



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



**ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E IMUNITÁRIOS
DA VACINAÇÃO CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE
E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM
AGAPORNIS (*Agapornis roseicollis*)**

Gislaine Regina Vieira Martins
Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2012



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



ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E IMUNITÁRIOS DA VACINAÇÃO CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM AGAPORNIS (*Agapornis roseicollis*)

Gislaine Regina Vieira Martins

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2012



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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E IMUNITÁRIOS DA VACINAÇÃO CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA EM AGAPORNIS (*Agapornis roseicollis*)

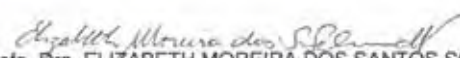
AUTORA: GISLAINE REGINA VIEIRA MARTINS

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PAULILLO

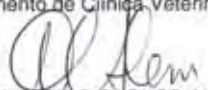
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PAULILLO

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. ELIZABETH MOREIRA DOS SANTOS SCHMIDT

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu


Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 30 de julho de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GISLAINE REGINA VIEIRA MARTINS nasceu em Osasco – SP em 27 de fevereiro de 1985. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Jaboticabal, com colação de grau em janeiro de 2010. Durante a graduação, no ano de 2009, foi bolsista de iniciação científica - FAPESP, tendo participado de projetos de pesquisa relacionados à patologia aviária, enfocando o estudo da doença de Newcastle. Em março de 2010 iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, no Departamento de Patologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP) no câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo.

Se podemos sonhar, então podemos tornar nossos sonhos realidade.
Walt Disney

A Deus

Por ser a razão maior desta caminhada.

Pela força para superar as dificuldades e a alegria pelo simples prazer de viver.

Por me proteger, me guiar e me iluminar.

Aos meus pais, Leonardo e Maria Aparecida Martins

Por me darem a vida e me ensinarem a vivê-la com dignidade;

Por me acompanhar pelos caminhos da vida com afeto e dedicação, para que eu os trilhasse sem medo e cheia de esperanças.

A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram muitas vezes aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus.

Pela espera e compreensão durante o tempo em que estive longe.

Dedico

Ao meu orientador
Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo

Por quem tenho profunda admiração por sua carreira e história de vida. Obrigada pela amizade e pela orientação.

Aos animais
Por quem dedico minha vida e profissão.
Por quem eu tento ser alguém melhor a cada dia

Dedico

*Aos meus grandes amigos,
Os de longe e os que eu vejo todos os dias, os de longa data e aqueles
que conheci recentemente.
Por alegrarem a minha vida e a tornarem mais leve.*

*Ao meu noivo Rodrigo Fernandes Vieira
Por ser, antes de tudo, meu grande amigo e companheiro. Por me
esperar e acreditar nos meus sonhos*

*À minha irmã Tatiane, meu cunhado André e meu sobrinho
Matheus
Pela felicidade de ter vocês na minha vida.*

*Aos meus familiares, pelo apoio, estímulo e por estarem sempre
presentes em cada etapa de minha vida.*

Agradeço

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal, por ter sido, ao longo desses anos, a minha segunda casa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, câmpus de Jaboticabal e ao Departamento de Patologia Veterinária pela oportunidade da realização do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo, pela orientação, amizade e por dividir comigo um pouco da sua grande experiência profissional.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, em especial Narcizo Batista Tel e Edgar Homem, pela convivência, amizade e valiosa ajuda.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudos.

À Prof. Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt, pela amizade e colaboração na realização deste trabalho e artigos publicados.

Ao Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco pela colaboração neste experimento.

Aos amigos Janine Denadai e Alan Jonathan Testi, pela ajuda durante a realização do experimento.

Aos meus amigos do Curso de Pós-Graduação da FCAV-UNESP, câmpus de Jaboticabal, pela ajuda, momentos de descontração e amizade.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com incentivo e apoio para que este trabalho fosse realizado

Muito obrigada!

AUXÍLIO FINANCEIRO

Este projeto teve bolsa concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, sob o processo nº 2010/04543-0.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivos Gerais.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
3.2.1 Experimento 1.....	18
3.2.2 Experimento 2.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Experimento 1.....	20
4.1.1 Instalações.....	20
4.1.2 Aves Experimentais, Manejo e Nutrição.....	21
4.1.3 Vacinas e Vacinação.....	22
4.1.4 Colheita de Sangue.....	24
4.1.5 Reação de Inibição da Hemaglutinação.....	26
4.1.6 Desafio.....	26
4.1.7 Observação Clínica e Necropsia.....	27
4.1.8 Reação em Cadeia pela Polimerase Pós-Transcrição Reversa (RT-PCR).....	28
4.1.8.1 Extração do RNA Viral.....	28
4.1.8.2 Descrição Dos Oligonucleotídeos Iniciadores (“Primers”).....	28
4.1.8.3 Síntese De cDNA – Transcrição Reversa do RNA Viral.....	29
4.1.8.4 Reação em Cadeia pela Polimerase Pós-Transcrição Reversa (PCR).....	29
4.1.8.5 Detecção do Produto Amplificado.....	30
4.1.9 Delineamento Experimental – Análise Estatística.....	30
4.2 Experimento 2.....	31

4.2.1 Instalações.....	31
4.2.2. Aves Experimentais.....	31
4.2.3 Desafio.....	32
4.2.4 Observação Clínica e Necropsia.....	32
4.2.5 Reação em Cadeia pela Polimerase Pós-Transcrição Reversa (RT-PCR).....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Experimento 1.....	34
5.1.1. Exames Clínicos.....	34
5.1.2 Exame Sorológico.....	35
5.1.3 Desafio.....	39
5.1.4. Pesquisa do Material Genético do Vírus De Newcastle (VDN).....	41
5.2 Experimento 2.....	44
5.2.1. Desafio, Observação Clínica, Necropsia e Reação em Cadeia pela Polimerase Pós-Transcrição Reversa (RT-PCR) dos Agapornis Inoculados com o VDN.....	44
5.2.2 Observação Clínica, Necropsia, Reação de Reação em Cadeia pela Polimerase Pós-Transcrição Reversa (RT-PCR) das Aves SPF Conviventes com Agapornis (<i>Agapornis Roseicollis</i>) Inoculados com o VDN.....	46
6.CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	51
8. ANEXO A.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Pág.
Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais de <i>Agapornis roseicollis</i> submetidos a diferentes esquemas de vacinação contra a doença de Newcastle (experimento 1).....	21
Tabela 2. Distribuição dos agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) em diferentes grupos experimentais, vacinados contra a doença de Newcastle, aos cinco meses de idade e revacinados aos seis e meio, sete e meio e oito meses e meio de idade, por via ocular, com diferentes estirpes vacinais (n=48).....	23
Tabela 3. Médias aritméticas dos títulos (log ₂) de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) dos soros de agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) submetidos a diferentes esquemas de vacinação contra a doença de Newcastle, em período compreendido entre cinco e nove meses e meio de idade, nos diferentes grupos (n=48), Jaboticabal, 2012.....	37
Tabela 4. Resultados do desafio com vírus patogênico da doença de Newcastle, em agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) aos 12 meses de idade, nos diferentes grupos (n=24).....	39
Tabela 5. Pesquisa do material genético viral para o vírus da doença de Newcastle, por reação de cadeia de polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), a partir de suabes de cloaca em agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) vacinados e revacinados contra a doença de Newcastle, obtidos aos nove, 14 e 21 dias após-desafio (dpi), nos diferentes grupos experimentais (n=24).....	42
Tabela 6. Resultados da excreção do VDN em agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>), aos nove, 14 e 21 dias após o desafio (dpi), por reação de cadeia de polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), a partir de suabes cloacais, em agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) não vacinados contra a DN, aos 9,14 e 21 dias pós-desafio (dpi).....	45
Tabela 7. Resultados da observação clínica, lesões macroscópicas e excreção do VDN (RT-PCR) de aves SPF conviventes com agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) inoculados com o vírus de Newcastle, aos nove, 14 e 21 dias após o desafio (dpi).....	48

