela amizade e auxílio na análise de microscopia eletrônica
- Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi pela essencial ajuda na análise histopatológica
- À Profa. Dra. Vera Maria Barbosa de Moraes, pela ajuda no manejo ambiental das aves
- Ao Prof. Dr. Otto Mack Junqueira, pela formulação da ração
- À Suzana Satomi Kuchiishi, Regiane Peres, Daniella de Carvalho Paes, Daniela Martins Ferreira e Rosana Nozoe, pela grande amizade e companheirismo
- À Chica e Lia, pela realização dos cortes histológicos
- À todos os funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, principalmente a Aparecida R. Batista e Antônio J. dos Santos
- À Claudinha, pelo essencial auxílio na microscopia eletrônica de varredura
- Aos meus colegas de trabalho da UMESP e da FESB, pela amizade
- À Sophia, Giovanni e Sarah, que me alegravam nos meus momentos mais difíceis
- A todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho

Muito obrigada

ÍNDICE

	Pág
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
3.2.1. Experimento 1.....	14
3.2.2. Experimento 2.....	14
3.2.3. Experimento 3.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. EXPERIMENTO 1.....	17
4.1.1. Instalações.....	17
4.1.2. Aves experimentais, manejo e nutrição.....	17
4.1.3. Vacinas.....	18
4.1.3.1. Determinação da dose infectante 50% (EID ₅₀) para o embrião.....	18
4.1.4. Vacinação e amostragem.....	19
4.1.4.1. Vacinação via ocular.....	20

4.1.5.Exames clínicos.....	20
4.1.6. Colheita de sangue.....	20
4.1.7. Reação de inibição da hemaglutinação (HI).....	20
4.1.7.1. Antígeno para reação de inibição da hemaglutinação.....	21
4.1.7.2.Técnica da reação de inibição da hemaglutinação.....	21
4.1.8. Desafio.....	21
4.1.9. Observação clínica e necropsopia.....	22
4.1.10.Reisolamento da estirpe patogênica do VDN.....	23
4.1.11. Delineamento experimental.....	24
4.2. EXPERIMENTO 2.....	25
4.2.1. Instalações.....	25
4.2.2. Aves experimentais.....	25
4.2.3. Desafio.....	25
4.2.4. Observação clínica e necropsopia.....	26
4.2.5. Reisolamento da estirpe patogênica, do VDN.....	26
4.2.6. Colheita de sangue	26
4.2.7. Reação de inibição da hemaglutinação (HI)	27
4.3. EXPERIMENTO 3.....	27
4.3.1. Aves experimentais.....	27
4.3.2. Vacinação e amostragem.....	27
4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. EXPERIMENTO 1.....	31

5.1.1. Exames clínicos.....	31
5.1.2. Exames sorológicos	32
5.1.3. Desafios.....	34
5.1.4. Reisolamento da estirpe patogênica, do VDN.....	38
5.2. EXPERIMENTO 2.....	39
5.2.1. Desafio, observação clínica, necropsia e reisolamento da estirpe velocênica viscerotrófica, do VDN.....	39
5.2.1.1. Aves SPF e marrecos de Pequim inoculados com o VDN.....	39
5.2.2. Observação clínica, necropsia, reisolamento da estirpe velocênica viscerotrófica, do VDN, e sorologia (HI).....	40
5.2.2.1. Aves SPF conviventes com marrecos de Pequim inoculados com o VDN.....	40
5.3. EXPERIMENTO 3.....	45
5.3.1. Microscopia eletrônica de varredura.....	45
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS	52

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1	Distribuição dos marrecos de Pequim (<i>Anas platyrhynchos</i>) em diferentes grupos experimentais, vacinados contra a DN aos sete dias e revacinados aos 29 dias de idade por via ocular, com diferentes estirpes vacinais.....
	19
Tabela 2	Distribuição dos marrecos de Pequim (<i>Anas platyrhynchos</i>) em diferentes grupos experimentais, vacinados contra a DN aos sete dias de idade por via ocular, com diferentes estirpes vacinais, e posteriormente submetidos à colheita de fragmentos de traquéia aos sete, 14 e 21 dias após a vacinação.....
	29
Tabela 3	Médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) (log 2) dos soros dos marrecos de Pequim (<i>Anas platyrhynchos</i>) submetidos a diferentes programas de vacinação contra a DN, em período compreendido entre sete e 60 dias de idade, nos diferentes grupos experimentais.....
	33
Tabela 4	Resultados do desafio com vírus patogênico da DN, em marrecos de Pequim (<i>Anas platyrhynchos</i>), aos 60 dias de idade, nos diferentes grupos de marrecos de Pequim vacinados e revacinados por via ocular contra a DN.....
	35
Tabela 5	Resultados do reisolamento da estirpe patogênica, do VDN a partir de suabes de traquéia e doaca dos marrecos de Pequim (<i>Anas platyrhynchos</i>) vacinados e revacinados contra a DN, realizados aos seis, 14, 20 e 30 dias pós-desafio, nos diferentes grupos

	experimentais.....	38
Tabela 6	Resultados do reisolamento da estirpe patogênica do VDN, dos marrecos de Pequim (<i>Anas platyrhynchos</i>) não vacinados contra a DN, à véspera do desafio e aos cinco, 14, 20, 25 e 30 dias pós-desafio.....	41
Tabela 7	Resultados da observação clínica, necropsopia, reisolamento da estirpe patogênica, do VDN, e sorologia (HI) das aves SPF conviventes com marrecos de Pequim não vacinados contra a DN e inoculados com o VDN, decorridos cinco (Grupo 1) e 14 (Grupo 2) dias pós-desafio.....	42

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Marrecos de Pequim aos 50 dias de idade em boxe de galpão experimental.....	17
Figura 2	Colheita de sangue de marrecos de Pequim a partir da punção da veia ulnar.....	20
Figura 3	Reisolamento da estirpe velocidade viscerotrópica do VDN. Inoculação de amostra de suabes traqueais e cloacais em ovo embrionado de galinha SPF.....	24
Figura 4	Proventrículo e traquéia hemorrágicos de aves SPF colocadas em contato com marrecos de Pequim inoculados com VDN.....	43
Figura 5	Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de <i>Anas platyrhynchos</i> , aos 14 dias de idade. Grupo controle, não vacinado. Epitélio traqueal íntegro, repleto de cílios traqueais (CT). Barra de escala = 10 µm.....	47
Figura 6	Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de <i>Anas platyrhynchos</i> , aos 14 dias de idade. Grupo vacinado com Ulster 2C. Epitélio traqueal íntegro, repleto de cílios traqueais (CT). Barra de escala = 10 µm.....	47
Figura 7	Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de <i>Anas platyrhynchos</i> , aos 14 dias de idade. Grupo vacinado com estirpe B1. Epitélio traqueal apresentando regiões desprovidas com descamação (DC). Barra de escala = 10 µm.....	48

- Figura 8 Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de *Anas platyrhynchos*, aos 14 dias de idade. Grupo vacinado com estirpe LaSota. Epitélio traqueal apresentando extensas regiões com descamação (DC) e muco (M). Barra de escala = 10 μ m..... 48
- Figura 9 Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de *Anas platyrhynchos*, aos 21 dias de idade. Grupo vacinado com estirpe LaSota. Epitélio traqueal apresentando regiões com descamação (DC). Barra de escala = 10 μ m..... 49
- Figura 10 Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de *Anas platyrhynchos*, aos 28 dias de idade. Grupo vacinado com estirpe LaSota. Epitélio traqueal apresentando recuperação do epitélio ciliar do lúmen traqueal (CT) e muco (M). Barra de escala = 10 μ m.. 49

**“ESTUDO DOS ESTADOS IMUNE E DE PORTADOR EM MARRECOS DE PEQUIM
(*Anas platyrhynchos*) FRENTE AO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE”**