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
FIGURA 1. Exemplares de Agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) de face rosada.....	3
FIGURA 2. Exemplar de agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) de face branca.....	3
FIGURA 3. Agapornis em gaiolas experimentais.....	20
FIGURA 4. Colheita de sangue de agapornis a partir da técnica de corte de unha, para a realização de testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos específicos para o VDN.....	25
FIGURA 5. Impregnação de sangue de agapornis em papel-filtro, imediatamente após a colheita, para a realização de testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos específicos para o VDN.....	25
FIGURA 6. Isolador de pressão negativa mostrando agapornis mantidos em gaiolas de fundo vazado, suspensa sobre as aves SPF.....	31
FIGURA 7. Respresentação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) submetidos a diferentes esquemas de vacinação contra a doença de Newcastle.....	38
FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose com os produtos da RT-PCR provenientes do suabe cloacal de agapornis submetidos a diferentes programas de vacinação e posteriormente desafiados com uma estirpe velogênica do VDN. Da esquerda para a direita: Marcador de Pares de base (100 pb); amostras aos nove (1), 14(2) e 21(3) dias pós-infecção (dpi); Controle Negativo (N) e Controle Positivo (P).....	43
FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose com os produtos da RT-PCR provenientes do suabe cloacal de agapornis desafiados com uma estirpe velogênica do VDN. Da esquerda para a direita: Marcador de Pares de base (100 pb); amostras aos nove (1), 14(2) e 21(3) dias pós-infecção (dpi); Controle Negativo (N) e Controle Positivo (P).....	45
FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose com os produtos da RT-PCR provenientes do suabe cloacal de aves SPF conviventes com agapornis desafiados com uma estirpe velogênica do VDN. Da esquerda para a direita: Marcador de Pares de base (100 pb); amostras aos nove (1), 14(2) e 21(3) dias pós-infecção (dpi); Controle Negativo (N) e Controle Positivo (P).....	48

**ESTUDO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E IMUNITÁRIOS DA VACINAÇÃO
CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE E SUA IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA
EM AGAPORNIS (*Agapornis roseicollis*)**

RESUMO - As avaliações dos parâmetros clínicos, imunitários e epidemiológicos da vacinação contra a doença de Newcastle (DN) em agapornis (*Agapornis roseicollis*) foram investigadas em dois experimentos. Amostras vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do vírus da doença de Newcastle (VDN) foram utilizadas para imunização das aves. No experimento 1, utilizaram-se 48 agapornis, distribuídos em quatro tratamentos de 12 animais cada, num total de três repetições, submetidos a diferentes esquemas imunoprolifáticos. A resposta imune foi avaliada pelo teste de HI. Não foram observados sinais clínicos de reação pós-vacinal em qualquer grupo experimental. Os resultados dos títulos de anticorpos (HI) mostraram que a estirpe vacinal LaSota conferiu maior grau de imunidade aos agapornis, quando comparada às estirpes Ulster 2C e B1. Estas aves foram posteriormente desafiadas frente a uma estirpe patogênica do VDN ($EID_{50}=10^{8,15}/0,1\text{mL}$), aos 12 meses de idade. Em todos os grupos, procedeu-se a pesquisa do RNA viral a partir de suabes cloacais, através da técnica de RT-PCR. Os agapornis de todos os grupos não demonstraram qualquer sinal clínico sugestivo da DN, mostrando-se refratários à doença clínica frente a este vírus. Entretanto, ficou caracterizado o estado de portador de VDN nesta espécie decorridos até 21 dias da infecção experimental com este patógeno. No experimento 2, foram utilizadas aves SPF ("Specific-Pathogen-Free") conviventes com agapornis inoculados com uma estirpe patogênica do VDN. Observou-se a transmissão do VDN dos agapornis para as aves SPF conviventes decorridos até 21 da infecção experimental com este patógeno, o que realça a importância do agapornis como fonte potencial de infecção do VDN para aves domésticas.

Palavras-chave: *Agapornis roseicollis*, amostras Ulster 2C, B1 e LaSota, doença de Newcastle, estado de portador do vírus, reação de Inibição da Hemaglutinação (HI), fonte de infecção do VDN.

**STUDY OF CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF NEWCASTLE
DISEASE VACCINATION AND ITS RELEVANCE IN THE EPIDEMIOLOGY IN
LOVEBIRDS (*Agapornis roseicollis*)**

SUMMARY: The evaluations of clinical, immunological and epidemiological parameters of vaccination against Newcastle disease (ND) in lovebirds (*Agapornis roseicollis*) were investigated in 2 experiments. Ulster 2C, B1 and LaSota vaccines strains of the Newcastle disease virus (NDV) were used to immunization of birds. In experiment 1, 48 lovebirds were distributed into 4 different treatments, with 12 birds in each, with a total of 3 repetitions, submitted to different vaccination programs. The immunological responses were measured by HI test. Lovebirds from all groups did not show any clinical signs of post vaccinal reaction. The antibody titers (HI) results showed that the immune vaccine programs adopted were different in stimulating protective levels of humoral immune response. These birds were also challenge with a pathogenic NDV strain ($EID_{50}=10^{8.15}/0.1\text{mL}$) at 12 months of age. After the challenge in all groups, cloacal swabs were collected for RT-PCT to find the pathogenic viruses. Lovebirds from all groups did not demonstrate clinical signs of ND, being refractory to the clinical disease with the NDV. However, a NDV carrier state was demonstrated in this specie until 21 days after experimental infection. In experiment 2, SPF chicks were housed with lovebirds previously inoculated with a pathogenic NDV strain. The pathogenic virus (NDV) was transmitted from lovebirds to SPF chicks until 21 days after challenge, showing the importance of the lovebirds as source of dissemination of NDV to domestic birds.

Keywords: *Agapornis roseicollis*, Ulster 2C, B1 and LaSota strains, Newcastle disease, NDV carrier, HI test, source of infection of NDV.

1. INTRODUÇÃO

Os agapornis (*Agapornis roseicollis*, Selby, 1836) são aves frequentemente criadas em cativeiro no Brasil. Pertencem à ordem Psittaciformes, família Psittacidae, subfamília Psittacinae e à Tribo Psittaculini (LIMA, 2007; SILVA et al., 2009).

Os membros do gênero *Agapornis* são pequenos periquitos nativos de florestas e savanas africanas, também chamados de pássaro-do-amor ou periquito-namorado. Distribuem-se no continente africano, principalmente, como *Agapornis cana*, em Madagascar, *Agapornis roseicollis* (Figuras 1 e 2), na Angola e Namíbia, e *Agapornis personata* na Tanzânia. São aves coloridas e pequenas, atingindo por volta de 15 cm de comprimento, e vivem em regiões secas, relativamente arborizadas (FORSHAW, 2010).

A primeira tentativa abrangente de compreender a evolução do gênero *Agapornis* foi feita por Moreau (1948), que descreveu a distribuição, ecologia, morfologia e comportamento destas aves. Vivem em pequenos bandos e alimentam-se essencialmente de frutas, vegetais, ervas e sementes. Os membros do gênero *Agapornis* constroem seus ninhos em forma de cúpulas no interior de cavidades. Estes ninhos são revestidos com sementes, cascas, pequenos pedaços de grama ou folhas. Apenas as espécies *Agapornis taranta*, *Agapornis pullarius*, *Agapornis canus* e *Agapornis swinderniana* possuem dimorfismo sexual. Na natureza, voam geralmente aos pares, característica pela qual ficaram conhecidos como “pássaros-do-amor” (EBERHARD, 1998).

Pouco se sabe a respeito da susceptibilidade da espécie *Agapornis roseicollis* diante da infecção com o vírus da doença de Newcastle (VDN), uma enfermidade de etiologia viral e de rápido poder de disseminação, que acomete grande parte das aves domésticas e selvagens. Da mesma forma, a resposta imunológica desta espécie frente a um protocolo de vacinação adequado, bem como seu papel como portador ou fonte de infecção do VDN, ainda é um campo pouco explorado, sendo escassas as informações na literatura nacional e internacional.

Adicionalmente, AWAN et al. (1994) apontaram aves selvagens como importantes fontes de disseminação do VDN. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo propor um controle imunoprofilático eficiente da doença de Newcastle (DN) em agapornis (*Agapornis roseicollis*), bem como compreender o real papel exercido por esta espécie no plano epidemiológico, como possível portadora e/ou fonte de infecção de VDN.



Figura 1: Exemplos de agapornis (*Agapornis roseicollis*) de face rosada.



Figura 2: Exemplo de agapornis (*Agapornis roseicollis*) de face branca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A doença de Newcastle (DN), também conhecida como pseudopeste aviária ou desordem respiratória, é uma infecção viral de aves, causada por um paramyxovirus aviário tipo 1 (APMV-1), do gênero *Avulavirus*, subfamília *Paramyxovirinae*, ordem *Mononegavirales* (ICTV, 2011). Trata-se de uma enfermidade altamente contagiosa e severa de aves susceptíveis, com alta taxa de mortalidade (ALEXANDER, 2003; ALEXANDER e SENNE, 2008).

A DN tem sido um dos problemas sanitários mais importantes da avicultura industrial, em face dos elevados prejuízos que ocasiona. 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 (PAULILLO, 1980, 1984, 1989; DORETTO JUNIOR, 1997; PAULILLO et al., 2002; PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2009). Por este motivo, faz parte da Lista das enfermidades do WAHS – Sistema Mundial de Informação Zoonosológica, da OIE (Organização Internacional de Saúde Animal), sendo seus focos de notificação compulsória (OIE, 2011).

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

Outro surto da DN em frangos de corte, em Nova Gales do Sul, Austrália, em abril de 1999, acarretou no cancelamento das exportações de todos os produtos avícolas deste país para a China (KING, 1999).

São reconhecidos nove sorotipos de Paramyxovirus aviários (PMV-1 a PMV-9). Esses sorotipos podem ser subdivididos entre aqueles que causam, predominantemente, lesões hemorrágicas do aparelho digestivo - Vírus da Doença de Newcastle Velogênico Viscerotrópico (VVND) e aqueles que causam lesões

respiratórias e do sistema nervoso central – Vírus da Doença de Newcastle Velogênico Neurotrópico (VNND) (PHALEN, 2006). É oportuno enfatizar que a virulência da DN é hospedeiro-específica e varia consideravelmente com infecções experimentais realizadas em diversas espécies (GERLACH, 1994).

Na atualidade, a DN (VVND) é definida pelos seguintes critérios de virulência: 1) O vírus possui um índice de patogenicidade intracerebral (IPIC) maior ou igual a 0,7 ($\geq 0,7$) em pintos (*Gallus gallus domesticus*) SPF (“Specific-Pathogen-Free”) de um dia de idade; 2) Múltiplos aminoácidos básicos têm sido demonstrados, diretamente ou por dedução, na fração C-terminal da proteína F₂ (arginina e lisina nos resíduos 113 e 116) e na fração N-terminal da proteína F₁ (fenilalanina no resíduo 117) do vírus (OIE, 2011).

O VDN apresenta morfologia esférica a ligeiramente pleomórfica, com cerca de 150 a 200 nm de diâmetro. O nucleocapsídeo, de 12 a 17 nm de diâmetro, possui um envoltório de dupla camada lipídica, das quais emergem projeções com atividades específicas, pertencentes a dois grupos: A glicoproteína HN, que compreende as enzimas hemaglutinina e neuraminidase, e a glicoproteína F, que permite adesão da partícula viral à membrana celular do hospedeiro. A hemaglutinina é a responsável pela capacidade de aglutinar eritrócitos, enquanto a neuraminidase, age promovendo a gradual eluição das partículas virais aglutinadas, atividades essas importantes na patogenia da doença. Quando os anticorpos são direcionados contra a glicoproteína HN, ocorre a inibição da hemaglutinação do vírus à superfície da hemácia. O título de tais anticorpos pode ser utilizado na mensuração da imunidade humoral, por meio de testes de inibição da hemaglutinação (HI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizados no diagnóstico sorológico da DN (ACKERMAN, 1964; KOUWENHOVEN, 1993; LAMB e KOLAKOFSKY, 1996; MILLAR et al., 1998; ALEXANDER e SENNE, 2008).

Com relação a esse aspecto, o genoma viral codifica, além das duas glicoproteínas estruturais de superfície (HN e F), outras quatro proteínas: proteína de matriz viral (M), proteína polimerase grande (L), proteína do nucleocapsídeo (NP) e uma fosfoproteína associada ao nucleocapsídeo (P) (KOUWENHOVEN, 1993; LEEUW e PEETERS, 1999). A atividade de adesão e penetração na célula hospedeira, exercida

pela proteína F ocorre devido à clivagem do precursor F_0 , por meio de uma enzima presente nas células do hospedeiro, em dois peptídeos, F_1 e F_2 (MERZ et al., 1981, WESTBURY, 2001). Enquanto as proteínas F_0 das amostras virulentas do VDN são clivadas em uma grande variedade de células do hospedeiro, aquelas das amostras não virulentas são clivadas somente em limitados tipos celulares. Esta capacidade de replicação das amostras virulentas em diversos grupos celulares torna o VDN capaz de disseminar-se extensivamente por meio de uma grande gama de hospedeiros (TOYODA et al., 1987; JESTIN e JESTIN, 1991; SEAL et al., 1995, 1996; KANT et al., 1997; OBERDÖRFER e WERNER, 1998; ALDOUS e ALEXANDER, 2001; CAVANAGH, 2001). Sendo assim, a virulência dos APMV-1 está diretamente associada ao sítio de clivagem da proteína F_0 , ponto este responsável pela patogenicidade da estirpe viral (CREELAN et al., 2002).