RESUMO – Parâmetros imunológicos, clínicos, epidemiológicos e patológicos da vacinação em marrecos de Pequim foram avaliados por 3 experimentos. Para tanto, foram utilizadas amostras vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do vírus da doença de Newcastle (VDN). No experimento 1, foram utilizados 120 marrecos de Pequim de 1 dia de idade, distribuídos em 4 tratamentos de 30 animais cada, submetidos a diferentes programas imunoproláticos. A resposta imune foi avaliada pelo teste de HI, com posterior desafio frente a estirpe patogênica do VDN, aos 60 dias de vida das aves. Após o desafio, em todos os grupos, procedeu-se o reisolamento de vírus patogênico em embriões SPF. Independente do grupo experimental, sinais clínicos da reação vacinal não foram observados. Os resultados dos títulos de anticorpos (HI) mostraram que os programas imunoproláticos ensaiados foram igualmente eficientes no estímulo da resposta imune humoral. Os marrecos de Pequim desafiados mostraram-se refratários à enfermidade clínica com o VDN. Entretanto, ficou caracterizado o estado de portador de VDN nesta espécie decorridos até 30 dias da infecção experimental com este patógeno. Nos grupos vacinados, o reisolamento de vírus patogênico foi nulo, evidenciando-se assim a importância da imunoprolaxia na supressão do estado de portador de VDN dos marrecos de Pequim. No experimento 2, aves SPF foram colocadas em contato íntimo com marrecos de Pequim inoculados com uma estirpe patogênica do VDN, decorridos cinco e 14 dias. Observou-se a transmissão de vírus patogênico (VDN) dos marrecos de Pequim para as aves SPF conviventes decorridos até 14 dias da infecção experimental com este patógeno, o que vem realçar a importância do marreco de Pequim como fonte potencial de infecção de VDN para aves domésticas. No experimento 3, a microscopia eletrônica de varredura mostrou-se um método seguro e eficaz na avaliação da patogenicidade das estirpes vacinais, do VDN, em epitélio traqueal de marrecos de Pequim, decorridos sete, 14 e 21 dias após a vacinação.

Palavras-Chave: doença de Newcastle, estado de portador, marreco de Pequim, microscopia eletrônica de varredura, teste de reação de inibição da hemaglutinação (HI) e vírus da doença de Newcastle.

“STUDY OF IMMUNOLOGICAL RESPONSE AND STATE OF CARRIER IN WHITE PEKIN DUCKS (*Anas platyrhynchos*) FOR NEWCASTLE DISEASE VIRUS”

SUMMARY - The clinical, epidemiological, immunological and pathological parameters of vaccination in white Pekin ducks were investigated using 3 experiments. Ulster 2C, B1 and LaSota vaccines strains of the Newcastle disease virus (NDV) were used. In experiment 1, 120 one-day-old white Pekin ducks 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 re-isolation of the virus in SPF embrionated eggs. 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 white Pekin ducks were refractory to the NDV clinical disease. However, a NDV carrier state was shown in this species until 30 days after experimental infection. The vaccinated groups of white Pekin ducks did not present any virus in the re-isolation of the pathogenic virus. Therefore, these results show the relevance of vaccination in suppressing a NDV carrier state in the white Pekin ducks. In experiment 2, SPF chickens housed with white Pekin ducks which were previously inoculated with a pathogenic NDV strain, developed severe and characteristic NDV lesions and died, after five and 14 days. Therefore, the pathogenic virus (NDV) was transmitted from the white Pekin ducks to SPF birds up to 14 days after challenge, showing the importance of the Pekin ducks as source of dissemination of NDV to domestic birds. In experiment 3, scanning electron micrography proved to be a safe and efficient method in the evaluation of pathogenicity of vaccine strains, Ulster 2C, B1 and LaSota, of the NDV, in the tracheal epithelium of white Pekin ducks at seven, 14 and 21 days after vaccination.

Keywords: Newcastle disease, NDV state of carrier, white Pekin ducks, scanning electron micrography, inhibition of hemagglutination test (HI), Newcastle disease virus.

1. INTRODUÇÃO

Os marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*), como o próprio nome sugere, são originários da China. São aves muito precoces e aos 60 dias de idade, o marreco já está pronto para o abate sendo a espécie de anatídeos mais freqüentemente criada para a produção comercial devido à sua grande aptidão para a produção de carne. É um animal altamente rústico e apresenta boa conversão alimentar.

Tais aves pertencem à ordem dos *Anseriformes*, família *Anatidae* e ao gênero *Anas*, sendo explorada comercialmente a espécie *Anas platyrhynchos*.

No Brasil, o início da criação intensiva de marrecos de Pequim é bem recente e sua propagação tem sido muito rápida. Sua entrada em nosso país ocorreu em meados da década de 90, com a importação de material genético de boa qualidade, o que resultou em maiores índices de conversão alimentar e de rendimento de carcaça. Atualmente, a produção de marrecos de Pequim está concentrada principalmente nos estados do Rio Grande Do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro. Tal espécie é susceptível à infecção natural ou experimental, ao vírus da doença de Newcastle (VDN).

Esses animais são facilmente adaptáveis ao cativeiro, com elevado potencial zootécnico; entretanto, até o presente, nada foi feito com relação ao controle sanitário para sua preservação em confinamento.

Por outro lado, semelhantemente à avicultura moderna, a produção de marrecos de Pequim, 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 VDN.

Assim sendo, a melhor caracterização e o controle imunoprofilático do VDN em marrecos de Pequim em nosso meio enfatiza a relevância desta pesquisa - com impacto no setor produtivo.

Paralelamente aos estudos direcionados ao desenvolvimento de programas imunoprofiláticos e específicos para a espécie *Anas platyrhynchos*, 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, o que vem exacerbar ainda mais a importância deste estudo - 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 infecciosas de notificação imediata da “Organização Mundial de Saúde Animal OIE”, sendo seus focos de notificação compulsória OIE (2006).

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, 2005), 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 Gterminal 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, 2005).

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).

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).

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, 2000).

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.

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.

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 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).

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, 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.

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, 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 (Anexo 1), 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 zoosanitárias 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, 2006; BRASIL, 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 (BRASIL, 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 (BRASIL, 2006).

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; 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 constitui 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 consideradas parcial ou totalmente silvestres.

Nesse contexto, insere-se a espécie *Anas platyrhynchos*, popularmente conhecido como marreco de Pequim, 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 (LIMA, 2005). Desse modo, torna-se patente a necessidade de desenvolvimento de programas imunoproláticos, efetivos, factíveis e condizentes com os atuais sistemas de criação de marrecos de Pequim.

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 (LIMA, 2005).

A propósito, Lima (2005) demonstrou experimentalmente que as 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, 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) 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 *Anas platyrhynchos* quanto à condição de portador e/ou de transmissor de VDN, as literaturas nacional e internacional consultadas são extremamente 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 marrecos de Pequim, 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 *Anas platyrhynchos*, 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, tentativas de isolamento viral em ovos embrionados, a

partir de suabes traqueais e/ou cloacais colhidos tanto de marrecos de Pequim 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 controlado 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, nossos estudos tiveram o objetivo de ampliar o conhecimento no campo da imunoprofilaxia contra a DN em marrecos de Pequim e na perpetuação do VDN nesta espécie animal, para estabelecer com maior exatidão as relações dentro do sistema vírus-hospedeiro-ambiente envolvidas nessa enfermidade.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

A revisão de literatura apresentada anteriormente deixa claro que, até o presente momento, no que diz respeito à doença de Newcastle, não existe nenhuma orientação profilática, baseada em dados de pesquisa, às explorações de marrecos de Pequim. Nesse prisma, a presente pesquisa teve como objetivo estudar comparativamente os aspectos clínicos, imunitários e patológicos no trato respiratório superior/traquéia (microscopia eletrônica de varredura) da vacinação experimental em marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) com as 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 marrecos de Pequim, em diferentes programas imunoprofiláticos contra a DN;
2. Avaliar a resposta imune às estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota administradas em marrecos de Pequim, em diferentes programas imunoprofiláticos contra a DN;
3. Pesquisar o estado de portador de VDN em marrecos de Pequim;
4. Esclarecer a importância da imunoprofilaxia contra a DN em marrecos de Pequim;
5. O tempo de replicação da estirpe patogênica do VDN em marrecos de Pequim.