É importante ressaltar que, além das aves, o VDN pode infectar diversas espécies de répteis e mamíferos, inclusive o homem, o qual pode desenvolver conjuntivite (GERLACH, 1994; DORETTO JUNIOR e PAULILLO, 2007). A maioria dos casos relatados em humanos foi descrita entre trabalhadores de matadouro de aves, laboratório e entre vacinadores durante a aplicação das vacinas contra a DN (DOCHERTY e FRIEND, 1999).

Outro aspecto pertinente diz respeito ao fato de o VDN possuir 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 e ALEXANDER, 1975; ALEXANDER 1991; 1997; 2003; ALEXANDER e SENNE, 2008). Durante o curso da infecção por uma estirpe Velogênica Viscerotrópica do VDN, a maioria das aves excreta grande quantidade de vírus nas fezes, o que se constitui no principal meio de disseminação do VDN de ave para ave (NISHIZAWA et al., 2007).

A DN apresenta uma distribuição mundial, com ampla variação de hospedeiros, dentre os quais 27 ordens de aves existentes, inclusive aves selvagens, sejam elas de vida livre ou criadas em cativeiro, têm sido reportadas, natural ou experimentalmente,

como infectadas por seu agente etiológico (KALETA e BALDAUF, 1988; SPRADBROW, 1988).

Todas as espécies de aves parecem ser susceptíveis à infecção pelo vírus da DN (ROY et al., 1998; ALDOUS e ALEXANDER, 2008). Portanto, aves selvagens, exóticas e nativas, podem atuar como reservatórios do vírus, tornando comum o surgimento de variantes patogênicas e sua disseminação entre as aves domésticas e comerciais (ALEXANDER, 1991; 1997; 2003; ALEXANDER e SENNE, 2008).

De acordo com KALETA e BALDAULF (1988), os Phasianiformes (inclusive galináceos), Struthioniformes e Columbiformes são altamente susceptíveis à infecção pelo VDN. Isto pode ser comprovado pelo fato de que essas espécies têm sido afetadas em surtos relativamente recentes da DN (ALEXANDER e SENNE, 2008). Também foi reportada uma grande susceptibilidade ao VDN em Psittaciformes (REIS e NÓBREGA, 1956; ERICKSON et al., 1977).

Até 1990, a DN raramente havia sido relacionada como causa de mortalidade de pássaros de vida livre, nativos dos Estados Unidos da América ou do Canadá. No entanto, mortes ocorridas em grande escala em uma espécie conhecida como corvo-marinho-de-orelhas (*Phalacrocorax auritus*), nos dois países, conduziram a uma maior conscientização da DN como uma doença das aves selvagens (DOCHERTY E FRIEND, 1999). Por sua vez, ROY et al. (1998) isolaram estirpes velogênicas do VDN das fezes de sete espécies de aves selvagens capturadas no zoológico de Chennai, na Índia, reforçando assim a importância de aves selvagens na epidemiologia da DN.

Outro aspecto pertinente diz respeito à sintomatologia da DN, que se apresenta de forma bastante variável. A severidade da doença pode variar de infecções inaparentes até a morte, dependendo não só da patogenicidade do vírus (estirpe viral envolvida), mas também da idade e susceptibilidade do hospedeiro, além das condições ambientais (BRUGH e BEARD, 1984; BALLAGI-PORDÁNY et al., 1996; HECKERT et al., 1996; ALEXANDER, 1997; SEAL et al., 2000; ALDOUS e ALEXANDER, 2001; ALEXANDER e SENNE, 2008). Estirpes virais que, geralmente, provocariam a morte de 100% das aves comerciais, quando em contato com outras espécies aviárias, podem causar doenças brandas ou até inaparentes, como foram

observadas em pombos e papagaios. No que diz respeito à idade, quanto mais velha a ave, maior é a resistência à doença (BERAD e BRUGH, 1975).

Sendo assim, não existem sinais clínicos patognomônicos para qualquer uma das formas clínicas da DN. As estirpes patogênicas podem causar anorexia, apatia, redução do ganho de peso e da postura de ovos, dispnéia, descarga nasal e ocular, conjuntivite, diarreia esverdeada, ataxia, tremores, convulsões e morte súbita (ALEXANDER e SENNE, 2008).

A maioria das amostras de VDN isoladas de aves aquáticas e/ou migratórias possui baixa virulência para galinhas, sendo classificadas como estirpes entéricas assintomáticas. Contudo, há indícios de que tais amostras possam sofrer processos de mutação e se tornarem patogênicas para aves domésticas (ALEXANDER 1995).

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

A primeira indicação da ocorrência da doença de Newcastle em um grupo de aves pode ser o início súbito da mortalidade. Os sinais *antemortem* geralmente são inespecíficos e podem envolver o trato gastrintestinal, sistema respiratório, sistema nervoso central ou uma combinação destes sistemas (PHALEN, 2006). Como exposto anteriormente, os sinais clínicos da DN não podem ser considerados como patognomônicos da doença, o que torna complexo o diagnóstico clínico, tendo em vista a grande diversidade de estirpes de VDN e de espécies hospedeiras. Assim, em razão da necessidade de um diagnóstico confiável e de fácil realização, torna-se evidente a importância do diagnóstico laboratorial conclusivo. Um diagnóstico confiável, seguro e de fácil execução permite medidas mais eficazes de controle da doença, evitando-se, assim, maiores perdas e a propagação do vírus (KHO et al., 2000).

Diante disso, antes do advento da biologia molecular, os métodos mais seguros para o diagnóstico da DN eram o isolamento viral, em ovos embrionados ou em cultivo de células, seguidos de posterior caracterização do vírus, geralmente por meio das reações de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (HI), índice de

patogenicidade intracerebral (IPIC), tempo médio de morte embrionária (TMME), índice de patogenicidade intravenosa (IPIV) (ALEXANDER, 1997; ALEXANDER e SENNE, 2008).

O sorodiagnóstico, geralmente realizado por meio das reações de inibição da hemaglutinação (HI), vírus neutralização (VN) e ensaio imunoenzimático (ELISA), são os procedimentos de diagnóstico mais amplamente utilizados para a detecção e mensuração de anticorpos anti-VDN. Dentre tais testes, o de HI tem por princípio a detecção de anticorpos anti-HN virais. Essa reação é considerada, internacionalmente, de referência para o diagnóstico indireto da DN (KOUWENHOVEN, 1993; RICHTZENHAIN et al., 1993; ALEXANDER, 1997; KHO et al., 2000; ALEXANDER e SENNE, 2008).

Tais testes, quando utilizados com o objetivo de detectar anticorpos anti-VDN decorrentes de infecção, somente têm valor diagnóstico quando aplicados em aves não submetidas a programas de vacinação ou com soros pareados. Nos testes de HI, soros de galinha raramente apresentam falso-positivo, devido à ausência de inibidores inespecíficos da hemaglutinação, não havendo, portanto, necessidade de tratamento prévio dos soros a serem examinados. Porém, em soros de outras espécies aviárias, é comum a ocorrência de hemaglutinação natural das hemácias de galinhas, mas que geralmente é contornado por meio da inativação do soro a 56° por 30 minutos e /ou através da adsorção prévia do soro com hemácias de galinha (CARRASCO et al., 2008).

Anticorpos contra proteínas estruturais do VDN podem ser encontrados em aves que se recuperam de uma infecção de DN, bem como em aves que foram submetidas a um processo de vacinação (PANSIN et al., 2002).

A confirmação do diagnóstico da DN foi feita, por muito tempo, pela inoculação de material clínico, tais como, secreção oral e/ou traqueal, excreções cloacais ou fragmentos de órgãos de animais necropsiados, em ovos embrionados de aves SPF, com nove a 11 dias de incubação (BEARD e HANSON, 1984; KOUWENHOVEN, 1993; ALEXANDER, 1997; ALEXANDER e SENNE, 2008), com posterior caracterização da amostra, com testes *in vivo*, quais sejam, IPIC, TMME e IPIV. Tais testes têm o

inconveniente de serem trabalhosos, caros e morosos (KANT et al., 1997; NANTHAKUMAR et al., 2000; ALDOUS et al., 2001; ALDOUS e ALEXANDER, 2001).

No entanto, a partir de 1991, a Reação em Cadeia pela Polimerase pós-Transcrição Reversa do RNA (RT-PCR) passou a ser reproduzida, aperfeiçoada e amplamente utilizada na rotina laboratorial do diagnóstico do VDN (JESTIN e JESTIN, 1991; CAVANAGH, 2001). Com isso, a PCR vem sendo utilizada como ferramenta de diagnóstico para viroses de interesse veterinário (KHO et al., 2000).

No Manual de Padronização de Testes Diagnósticos e Vacinas, publicado em 2009 pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), a PCR passou a ser aceita e considerada o método padrão de diagnóstico para DN.

A história da DN é marcada por três grandes panzootias. A primeira teve início na Inglaterra, com 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, enquanto na Ásia e Oriente Médio, a doença difundiu-se de 1926 a 1942. Houve, ainda, a difusão da forma asiática (velogênica viscerotrópica) da DN, ou forma de DOYLE (velogênica viscerotrópica), para o restante da Europa, África e América, entre 1940 e 1950.

A segunda panzootia da DN parece ter surgido no final de 1960, no Oriente Médio, onde a difusão da doença foi consideravelmente maior do que na primeira, atingindo muitos países de todos os continentes até 1973. Essa rápida difusão estaria associada ao intenso comércio por via aérea de espécies de psitacídeos oriundos das Américas do Sul e Central, além do Sudoeste da Ásia (ALEXANDER, 1988).

A terceira panzootia emergiu inicialmente no 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, chamada de “pigeon type” (PPMV-1). A principal forma de difusão deu-se através do contato entre pombos durante exposições, competições e comercialização destas aves. A doença foi confirmada em mais de vinte países, incluindo aqueles da Europa, Canadá, EUA, Hong Kong e Sudão. Em alguns países, a DN acometeu outras aves selvagens, além daquelas da 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).

Dados recentes mostram que, mesmo com as medidas de biossegurança e políticas econômicas, focos da DN continuam ocorrendo em todo o mundo, a saber: em Espanha (março de 2010), Alemanha (junho de 2010), Japão (julho de 2010), Bélgica (agosto de 2010), Mongólia (setembro de 2010), França (dezembro de 2010), Peru (janeiro de 2011), Suécia (março de 2011), México (maio de 2011), Israel (julho de 2011), Switzerland (fevereiro de 2012) e Itália (março de 2012). Em Belize, onde a doença é considerada endêmica, já foram registrados 13 casos somente em 2012 (OIE, 2012).

O histórico do problema no Brasil começou em 1953, com o aparecimento do primeiro surto da DN em Belém e Macapá, território do Amapá. A introdução do VDN ocorreu, aparentemente, por meio da importação de carcaças de aves congeladas, procedentes dos Estados Unidos da América, para um dos hotéis da capital paraense (SANTOS 1954; VAITSMAN e MOUSSATCHÉ, 1954). Nessa ocasião, CUNHA e SILVA realizaram o isolamento da amostra M33 do VDN nestas carcaças (CUNHA e SILVA, 1955). A partir desta data, a doença foi observada em todo o território nacional, ocasionando graves perdas econômicas para os avicultores brasileiros (HASTENREITER, 1976; ITO et al., 1986). Posteriormente, foram assinalados inúmeros surtos e/ou casos da enfermidade em aves reprodutoras, comerciais, criadas em galinheiros domésticos e/ou em aves caipiras (CUNHA e SILVA, 1955).

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

No ano de 1997, os episódios do isolamento do VDN em avestruzes importados, nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia, não foram considerados focos da doença. Da mesma forma, em 1999, no Estado do Paraná, foi isolado VDN de aves exóticas, 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 e contactantes foram sacrificadas para evitar a disseminação do VDN (DORETTO JÚNIOR, 2003).

Salienta-se que o foco da DN diagnosticado no Rio de Janeiro em 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, pois o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) comprovou que o Estado do Rio de Janeiro não possuía avicultura comercial expressiva, não realizava exportações e possuía barreiras zoosanitárias com os estados vizinhos. Além disso, o foco estaria a, aproximadamente, 650 km de distância da avicultura comercial que praticava comércio internacional (DORETTO JÚNIOR, 2003).

No ano de 2001, foi notificado um foco da DN na região norte de Goiás, estando este 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).

OLIVEIRA JÚNIOR et al. (2003) realizaram uma pesquisa experimental para a detecção de anticorpos para VDN, pelo teste de inibição da hemaglutinação, em 837 amostras de plasma de aves não vacinadas do Zoológico Municipal do Rio de Janeiro e de propriedades particulares nos municípios de Seropédica, Japeri, Paulo de Frontin, Paracambi, Valença, Barra do Piraí, Rio de Janeiro e Nova Friburgo. Estes autores observaram que 12 amostras foram soropositivas (1,43%) para o VDN, indicando prévio contato das aves com o patógeno. Sugeriu-se que essa população de aves atuasse como reservatório, embora a porcentagem de aves soropositivas encontrada fosse baixa.

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. A propriedade não atendia a frigoríficos ou fazia parte da cadeia produtiva do setor industrial. Segundo o Departamento de Saúde Animal (DSA), o diagnóstico virológico foi confirmado no dia 4 de julho de 2006, pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), da cidade de Campinas (SP). Foi então 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 doença de Newcastle foram adotadas, incluindo ações de restrição ao trânsito de animais e produtos de risco (OIE, 2006).

SILVA et al. (2006) analisaram o soro sanguíneo de 103 pardais (*Passer domesticus*, Linnaeus 1758) capturados em granjas de corte (24/103) e postura (79/103) localizadas no estado de Pernambuco, pelo teste de inibição da hemaglutinação, e detectaram títulos de anticorpos que variaram de 1:2 a 1:64 em 10,68% das aves, sendo que o teste sorológico positivo e o isolamento viral foram obtidos de pardais provenientes de granjas de postura.

Desse modo, apesar de ter sido considerada endêmica por 25 anos em várias regiões, o governo brasileiro, em 2003, declarou o país livre de DN, com reconhecimento da OIE, a partir de um levantamento oficial realizado em 2002, uma vez que não havia registros da doença em aves da cadeia produtiva do setor industrial (BRASIL, 1994).

O controle da DN é frequentemente realizado em aves reprodutoras, frangos de corte e poedeiras comerciais, mediante vacinação e princípios de manejo que evitem a disseminação do vírus e eliminem a infecção de uma região após um surto. Porém, tais medidas nem sempre são suficientes, pois a história tem demonstrado que, de tempos em tempos, amostras de VDN emergem de fontes desconhecidas, existindo evidências de surtos da doença em aves domésticas e isolamento do vírus patogênico de aves exóticas em algumas partes do mundo, devido ao relaxamento da política de controle sanitário (PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2009).