3.2.2. EXPERIMENTO 2

1. Avaliar a duração do estado de portador de VDN em marrecos de Pequim;
2. Esclarecer a importância epidemiológica do estado de portador de VDN em marrecos de Pequim;

3. Estudar o tempo de replicação da estirpe patogênica do VDN em marrecos de Pequim.

3.2.3 EXPERIMENTO 3

1. Estimar o emprego da microscopia eletrônica de varredura na avaliação da reação respiratória pós-vacinal, em epitélio traqueal em marrecos de Pequim imunizados 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, Câmpus de Jaboticabal – UNESP (FCAV-Unesp) e nas dependências do LANAGRO, Campinas, SP.

As aves, durante o seu ciclo de vida (1 a 60 dias de idade), foram alojadas em um galpão de alvenaria convencionalmente utilizado em ensaios com frangos de corte, permanecendo 10 animais por boxe de galpão (Figura 1).



Figura 1: Marrecos de Pequim aos 50 dias de idade em boxe de galpão experimental.

4.1.2. Aves experimentais, manejo e nutrição

Foram utilizados 120 marrecos de Pequim de um dia de idade.

Os marrecos de Pequim, 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 marrecos de Pequim 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 marrecos de Pequim foram mantidos isolados entre si e com o grupo controle para evitar a influência de um tratamento sobre o outro.

As aves receberam água e ração *ad libitum*. 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 marrecos (Anexo 2).

De um modo geral, os animais foram submetidos às similares condições do manejo usual empregado na criação de marrecos de Pequim.

4.1.3. Vacinas

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, de oito a 10 dias de incubação.

4.1.3.1. Determinação da dose infectante 50% (EID₅₀) para o embrião

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 de 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):

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

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

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

4.1.4. Vacinação e amostragem

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 marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) em diferentes grupos experimentais, vacinados contra a DN aos sete dias e revacinados aos 29 dias de idade por via ocular, com diferentes estirpes vacinais.

Grupo	Vacinação (7 dias)	Via de administração	Revacinação via ocular (29 dias)
I	Ulster 2C	Ocular	Ulster 2C
II	B1	Ocular	B1
III	LaSota	Ocular	LaSota
IV*	Testemunho	-----	-----

*Grupo Controle – não recebeu vacina

4.1.4.1. Vacinação via ocular

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; 1989) e por PAULILLO et al. (1982; 1987; 1996; 2002).

4.1.5. Exames clínicos

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

4.1.6. Colheita de sangue

Foram colhidas 324 amostras de sangue a partir do primeiro dia de idade das aves, com intervalos regulares de sete dias, sendo realizadas nove colheitas de sangue no total. As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia ulnar (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.



Figura 2: Colheita de sangue de marrecos de Pequim a partir da punção da veia ulnar.

4.1.7. Reação de inibição da hemaglutinação

As amostras de soro foram submetidas à pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação para a DN. Para tanto, utilizou-se a reação de inibição da hemaglutinação (HI), com antígenos vivos.

4.1.7.1. Antígeno para reação de inibição da hemaglutinação

O antígeno 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.

4.1.7.2. Técnica da reação de inibição da hemaglutinação

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^o 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^o 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.

4.1.8. Desafio

Aos 60 dias de vida dos animais, quatro marrecos de cada repetição, perfeitamente identificados com anilhas metálicas numeradas e colocadas na região da asa direita, foram desafiados com uma estirpe velogênica viscerotrópica (patogênica) 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 composto por 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 às aquelas empregadas nos desafios dos marrecos de Pequim, também foi inoculada a estirpe virulenta em apreço.

O desafio foi realizado nas dependências do LANAGRO, Campinas, SP.

As aves (marrecos e aves SPF) foram alojadas em isoladores de pressão negativa, com ar filtrado, água e ração “*ad libitum*”, convencionalmente utilizados para infecções experimentais com patógenos aviários.

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 marrecos de Pequim 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.

4.1.9. Observação clínica e necropsopia

Após o desafio, as aves foram observadas, diariamente, durante 30 dias, para o registro dos sinais clínicos e da mortalidade. Em todas as aves submetidas e sucumbidas ao desafio, foram realizados exames necroscópicos.

4.1.10. Reisolamento da estirpe patogênica do VDN

Para reisolamento da estirpe velogência viscerotrópica do VDN, foram utilizados os mesmos marrecos de Pequim usados para a prova de desafio aos 60 dias de vida dos animais. Decorridos seis, 14, 20 e 30 dias pós-desafio para todos os grupos, quatro marrecos de Pequim/grupo/colheita, aleatoriamente, foram empregados para colheitas de suabes de traquéia e cloaca, os quais foram suspensos em solução tamponada com fosfato em pH 7,2 contendo, respectivamente, 2000 e 10000 UI/mL de penicilina, 2000 e 10000 μ g/mL de sulfato de estreptomicina, 50 e 250 μ g/mL de sulfato de gentamicina e 1000 e 5000 UI/mL de fungizona, à temperatura de 4°C, e posteriormente centrifugados a 2000g por 10 minutos. Os sobrenadantes assim obtidos foram armazenados a -20°C até o momento de uso.

Esses espécimes foram então inoculados na cavidade alantóide de ovos embrionados SPF de 8 a 10 dias de incubação, conforme técnica descrita no item 4.1.3.1. (Figura 3). Os embriões com líquido alantóide positivo no teste de hemaglutinação (HA) foram considerados positivos. Na seqüência, com o intuito de estabelecer diagnóstico diferencial para outros vírus aviários com propriedades hemaglutinantes, foi realizado o teste de inibição da hemaglutinação (HI) com um soro de referência positivo de galinha contra o VDN, de acordo com ALLAN & GOUGH (1974), BEARD (1980) e ALEXANDER (1986). Para os embriões negativos, foram realizadas até três passagens “cegas”, antes da amostra ser considerada negativa. Essas amostras, do VDN, reisoladas então, quando inoculadas em aves SPF, resultavam em mortalidade de 100,0% dos animais.



Figura 3: Reisolamento da estirpe velogência viscerotrópica do VDN. Inoculação de amostra de suabes traqueais e cloacais em ovo embrionado de galinha SPF.

4.1.11. 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 marrecos de Pequim 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 nas dependências do LANAGRO, Campinas, SP.

As aves foram alojadas em isoladores de pressão negativa, convencionalmente utilizados para infecções experimentais com patógenos aviários, permanecendo 12 aves por isolador.

4.2.2. Aves experimentais

Foram utilizadas aves SPF conviventes com marrecos de Pequim inoculados com uma estirpe velogênica viscerotrópica do VDN. Cada grupo foi constituído por seis aves SPF e seis marrecos de Pequim. Foram empregados marrecos de Pequim com 20 dias de idade, sem histórico de vacinação ou contato com o VDN, comprovado pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI).

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

4.2.3. Desafio

Após aclimação dos animais nos isoladores, os marrecos de Pequim 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 marreco de Pequim, 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 marrecos de Pequim inoculados com a amostra patogênica do VDN, foram observadas, diariamente, durante 30 dias, para o registro dos sinais clínicos e da mortalidade. Necropsopia foi realizada nas aves SPF mortas durante o ensaio.