Embora a vacinação seja a principal medida profilática para o controle da DN, o sucesso de um programa de vacinação depende de diversos fatores, tais como a eficácia da vacina, estirpe vacinal escolhida, efeitos inibitórios da imunidade materna residual, condição geral da ave, situação da doença na região a ser vacinada, espécie de ave, presença de outros agentes patogênicos, tamanho do lote de aves, capacidade da vacina preparada com vírus vivo em produzir efeitos indesejáveis (estresse, reações

pós-vacinais, queda da produção de ovos), histórico e custo da vacinação (REHMANI, 1996; ALEXANDER, 1997; GALLILI e BEM-NATHAN, 1998).

Relatos sobre o emprego de vacinas preparadas com as estirpes B1, Ulster 2C e LaSota do VDN para frangos de corte, matrizes e poedeiras comerciais são abundantes na literatura (BORLAND e ALLAN, 1980; PAULILLO, 1980; 1984; FASSI-FEHRI, 1985; RAJESWAR e MASILLAMONY, 1993; SILVA, 1995; PAULILLO et al., 1996; DORETTO JÚNIOR, 1997). Programas de vacinação contra a DN também foram propostos para outras espécies de aves, como perdizes (PAULILLO et al., 1999), codornas (LIMA et al., 2004a), marrecos-de-pequim (NISHIZAWA et al., 2007), patos (FRANZO et al., 2004), avestruzes (SAKAI et al., 2006), faisões (SCHMIDT et al., 2008), gansos (CAMPIONI et al., 2008), perus (SCHMIDT et al., 2010) e periquitos-australianos (DENADAI et al. 2010).

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

Diante disso, considerando a escassez de dados relacionados à transmissão e ao comportamento do VDN frente às demais espécies aviárias, a infecção experimental (IE), torna-se uma importante ferramenta na avaliação à resposta da ave frente a um vírus patogênico. Uma IE realizada sob condições controladas, fazendo uso de estirpes virulentas, pode trazer informações de extremo valor sobre a resposta imune das aves (BEARD e BRUGH, 1975). Por meio da IE é possível esclarecer, por exemplo, questões sobre a susceptibilidade de uma espécie aviária frente a uma determinada estirpe viral, o tempo de duração de uma possível infecção, a eliminação viral, bem como a resposta imune da espécie em estudo (VICKERS e HANSON, 1980; KAPCZYNSKI et al., 2006).

Dentro deste contexto, estudos desenvolvidos com pássaros-preto (*Agelaius phoeniceus*) experimentalmente infectados com estirpes patogênicas do VDN apresentaram notável soro conversão, quantificados pelo teste de HI. Foi observado que as aves eliminaram o vírus pela traqueia, sem, contudo, ter havido mortalidade

destas, mas apenas sinais respiratórios brandos (VICKERS e HANSON, 1980). Da mesma forma, IE realizadas em aves selvagens, no que diz respeito à eliminação viral, revelaram que papagaios originários da América do Norte e América Central (*Amazona ochrocephala oratrix*) podem eliminar o VDN por até um ano; periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) até o 137º dia pós-infecção (dpi) e mainás (*Gracula religiosa indica*) até o 161º dpi. Todavia, canários (*Serinus canarius*) são refratários ao vírus, não apresentando qualquer sintomatologia da enfermidade, além de um curto período de eliminação viral, durando apenas 12 dias (ERICKSON et al., 1977). Em outro estudo realizado pelo mesmo autor, pombos jovens e adultos experimentalmente infectados, por via ocular, eliminaram VDN pelas vias orais e cloacais, a partir do 13º dpi. Deve ser ressaltado que, nos pombos jovens, a eliminação viral persistiu até o 21º dpi, enquanto nos adultos, não ultrapassou o 7º dpi (ERICKSON et al., 1980). Em outro trabalho, observou-se que pombos experimentalmente inoculados eliminaram genoma do VDN de forma intermitente durante 20 dias, tendo o período máximo de eliminação do mesmo ocorrido entre o 11º e 13º dpi (CARRASCO, 2005).

Patos e gansos geralmente são considerados resistentes a algumas estirpes do VDN, que geralmente são virulentas para galinhas. Objetivando avaliar a capacidade patogênica do VDN em gansos, lotes destas aves foram experimentalmente infectadas e colocadas em contato com galinhas não imunizadas. Dos gansos inoculados, 75% foram a óbito e 100% das galinhas colocadas em contato adquiriram a doença e indo a óbito. Destas galinhas, foi isolado o VDN do baço, fígado, rins, timo, pulmão, proventrículo e intestino (WAN et al., 2004).

Em avestruzes, a transmissão da doença ocorre, geralmente, de forma muito mais lenta, quando comparada a aves de criação comercial, devido à forma distinta de criação e alojamento das mesmas. Na África do Sul, avestruzes foram submetidos ao desafio frente a uma estirpe patogênica do VDN. Das 143 aves inoculadas, foi possível realizar o isolamento do VDN em apenas seis aves. As aves vacinadas, mantidas como controle, não apresentaram sinais clínicos (VERWOERD et al., 1999).

Estudos realizados com roselas (*Platycercus eximius*) revelaram que esta espécie aviária é susceptível ao VDN, tendo em vista que 100% das aves experimentalmente infectadas sucumbiram à ação do VDN (APRIL e PEARSON, 1986).

Nesse contexto, não há dados na literatura referente a esquemas imunoproláticos e de infecção experimental com o VDN para a espécie *Agapornis roseicollis*.

Espécies de aves selvagens, criadas para fins comerciais, são submetidas, muitas vezes, a programas de imunoprolaxia fundamentados por conhecimentos oriundos de investigações com espécies aviárias estritamente domésticas, desprezando-se características epidemiológicas e de susceptibilidade fundamentais para a efetiva prevenção e controle da enfermidade. Assim, torna-se evidente a importância de estudos para o desenvolvimento de programas imunoproláticos efetivos para agapornis, uma vez que não existem informações disponíveis sobre os programas de saúde nesta espécie.

A manutenção do vírus em uma população aviária exige a necessidade de reservatórios. Contudo, a participação e a identificação destes reservatórios ainda são pouco compreendidas. Diante disso, os fatores prevalentes envolvidos na manutenção da infecção são: presença de indivíduos portadores, introdução de aves susceptíveis, multiplicidade de espécies aviárias (aves comerciais X aves selvagens) e heterogeneidade de estirpes do VDN (AWAN et al., 1994).

Conforme exposto, aves selvagens podem albergar agentes infecciosos sem manifestação clínica, podendo atuar como fonte de infecção não somente para outras aves, mas também para mamíferos. Em linhas gerais, podem atuar como portadores de vários agentes virais, tornando possível o surgimento de novas amostras virais patogênicas e sua disseminação entre aves domésticas e comerciais (LIMA, 2005).

Além disso, no século XXI observou-se uma mudança no perfil das espécies de aves em relação à DN. Dessa forma, as atenções têm se voltado para aves selvagens, sejam elas exóticas ou nativas, criadas em cativeiro ou de vida livre/migratórias, quanto à susceptibilidade ao VDN.

Devido ao fato de serem mantidas em cativeiro, as aves do gênero *Agapornis* constituem-se em um potencial meio de transmissão de doenças a outras espécies domésticas. Sendo assim, em face da literatura compulsada, delineou-se a presente pesquisa com o objetivo de ampliar o conhecimento a respeito da imunoprofilaxia contra a DN em *agapornis*, investigar o estado de portador do vírus (VDN) nesta espécie, bem como esclarecer o real papel exercido pela espécie *Agapornis roseicollis* no plano epidemiológico, dentro da perspectiva de fonte de infecção do VDN.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

A revisão de literatura apresentada demonstra que até o presente momento, no que diz respeito à doença de Newcastle, não existem orientações profiláticas ou estudos epidemiológicos, baseados em dados de pesquisa, com relação a periquitos do gênero *Agapornis*.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar, comparativamente, os aspectos clínicos e imunitários da vacinação experimental contra a DN em agapornis (*Agapornis roseicollis*) submetidos às estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do VDN, além de investigar o papel desta espécie como possível estado de portador do VDN, bem como o seu significado epidemiológico, como potencial fonte de infecção desta enfermidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho foi delineado diante da importância da DN no contexto avícola brasileiro, assim como devido à escassez de estudos sobre a epidemiologia desta enfermidade em aves selvagens, especialmente com relação à espécie *Agapornis roseicollis*. Esta pesquisa foi subdividida em dois experimentos, que teve como objetivos:

3.2.1 EXPERIMENTO 1

- a) Registrar sinais clínicos de reação vacinal às estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota administradas em agapornis (*Agapornis roseicollis*), em diferentes programas imunoprofiláticos contra a DN;

- b) Avaliar a resposta imune às estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota administradas em agapornis (*Agapornis roseicollis*), em diferentes programas imunoproláticos contra a DN, pela pesquisa de anticorpos anti-VDN, por meio da reação de inibição da hemaglutinação (HI);
- c) Pesquisar o estado de portador de VDN em agapornis (*Agapornis roseicollis*), pela detecção, por meio da reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa do RNA (RT-PCR), do genoma do VDN, em excreções cloacais de agapornis experimentalmente infectados com uma estirpe patogênica do vírus;
- d) Esclarecer a importância da imunoprofilaxia contra a doença de Newcastle em agapornis (*Agapornis roseicollis*), pela detecção, por meio da reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa do RNA (RT-PCR), do genoma do VDN, em excreções cloacais de agapornis experimentalmente vacinados e infectados com uma estirpe patogênica do vírus.

3.2.2 EXPERIMENTO 2

- a) Esclarecer a importância epidemiológica do estado de portador do VDN em agapornis (*Agapornis roseicollis*) pela detecção, por meio da reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa do RNA (RT-PCR), do genoma do VDN, em excreções cloacais de agapornis experimentalmente infectados com uma estirpe patogênica do vírus e de aves SPF (Specific-Pathogen-Free) conviventes com agapornis desafiados;
- b) Pesquisar a duração do estado de portador do VDN em agapornis (*Agapornis roseicollis*), pela detecção, por meio da reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa do RNA (RT-PCR), do genoma do VDN, em excreções cloacais de agapornis experimentalmente infectados com uma estirpe patogênica do vírus.

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 (DPVE-FCAV-Unesp).

As aves foram mantidas em gaiolas de arame galvanizado (quatro aves por gaiola), contendo bebedouro, comedouro e um recipiente para banho (Figura 3).



Figura 3: Agapornis em gaiolas experimentais.

4.1.2 AVES EXPERIMENTAIS, MANEJO E NUTRIÇÃO¹

Foram utilizados 48 agapornis, machos e fêmeas, com cinco meses de idade.

As aves foram distribuídas, aleatoriamente, em quatro tratamentos (grupos), sendo três repetições de 4 animais por parcela (Tabela 1).

Durante o período experimental, os três grupos de agapornis submetidos a diferentes esquemas de vacinação contra a DN, bem como aquele do grupo controle, permaneceram isolados entre si, a fim de evitar a influência de um tratamento vacinal sobre o outro. Todavia, foram mantidos em condições idênticas de manejo.

Os animais receberam ração própria para a espécie (HALABURDA, 2008) e água *ad libitum*.

Tabela 1: Distribuição dos agapornis (*Agapornis roseicollis*) em grupos experimentais, submetidos a diferentes esquemas de vacinação contra a doença de Newcastle (experimento 1).

Repetições - Experimento 1		
Ulster 2C - repetição 1 4 animais	Ulster 2C - repetição 2 4 animais	Ulster 2C - repetição 3 4 animais
B1 - repetição 1 4 animais	B1 - repetição 2 4 animais	B1 - repetição 3 4 animais
La Sota - repetição 1 4 animais	La Sota - repetição 2 4 animais	La Sota - repetição 3 4 animais
Controle - repetição 1 4 animais	Controle - repetição 2 4 animais	Controle - repetição 3 4 animais

¹ Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal) protocolo nº 007297/10 (19/04/2010) – ANEXO A.

4.1.3 VACINAS E VACINAÇÃO

Foram utilizadas vacinas vivas atenuadas provenientes de um mesmo laboratório e que constavam de frascos de uma única partida, estando todos no início de sua validade.

As vacinas (liofilizadas) utilizadas foram preparadas com as estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota do VDN. O título dessas vacinas foi obtido mediante determinação de sua dose infectante 50% (EID₅₀) em ovos embrionados de galinhas SPF, com oito a 10 dias de incubação.

Para tanto, prepararam-se diluições de 1×10^{-1} a 1×10^{-10} do vírus em solução salina tamponada (PBS) em pH 7,2, as quais foram mantidas em banho de gelo até o momento da inoculação. Presumindo-se o título do vírus, cuja EID₅₀ se procurou determinar, selecionaram-se quatro diluições próximas a esse título (1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9}). A inoculação foi realizada na cavidade alantóide de ovos embrionados SPF com oito a dez dias de incubação. Com auxílio de uma seringa de 1 mL, injetou-se 0,1 mL de cada diluição do inóculo em cada um de sete ovos utilizados por diluição. Após a inoculação, esses ovos foram observados diariamente. Aqueles que morriam antes de 24 horas de incubação eram desprezados. Para todas as estirpes vacinais deste ensaio, anotaram-se os embriões mortos nos dias subsequentes 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 e MUENCH (1938):

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

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

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

A vacinação via ocular foi realizada a partir da diluição das vacinas liofilizadas, utilizando-se água destilada como diluente na proporção de 30mL/1000 doses vacinais/1000 aves, correspondente a 0,03mL de dose vacinal ocular, conforme

metodologia utilizada por PAULILLO (1980; 1984 e 1989) e por PAULILLO et al. (1982; 1987; 1996 e 2001).

A via de vacinação ocular foi eleita em decorrência da facilidade de aplicação, tendo em vista que se tratava de um número reduzido de aves, bem como pela certificação de que todas as aves receberiam a mesma dose vacinal. Confirmando nossos propósitos, estudos feitos com galinhas submetidas a diferentes vias de vacinação, revelaram que a via ocular de administração da vacina é a mais eficiente, quando comparada à aplicação na água de beber ou misturada à ração (THEKISOE et al., 2004). Ademais, a vacinação pela via ocular induz uma resposta imune local, principalmente pela produção de IgA, a qual é de extrema importância na proteção da ave frente ao desafio (TAKADA e KIDA, 1996).