4.2.5. Reisolamento da estirpe patogênica, do VDN

À véspera do desafio e decorridos cinco, 14, 20, 25 e 30 dias após a inoculação dos marrecos de Pequim, suabes cloacais dos marrecos de Pequim foram processados, consoante descrito no item 4.1.10. (EXPERIMENTO 1). Ressalte-se aqui que uma mistura de três suabes cloacais formava uma amostra. Foram colhidas, no total, 24 amostras, as quais foram então inoculadas na cavidade alantóide de ovos embrionados de galinhas SPF de oito a 10 dias de incubação, conforme técnica descrita no item 4.1.3.1. (EXPERIMENTO 1), para reisolamento da estirpe patogênica do VDN. Os embriões eram considerados positivos ou negativos, conforme critérios estabelecidos no item 4.1.10. (EXPERIMENTO 1).

Procedimento similar foi adotado para aves SPF conviventes com marrecos de Pequim inoculados com o VDN, em cada grupo, incluindo o lote de aves SPF empregado como controle da patogenicidade do VDN. Para tanto, desses animais, foram colhidos suabes de traquéia e cloaca, processados conforme descrito no item 4.1.10. (EXPERIMENTO 1). Na seqüência, seguiram-se metodologia e critérios definidos, respectivamente, nos itens 4.1.3.1. e 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 marrecos de Pequim e/ou três dias após o aparecimento ou não de sintomatologia sugestiva da moléstia de Newcastle em aves SPF conviventes com marrecos de

Pequim inoculadas com uma estirpe patogênica do VDN, amostras de sangue de 50,0% - 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 e exames clínicos seguiram a mesma metodologia adotada no EXPERIMENTO 1.

4.3.1. Aves experimentais

Foram utilizados 12 marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) de um dia de idade. Essas aves foram distribuídas, aleatoriamente, em quatro tratamentos (grupos) e três repetições com uma ave por parcela.

4.3.2. Vacinação e amostragem

De acordo com a natureza do ensaio, os marrecos de Pequim foram separados, aleatoriamente, em quatro grupos de três animais cada, conforme a Tabela 2. Procedeu-se uma única vacinação contra a DN, via ocular, aos sete dias de vida das aves.

4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura

Para o emprego da microscopia eletrônica de varredura na avaliação da reação respiratória pós-vacinal, em epitélio traqueal de marrecos de Pequim, foram utilizados 12 animais. Decorridos sete, 14 e 21 dias do período pós-vacinal (três colheitas consecutivas), uma ave/grupo/colheita foi necropsiada para colheita de amostra, ou seja, de fragmento da porção média da traquéia, para avaliação dos níveis de destruição das células epiteliais consequente a replicação do vírus vacinal.

Os fragmentos de traquéia, medindo 5 x 8 mm, foram então imersos em solução salina a 0,85%, à temperatura ambiente, evitando-se assim a desidratação do tecido. O material assim obtido era fixado em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6, durante 12 horas, à temperatura de 4° C. A seguir, o material, após lavagens por seis vezes consecutivas no mesmo tampão, era pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,6, durante quatro horas, à temperatura de 4° C. Decorrido esse tempo, com o mesmo tampão, o material era novamente lavado por seis vezes consecutivas, desidratado pela sua imersão em concentrações crescentes de álcool etílico e passado pela câmara de secagem do secador de ponto crítico, mediante a utilização de dióxido de carbono. O material era então montado em um porta objeto apropriado, recoberto com uma camada de 30 nm de ouro e eletromicrografado em um microscópio eletrônico de varredura (Modelo Jeol JSM 5410), operando em 15 KV, conforme técnica descrita por POSTEK et al. (1980).

Tabela 2 - Distribuição dos marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) em diferentes grupos experimentais, vacinados contra a DN aos sete dias de idade por via ocular, com diferentes estirpes vacinais, e posteriormente submetidos à colheita de fragmentos de traquéia aos sete, 14 e 21 dias após a vacinação.

Grupo	Vacinação (7 dias)	Via de administração
I	Ulster 2C	Ocular
II	B1	Ocular
III	LaSota	Ocular
IV*	Testemunho	-----

* Grupo Controle – não recebeu vacina

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EXPERIMENTO 1

5.1.1. Exames clínicos

Lotes de marrecos de Pequim 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.

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).

Os lotes de marrecos de Pequim vacinados e revacinados, via ocular, com a estirpe Ulster 2C (Grupo I) também não mostraram sinais clínicos de reação vacinal.

A amostra Ulster 2C é a única em que o índice de patogenicidade intracerebral é nulo (ICPI 0,0) e, por conseguinte, menos patogênica do que as estirpes vacinais B1 (ICPI 0,2) e LaSota (ICPI 0,4) em uso (ALEXANDER, 1991).

A propósito, literatura pertinente (VAN ECK et al., 1991; SILVA, 1995; PAULILLO et al., 1996; DORETTO JÚNIOR, 1997) em pintos de corte 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 aerosol, foram observadas tão somente alterações muito suaves de natureza respiratória.

À observação clínica então, os marrecos de Pequim 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 marrecos de Pequim tenham sofrido influência da ausência de infecções concomitantes com outros agentes infecciosos, como o *Mycoplasma gallisepticum*, não provocando assim reações respiratórias pós-vacinais associadas às condições controladas do experimento.

5.1.2. Exames sorológicos

As médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) dos soros dos marrecos de Pequim estão presentes na Tabela 3. As aves deste ensaio, procedentes de matrizes não imunizadas contra a moléstia 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 da 2^a semana de vida, os títulos de HI dos soros dos marrecos de Pequim (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 3). É possível que este fato seja devido à experiência imunitária dos marrecos de Pequim (Grupos I a III), induzida pela vacinação e revacinação, respectivamente, aos sete e 29 dias de idade, mediante a aplicação das estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota.

Tabela 3 – Médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) ($\log_2$) dos soros dos marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) submetidos a diferentes programas de vacinação contra a DN, em período compreendido entre sete e 60 dias de idade, nos diferentes grupos experimentais.

GRUPO	VACINAÇÃO 7 dias	REVACINAÇÃO VIA OCULAR 29 dias	MÉDIAS GEOMÉTRICAS DOS TÍTULOS DE HI ($\log_2$)									
			Idade das aves (dias)									
			7	14	21	28	35	42	49	56	60	
I	Ulster 2C	Ulster 2C	0,0	2,3 ^a	3,0 ^a	3,5 ^a	3,8 ^a	4,5 ^a	4,5 ^a	4,3 ^a	4,8 ^a	
II	B ₁	B ₁	0,0	3,0 ^a	2,8 ^a	3,8 ^a	3,5 ^a	4,0 ^a	4,5 ^a	4,3 ^a	5,0 ^a	
III	LaSota	LaSota	0,0	2,5 ^a	3,5 ^a	4,0 ^a	4,0 ^a	4,8 ^a	4,8 ^a	4,8 ^a	5,0 ^a	
IV*	-	-	0,0	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b	

* 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 ($p \geq 0,05$).

Analisando a Tabela 3, 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 marrecos de Pequim 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 estáveis por todo o período experimental. Conforme os dados consignados na Tabela 3, as melhores médias registradas (4,8 e 5,0) foram moderadas, isto é, da ordem de 4,0 a 5,0, sendo obtidas aos 60 dias de idade, respectivamente, com as estirpes Ulster 2C e LaSota.

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 marrecos de Pequim (Grupos I e II).

Por outro lado, os títulos também moderados de anticorpos detectados nos soros dos marrecos de Pequim (Grupo III) não estão compatíveis com o grande potencial de difusão da estirpe LaSota (WINTERFIELD et al., 1957). Este fato pode ser atribuído, entre outros fatores, à baixa sensibilidade da técnica de HI empregada neste ensaio. De fato, na revelação de anticorpos na reação de HI, empregaram-se hemáceas de galinha ao invés de hemácias de marrecos de Pequim, afetando assim a sensibilidade do referido teste.

Em linhas gerais, tais reflexões coincidem substancialmente com os resultados estatísticos em questão, os quais não evidenciaram, pelo teste de Tukey, diferenças significativas ($p > , 5$) entre os lotes de marrecos de Pequim vacinados com as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota (Grupos 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 marrecos de Pequim, estabelecendo-se assim caminhos mais seguros para a produção de proteínas de origem animal – com reflexos positivos no setor produtivo.

5.1.3. Desafios

Os resultados do desafio com vírus patogênico da DN, em marrecos de Pequim, aos 60 dias de vida, estão presentes na Tabela 4.

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 4, 100,0% das aves sucumbiram ao desafio.

Tabela 4 - Resultados do desafio com vírus patogênico da DN, em marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*), aos 60 dias de idade, nos diferentes grupos de marrecos de Pequim vacinados e revacinados por via ocular contra a DN.

GRUPO	VACINAÇÃO (7 dias)	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	REVACINAÇÃO VIA OCULAR (29 dias)	Nº DE AVES TESTADAS	% MÉDIA DE PROTEÇÃO AO DESAFIO COM O VDN
I	Ulster 2C	Ocular	Ulster 2C	12	100,0
II	B1	Ocular	B1	12	100,0
III	LaSota	Ocular	LaSota	12	100,0
IV*	Controle	- - -	- - -	12	100,0
AVES “SPF” (“Specific pathogen free”) **				12	0,0

*Grupo testemunho – não vacinado

** Controle da patogenicidade do VDN

Os sinais clínicos mais evidentes, com início 72 horas após a inoculação do VDN, foram caracterizados, a princípio, por depressão, anorexia, penas eriçadas e conjuntivite, seguidos de espirros e por ruídos respiratórios leves. Na seqüência, foram observados sinais clínicos mais severos, como dispnéia intensa, diarreia profusa e esverdeada, corrimento naso-ocular abundante e mucóide, terminando com prostração e morte. Alterações anatomopatológicas comumente observadas 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 nos intestinos e nas tonsilas cecais.

Os distúrbios circulatórios nas 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 Paulillo et al. (2001).

Outro aspecto pertinente diz respeito aos resultados do desafio dos marrecos de Pequim 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 marrecos, resultados positivos e negativos têm sido reportados. De um modo geral, os marrecos podem ou não contrair a doença clínica com o VDN.

Parece razoável especular que esse fato esteja ligado ao fenômeno da recombinação genética presente em populações e subpopulações de partículas virais do VDN, com reflexo na resistência dos marrecos de Pequim 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 4).

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 marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*), o que poderia explicar a discrepância parcial de resultados e de deduções deste trabalho com a assertiva de REIS & NÓBREGA (1956).

Outro aspecto pertinente está associado ao fenômeno da mutação presente em amostras do VDN, originando novas cepas desse vírus, provavelmente com alteração da sequência dos aminoácidos básicos presentes no sítio de clivagem F0. Infortunadamente, a frequência de tal evento, qual seja, a taxa de mutação do VDN, é desconhecida na história da enfermidade de Newcastle (KING, 1999). Certamente, a frequência 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).

É oportuno enfatizar que a coabitação de aves infectadas com o vírus patogênico da doença de Newcastle com aves sadias (vacinadas ou não) é uma 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, 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 inoculação de exsudato traqueal em ovos embrionados SPF, foi reisolado a estirpe virulenta, do VDN, utilizada 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. Reisolamento da estirpe patogênica, do VDN.

Os resultados do reisolamento da estirpe patogênica do VDN, dos marrecos de Pequim, após o desafio, nos diferentes grupos, estão presente na Tabela 5.

Examinando a Tabela 5, com particular atenção ao lote de marrecos de Pequim testemunho (Grupo IV), observa-se que o reisolamento viral da cloaca e traquéia ocorreu de 20 até 30 dias do período pós-desafio, confirmando assim a susceptibilidade desta espécie ao VDN, consoante Reis & Nóbrega (1956). Em contraste, nos lotes de marrecos de Pequim vacinados (Grupos I a III), decorridos seis, 14, 20 e 30 dias após a inoculação da estirpe virulenta do VDN, o reisolamento viral foi nulo.

Pelos resultados obtidos, neste estudo com os marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) controle (Grupo IV), ficou demonstrado o estado de portador de VDN desta espécie animal, decorridos até 30 dias da infecção experimental com este patógeno (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados do reisolamento da estirpe patogênica, do VDN a partir de suabes de traquéia e cloaca dos marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) vacinados e revacinados contra a DN, realizados aos seis, 14, 20 e 30 dias pós-desafio, nos diferentes grupos experimentais.

GRUPO	VACINAÇÃO (7 dias)	REVACINAÇÃO VIA OCULAR (29 dias)	REISOLAMENTO VIRAL (dpi)							
			6		14		20		30	
			T	C	T	C	T	C	T	C
I	Ulster 2C	Ulster 2C	-	-	-	-	-	-	-	-
II	B1	B1	-	-	-	-	-	-	-	-
III	LaSota	LaSota	-	-	-	-	-	-	-	-
IV*	Controle	- - -	-	-	-	-	+	+	+	+

*Grupo testemunho – 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 de isolamento da estirpe patogênica do VDN

O fato de não ter sido reisolado VDN de marrecos de Pequim vacinados (Grupos I a III) torna evidente a importância da vacinação nesta espécie, pois estando ela vacinada, 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 marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) (Grupos I a III), indubitavelmente, contribuiu efetivamente para o não reisolamento de VDN nesta espécie animal. Em verdade, a instituição de programas imunoproláticos contra a enfermidade de Newcastle e específicos para criação de marrecos de Pequim, 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 marreco de Pequim e a importância da imunoprolaxia na supressão deste estado.

Nesse enfoque, deveriam ser realizados estudos em marrecos de Pequim inoculados experimentalmente com o VDN, para estabelecer a importância do seu estado do portador.

5.2. EXPERIMENTO 2

5.2.1. Desafio, observação clínica, necropsia e reisolamento da estirpe patogênica do VDN

5.2.1.1. Aves SPF e marrecos de Pequim inoculados com o VDN

As aves SPF utilizadas para controle da patogenidade 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 o reisolamento e a identificação do VDN, conforme técnica e critérios estabelecidos, respectivamente, nos itens 4.1.3.1.1. e 4.1.10. (EXPERIMENTO 1).

Por outro lado, 100,0% dos marrecos de Pequim 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 marrecos de Pequim, também foi estudado neste experimento.

Assim, são apresentados, na Tabela 6 os resultados do reisolamento da estirpe patogênica, do VDN, dos marrecos de Pequim, em período pós-desafio ou não.

Analisando a Tabela 6, verifica-se que o reisolamento viral das fezes ocorreu dos 20 aos 30 dias pós-desafio, confirmando, mais uma vez, a susceptibilidade à infecção experimental desta espécie ao VDN.

Da mesma forma, também em marrecos de Pequim, à véspera do desafio e aos 5 e 14 dias pós-desafio, o reisolamento viral das fezes foi nulo (Tabela 6), permitindo considerá-las isentas então de infecção pelo VDN.

O fato de ter sido reisolado VDN de marrecos de Pequim e tendo em vista o número de amostras examinadas, ficou assim caracterizado o estado de portador de VDN desta espécie animal, entre 20 e 30 dias da infecção experimental com este patógeno. Esses resultados, analisados dentro do enfoque epidemiológico da doença de Newcastle induzem à ponderação de que os marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*), possuem estado de portador do VDN, entre 20 e 30 dias. Tal fato pode se constituir em um problema para a avicultura comercial.

Tabela 6. Resultados do reisolamento da estirpe patogênica do VDN, dos marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) não vacinados contra a DN, à véspera do desafio e aos cinco, 14, 20, 25 e 30 dias pós-desafio.

AVES	REISOLAMENTO VIRAL					
	VD	5dpi	14dpi	20dpi	25dpi	30dpi
MARRECOS DE PEQUIM (<i>Anas platyrhynchos</i>)	-	-	-	+	+	+

VD = Véspera do desafio

dpi = dias pós inoculação/desafio

+ = isolamento da estirpe patogênica do VDN

- = ausência de isolamento da estirpe patogênica do VDN

5.2.2. Observação clínica, necropsopia, reisolamento da estirpe patogênica do VDN e sorologia (HI)

5.2.2.1. Aves SPF conviventes com marrecos de Pequim inoculados com o VDN

Os dados apresentados na Tabela 7 mostram que 100,0% das aves SPF conviventes com marrecos de Pequim infectados com uma estirpe patogênica do VDN, decorridos cinco (Grupo 1) e 14 (Grupo 2) dias pós-desafio sucumbiram após o contato direto com marrecos desafiados. Os sinais clínicos e lesões sugestivas da DN (Figura 4) foram semelhantes àqueles outros observados e expostos no item 5.1.3. (EXPERIMENTO 1), confirmados pelo reisolamento e identificação 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 $\log_2$ 4,75) conforme técnica descrita no item 4.1.7.2. (EXPERIMENTO 1).

Tabela 7. Resultados da observação clínica, necropsopia, reisolamento da estirpe patogênica, do VDN, e sorologia (HI) das aves SPF conviventes com marrecos de Pequim não vacinados contra a DN e inoculados com o VDN, decorridos cinco (Grupo 1) e 14 (Grupo 2) dias pós-desafio.

PARÂMETROS AVALIADOS	AVES SPF CONVIVENTES COM MARRECOS DE PEQUIM INOCULADAS COM O VDN	
	5 dpi	14 dpi
Sinais clínicos sugestivos da DN	+	+
Mortalidade (%)	100	100
Lesões sugestivas da DN	+	+
Reisolamento do VDN (T e C)	+	+
Sorologia (HI)	+	+

VD = véspera do desafio

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)

Por tais resultados, é certo que os marrecos de Pequim 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 marrecos de Pequim 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, em aves domésticas, algumas estirpes patogênicas do VDN causam mortalidade logo após à introdução de apenas pequena quantidade de unidades infecciosas do VDN; outras necessitam de um milhão

ou mais de unidades infecciosas de vírus para induzir mortalidade (BEARD & HANSON, 1984).



Figura 4: Proventrículo e traquéia hemorrágicos de aves SPF colocadas em contato com marrecos de Pequim inoculados com VDN.

Pelos achados alcançados, neste trabalho, empregando-se animais de experimentação, quais sejam, aves SPF em contato direto com marrecos de Pequim inoculados com o VDN, ficou patente a transmissão de vírus desta última espécie, decorridos 14 dias da infecção experimental com este patógeno, para aves SPF conviventes, o que vem realçar a importância dos marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*), 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 marrecos de Pequim inoculados com o VDN terem contraído a moléstia, passados 14 dias da infecção experimental com este patógeno, vem enfatizar o real papel exercido pela espécie *Anas platyrhynchos*, 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, semi-domésticas ou silvestres em convívio ou próximas a seu hábitat natural e/ou em confinamento.

Para melhor compreensão do assunto, julgou-se oportuno realçar as pesquisas e/ou ponderações efetuadas por MAJIYAGBE & NAWATHE (1981) e SAMBERG et al. (1989).

Desse modo, MAJIYAGBE & NAWATHE (1981), pesquisando o VDN em aves silvestres e domésticas, isolaram e identificaram uma estirpe patogênica, a partir de suabes cloacais de patos, aparentemente assintomáticos. Com base nesse achado, os autores explicitam a relevância do papel dessas aves como fonte de infecção para outras espécies aviárias, sugerindo melhores estudos a esse respeito, principalmente pelo desconhecimento do real papel exercido por anatídeos na cadeia epidemiológica da doença.

Por outro lado, conforme SAMBERG et al. (1989), o esclarecimento do real papel desempenhado pela avestruz (*Struthio camelus*), no plano epidemiológico, em estado de portador e/ou fonte de infecção de VDN para aves domésticas, torna-se necessário, para um adequado controle da enfermidade.

Estudos epidemiológicos conduzidos por COLLINS et al. (1998), mediante o emprego de anticorpos monoclonais (MAbs) produzidos em camundongos Babb_c contra o VDN, evidenciaram que um surto da moléstia de Newcastle em frangos de corte, na Irlanda, em 1990, foi causado provavelmente por uma mutação do vírus de baixa para alta virulência, o qual aparentemente originou-se de uma estirpe de baixa virulência isolada de aves aquáticas.

SCOTT (1999), em retrospectiva sobre o VDN, relataram que surtos da enfermidade de Newcastle em frangos de corte, na Austrália, em 1998, foram atribuídos às estirpes patogênicas originadas de cepas exóticas de baixa virulência, como aquelas identificadas, também na Austrália, em meados da década de 1970.

Nesse cenário, LIMA (2005) evidenciou a importância da galinha d'angola (*Numida meleagris galeata*), do ponto de vista epidemiológico, como fonte disseminadora do VDN para aves SPF conviventes, decorridos até 20 dias da infecção experimental com este patógeno.

É pertinente notar que o esclarecimento de importantes aspectos epidemiológicos da enfermidade de Newcastle, entre eles, o papel representado pelos marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) 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.

5.3. EXPERIMENTO 3

5.3.1. Microscopia eletrônica de varredura

Todos os grupos experimentais foram observados duas vezes ao dia para registro dos sinais clínicos e, neste experimento, nenhum dos grupos experimentais apresentou sinais clínicos detectáveis de reação respiratória pós-vacinal.

A análise de fragmentos traqueais ao microscópio eletrônico de varredura (Figura 5), colhidos do grupo controle, independentemente das datas das colheitas das amostras, revelou epitélio traqueal íntegro, composto de epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado.

Também, do material obtido a partir de aves vacinadas com a amostra viva Ulster 2C, em todas as colheitas (sete, 14 e 21 dias após a vacinação), a elétron-micrografia (Figura 6) mostrou um epitélio traqueal íntegro composto por células ciliadas, muito similar ao apresentado pelo grupo controle, podendo ser observado tão somente, uma descamação fisiológica.

A não observação de sinais clínicos de reação respiratória pós-vacinal neste grupo de aves experimentais e a não ocorrência de descamação no epitélio traqueal provocada pela passagem da cepa vacinal pelo trato respiratório superior, pode ser explicada pelo fato que a cepa Ulster 2C é a única cepa vacinal do VDN em que o índice de patogenicidade intracerebral é nulo (ICPI=0,0).

Em contraste, nas aves que foram vacinadas com as amostras B1 e LaSota (Figuras 7 e 8), também independentemente das datas de colheitas das amostras, as elétron-micrografias do material colhido mostraram uma descamação epitelial marcante, onde regiões extensas do epitélio ciliado foram removidas.

Lotes de marrecos de Pequim vacinados, via ocular, com as amostras B1 ou LaSota não mostraram sinais clínicos de reação vacinal, como descrito em codornas (*Coturnix coturnix japonica*) por SANTIN et al. (2003). Entretanto, esse dado entra em contradição com os relatos em frangos de corte, conforme DORETTO JÚNIOR et al.

(1999), onde esse tipo de vacina apresenta a desvantagem de induzir reações respiratórias indesejáveis (ALLAN, 1971). Em frangos de corte, a gravidade e a extensão desses sinais clínicos dependem de inúmeros fatores, entre os quais, a amostra de vírus vacinal, a presença de *Mycoplasma gallisepticum* e a via de administração de vacina (BEARD et al., 1993). Apesar da ausência de sinais clínicos de reação respiratória, na análise de fragmentos traqueais de aves vacinadas com as amostras B1 ou LaSota, observou-se uma descamação epitelial da traquéia, decorridos sete e 14 dias após a vacinação (Figuras 7, 8 e 9). Frente a este fato, é conveniente especular que, provavelmente, a ausência de sinais clínicos de reação vacinal pode ser resultante da ausência de infecções intercorrentes com outros agentes, como o *Mycoplasma gallisepticum*, capazes de exacerbar tais reações, já que as condições ambientais eram controladas por ocasião em que foi desenvolvido o presente estudo. Aos 21 dias após a vacinação, os marrecos vacinados com a estirpe LaSota já apresentavam regeneração parcial do epitélio luminal da traquéia (Figura 10).

Em linhas gerais, a microscopia eletrônica de varredura mostrou-se um método alternativo, seguro e eficaz na avaliação da patogenicidade das estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do VDN, em epitélio traqueal de pintos de marrecos de Pequim, decorridos sete, 14 e 21 dias após a vacinação.

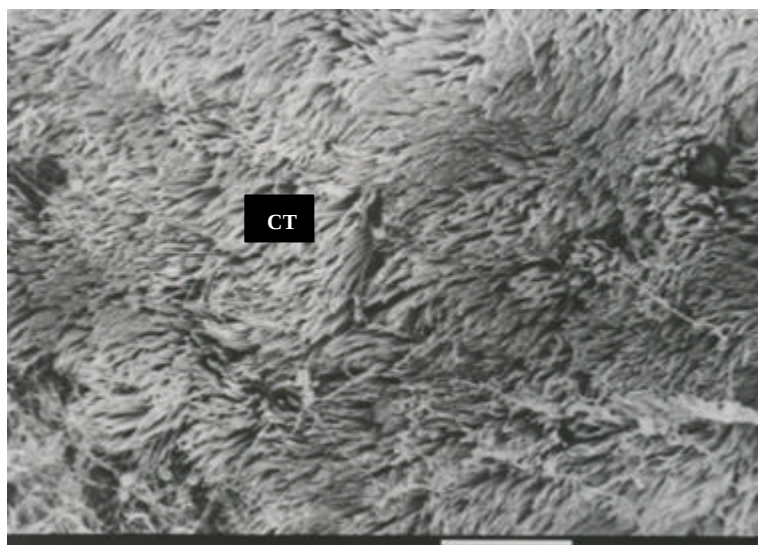


Figura 5: Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de *Anas platyrhynchos*, aos 14 dias de idade. Grupo controle, não vacinado. Epitélio traqueal íntegro, repleto de cílios traqueais (CT). Barra de escala = 10 μ m.

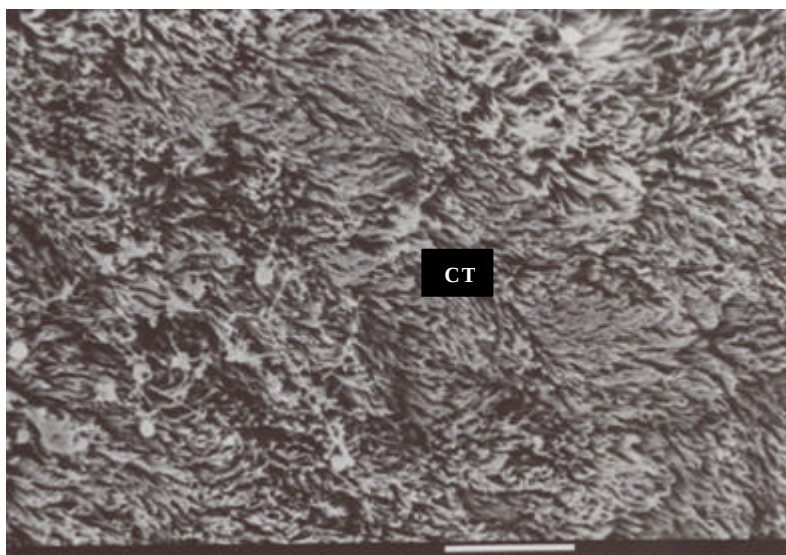


Figura 6: Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de *Anas platyrhynchos*, aos 14 dias de idade. Grupo vacinado com Ulster 2C. Epitélio traqueal íntegro, repleto de cílios traqueais (CT). Barra de escala = 10 μ m.

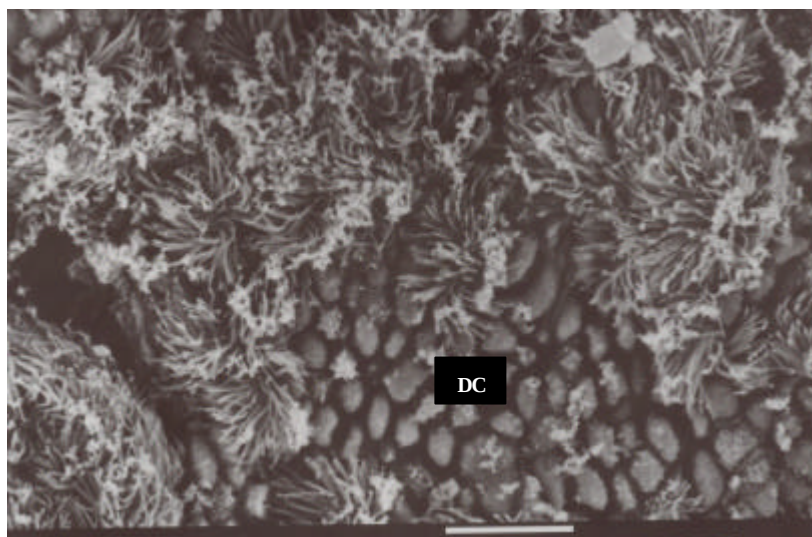


Figura 7: Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de *Anas platyrhynchos*, aos 14 dias de idade. Grupo vacinado com estirpe B1. Epitélio traqueal apresentando regiões desprovidas com descamação (DC). Barra de escala = 10 μ m.

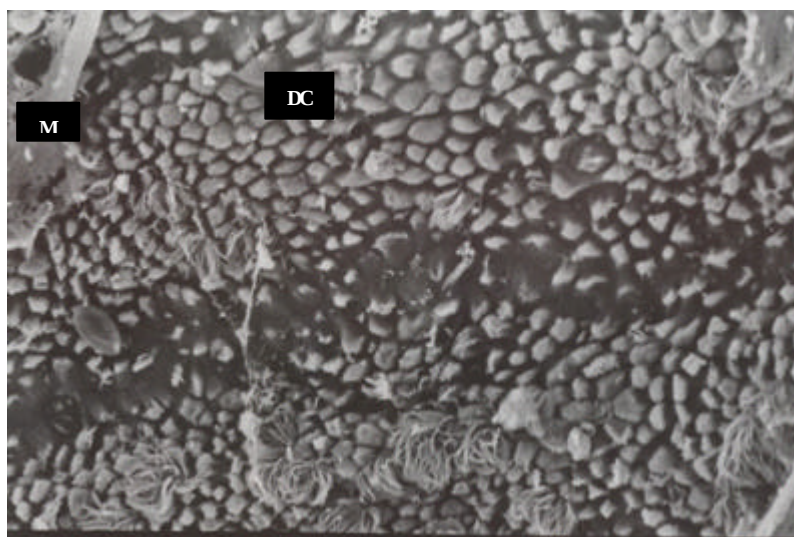


Figura 8: Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de *Anas platyrhynchos*, aos 14 dias de idade. Grupo vacinado com estirpe LaSota. Epitélio traqueal apresentando extensas regiões com descamação (DC) e muco (M). Barra de escala = 10 μ m.

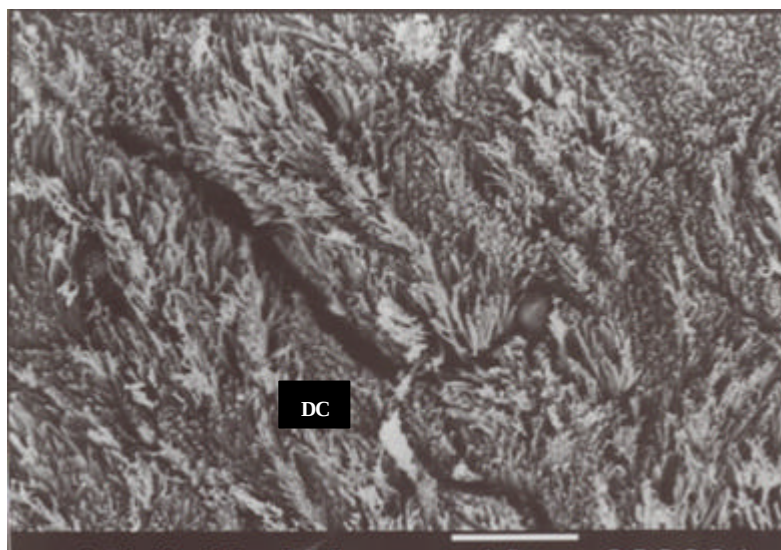


Figura 9: Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de *Anas platyrhynchos*, aos 21 dias de idade. Grupo vacinado com estirpe LaSota. Epitélio traqueal apresentando regiões com descamação (DC). Barra de escala = 10 μ m.

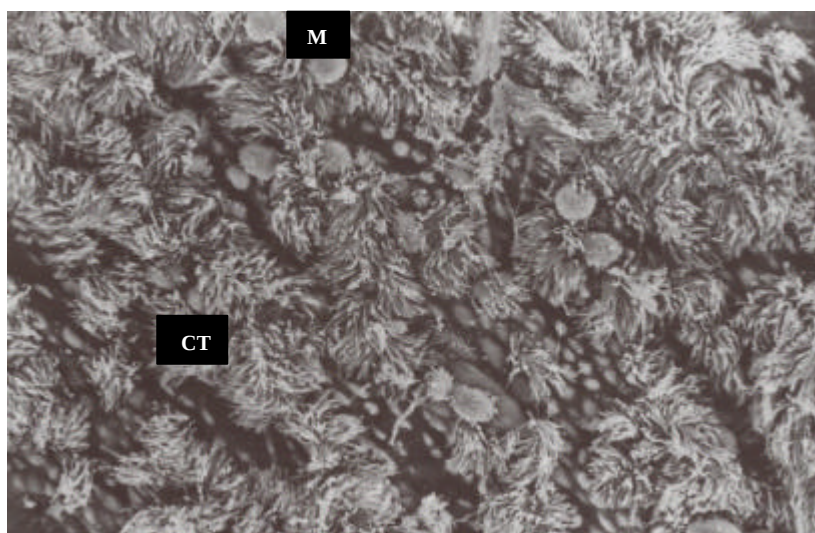


Figura 10: Elétron-micrografia do epitélio luminal da traquéia de *Anas platyrhynchos*, aos 28 dias de idade. Grupo vacinado com estirpe LaSota. Epitélio traqueal apresentando recuperação do epitélio ciliar do lúmen traqueal (CT) e muco (M). Barra de escala = 10 μ m.

6. CONCLUSÕES

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

- a. As vacinações utilizando as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota não se mostraram associadas com sinais clínicos da reação vacinal em marrecos de Pequim;
- b. 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);
- c. Os marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) mostraram-se refratários à enfermidade clínica após o desafio com VDN patogênico;
- d. Os marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) mostraram-se sensíveis à infecção experimental com o VDN patogênico;
- e. Ficou demonstrado o estado de portador de VDN dos marrecos de Pequim, decorridos 30 dias da infecção experimental com este patógeno;
- f. Ficou caracterizada a importância da imunoprolaxia na supressão do estado de portador do VDN do marreco de Pequim;
- g. Ficou evidenciada a importância do marreco de Pequim (*Anas platyrhynchos*) do ponto de vista epidemiológico, como fonte disseminadora do VDN para aves SPF conviventes, decorridos até 14 dias da infecção experimental com este patógeno;
- h. A microscopia eletrônica de varredura mostrou-se um método alternativo, seguro e eficaz na avaliação da patogenicidade das estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do, VDN, em epitélio traqueal de marrecos de Pequim, decorridos sete, 14 e 21 dias após a vacinação.

7. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, D. J. The classification, host range and distribution of avian paramixoviruses. In: McFERRAN, J. B., McNULTY, M. S. (Ed.). **Acute virus infections of poultry**. Dordrecht : Martinus Nijhoff, 1986. p. 52-56.

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**. 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.

ALLAN, W. H. The problem of Newcastle disease. **Nature**, Paris, v. 34, p. 124-131, 1971.

ALLAN, W. H.; GOUGH, R. E. A standart haemagglutination inhibition test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. **Veterinary Record**, London, v. 95, p. 120-123, 1974.

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. Serologic procedures. In: HITCHNER, S. B., DOMERMUTH, C. H.; PURCHASE, H. G.; WILLIAMS, J. E. (Ed.) **Isolation and identification of avian**

pathogens. Kenett Square: American Association of Avian Pathology, 1980. p. 129-135.

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^o 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.

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, 1994. 81p.

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

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

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

COLLINS, M. S.; FRANKLIN, S.; STRONG, I.; MEULEMANS, G., ALEXANDER, D. J. Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 27, n. 1, p. 90-96, 1998.

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. 260 p.

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. 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 JÚNIOR, L.; PAULILLO, A. C.; SANTOS, J. M.; SILVA, G. S.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Utilização da microscopia eletrônica de varredura na avaliação da reação respiratória pós-vacinal em epitélio traqueal de pintos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 1, p. 149-152, 1999.

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.

FASSI-FEHRI, M. Influence de l'age 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 platyrinchos*) na epidemiologia experimental da doença de Newcastle. Revista Brasileira de Ciência Avícola-Suplemento 6, Santos: FACTA , 2004. p. 190.

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.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. ICTV. **Index of viruses: Newcastle disease virus.** Disponível em: <http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll?f=templates&fn=main-h.htm>
Acesso em 08 fev. 2006.

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.

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

KING, D. J. Enfermedad de Newcastle. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 16, 1999, Lima. **Anais...** 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: Departament 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.

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

MAJIYAGBE, K. A.; NAWATHE, D. R. Isolation of virulent Newcastle disease virus from apparently normal ducks in Nigeria. **Vet Rec.** Feb 28;108 (9), p.190, 1981

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 CANADA: Science at Work for Canada – NRC. Disponível em: <www.nrc-cnrc.gc.ca/main_e.html> Acesso em 29 mar. 2006.

OIE. World Organization for Animal Health. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Newcastle Disease**. Disponível em :< http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm> Acesso em 15 nov. 2005.

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> Acesso em 10 jan. 2007.

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.; 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. 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. 1999, Lima. **Memorias** ...p. 291-293.

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. 2001, Ciudad de Guatemala. **Memorias** ...p. 497-503.

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. 2002, La Habana. 1 CD-ROM.

POSTEK, M. T.; HOWARD, K. S.; JOHSON, A. H. **Scanning electron microscopy: a student's handbooks**. [S.l.]: Laad Research Industries, 1980, 305 p.

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.

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

SAMBERG, Y; HADASH, D. U.; PERELMAN, B.; MEROZ, M. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*): field case and experimental infection. **Avian Pathology**, 1989.

SANTIN, E.; LIMA, F. S.; PAULILLO, A. C.; NAKAGHI, L. S. O.; MAIORKA, A. The use of scanning electron microscopy in post-vaccinal evaluation of tacheal epithelium of *Coturnix coturnix japonica*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 1-3, 2003.

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.

SCOTT, P.C. Review of Newcastle disease virus in Australia. In: WESTER POULTRY DISEASE CONFERENCE, 48^o, 1999, Vancouver. **Proceedings...** 1999, p. 94-95.

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.

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

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. 633p.

VAN ECK, J. H. H.; GOREN, E. An Ulster 2C strain derived Newcastle disease vaccine: vaccinal reaction in comparison with other lentogenic Newcastle disease vaccines. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 20, n. 3, p. 497-507, 1991.

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.

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.

ANEXO 2

Tabela – Composição percentual e calculada das rações experimentais que foram utilizadas nas diferentes fases do ciclo de vida dos marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*).

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.