Conforme foi mencionado anteriormente, de acordo com a natureza do experimento, as aves foram separadas, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais, submetidos a diferentes esquemas imunoproliféricos, vacinados e revacinados por via ocular (Tabela 2). O grupo controle, apesar de não receber vacina, foi manejado da mesma forma, recebendo solução fisiológica, via ocular, mimetizando a situação de estresse de contenção submetido aos demais grupos. Todos os grupos foram observados duas vezes ao dia e qualquer manifestação clínica foi devidamente anotada.

Tabela 2. Distribuição dos agapornis (*Agapornis roseicollis*) em diferentes grupos experimentais, vacinados contra a doença de Newcastle, aos cinco meses de idade e revacinados aos seis e meio, sete e meio e oito meses e meio de idade, por via ocular, com diferentes estirpes vacinais (n=48).

Grupos	Vacinação (5 meses de idade)	Revacinação 6 meses e $\frac{1}{2}$, 7 meses e $\frac{1}{2}$, e 8 meses e $\frac{1}{2}$ de idade
I	Ulster 2C	Ulster 2C
II	B1	B1
III	LaSota	LaSota
IV*	Controle	-----

* recebeu apenas solução fisiológica

4.1.4 COLHEITA DE SANGUE

Foram colhidas 216 amostras de sangue das aves, aos cinco, seis, seis e meio, sete, sete e meio, oito, oito e meio, nove e nove meses e meio de idade, sendo realizadas nove colheitas de sangue no total. As amostras de sangue, correspondentes a duas aves/colheita de cada repetição, foram colhidas pela técnica de corte de unha. Embora a venipunção da jugular seja a mais utilizada na colheita de sangue de aves, o risco da formação de hematomas (CAMPBELL, 1988; DEIN, 1986) fez com que a via de eleição para a colheita de sangue fosse pela da técnica de corte da unha, uma vez que o volume necessário para realização do ensaio era pequeno (75 μ L). Após assepsia com álcool 70%, a unha era cortada até que o sangue fluísse livremente. Ao fim da colheita, induzia-se hemostasia pela aplicação de substâncias hemostáticas (subsulfato ferroso), conforme preconizado por KRAUTWALD-JUNGHANNS (2007) (Figura 4).

Imediatamente após a colheita, cada amostra de sangue foi impregnada em 1,5 cm² de papel-filtro (Whatmann nº1), correspondente a um volume aproximado de 75 μ L de sangue, conforme ilustrado na Figura 5. O sangue permaneceu no papel-filtro a 20°C por 24 horas para secagem. Em seguida, os papéis foram embalados em sacos de papel e armazenados em temperatura ambiente até a fase de eluição.

O papel foi subdividido em duas partes iguais e cada uma delas foi hidratada em 187,5 μ L de solução salina fosfatada (PBS; NaCl 8,5g, Na₂HPO₄2H₂O 1,55g, NaH₂PO₄H₂O 0,23g, H₂O q.s.p.1000 mL, pH 7,2), por 24 horas, a 4 °C. Testes iniciais demonstraram a obtenção de 12,5 μ L de soro em cada metade do papel, que ao ser reconstituído com a solução salina resultava em uma diluição 1:16 do soro (FONSECA et al., 2007). Por fim, os eluídos (1:16) do papel-filtro foram submetidos aos testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos específicos para o VDN.



Figura 4: Colheita de sangue de agapornis a partir da técnica de corte de unha, para a realização de testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos específicos para o VDN.



Figura 5: Impregnação de sangue de agapornis em papel-filtro, imediatamente após a colheita, para a realização de testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos específicos para o VDN.

4.1.5 REAÇÃO DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO

As amostras de soro obtidas na fase experimental foram submetidas à pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação para a DN.

Utilizou-se como antígeno (vivo) na reação de inibição da hemaglutinação (HI) a estirpe lentogênica LaSota do VDN, mantida em laboratório por passagens sucessivas em líquido alantóide de embriões de galinhas SPF, com oito a dez dias de desenvolvimento.

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

Com auxílio de pipetador multicalibrado (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 com quatro unidades hemaglutinantes (UHA). O sistema foi então incubado à temperatura de 4°C, durante 20 minutos. Decorrido este prazo, adicionou-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 0,3 e 0,33. A seguir, o sistema foi incubado novamente a 4° C, procedendo-se a leitura após a deposição total de hemácias nos testemunhos (aproximadamente 45 minutos).

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

4.1.6 DESAFIO

Aos 12 meses de idade, dois agapornis de cada repetição/tratamento (24 aves no total), foram desafiados com uma estirpe velogênica viscerotrópica (patogênica para galinhas) do VDN, com tempo médio de morte embrionária (TMM) e índice de

patogenicidade intracerebral (IPIC) de 48 horas e 1,78, respectivamente, cujo título fora obtido mediante determinação de sua dose infectante 50% (EID₅₀) em ovos embrionados de galinhas de oito a dez dias de incubação, conforme técnica descrita no item 4.1.3. 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 “Código de Regulamentos Federal” (2009).

Para controle da patogenicidade da estirpe velogênica do VDN, foi empregado um grupo de seis aves SPF (*Gallus gallus domesticus*) com aproximadamente 30 dias de idade e sem histórico de vacinação contra a DN, comprovado pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI/VDN). Essas aves, mantidas em condições experimentais idênticas àquelas empregadas no desafio dos agapornis, também foram inoculadas com a estirpe virulenta em apreço.

O desafio foi realizado nas dependências do Departamento de Patologia Veterinária - FCAV/UNESP. As aves permaneceram alojadas em isoladores de pressão negativa (Figura 6), convencionalmente utilizados para infecções experimentais com patógenos aviários, recebendo água e ração própria para a espécie *ad libitum*.

A resistência ao desafio foi expressa em porcentagem de proteção total e referiu-se não só à ausência de sinais clínicos, como também de mortalidade nos agapornis desafiados.

Ao término do experimento, as aves remanescentes foram eutanasiadas e eliminadas obedecendo aos critérios de biossegurança (MAPA, 2009).

4.1.7 OBSERVAÇÃO CLÍNICA E NECROSCOPIA

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

4.1.8 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PÓS-TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

4.1.8.1 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

A extração do RNA viral foi realizada para pesquisa do material genético do vírus empregado no desafio a partir de “pools” de amostras de suabes cloacais colhidos dos agapornis, decorridos nove, 14 e 21 dias após a inoculação do vírus.

Estas amostras foram acondicionadas em solução tampão PBS e armazenadas à temperatura de -70°C. Para a extração do RNA utilizou-se o kit de extração NucleoSpin® RNA Vírus (Macherey-Nagel GmbH e Co, Düren, 52355, Germany), conforme recomenda o kit de extração do fabricante. No momento da extração, as amostras foram descongeladas à 4°C e homogeneizadas em vortex por 15 segundos. Foram utilizados 150 µL da amostra para a extração do RNA a partir do kit do fabricante.

4.1.8.2 DESCRIÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (“PRIMERS”)

Os *primers* utilizados na presente investigação foram descritos por TOYODA et al. (1989) e utilizados por KANT et al. (1997), OBERDORFER e WERNER (1998), DEMÉTRIO (2002), SOARES (2002), CARRASCO (2005) e DENADAI (2011). Estes *primers* reconhecem uma região do genoma viral que faz parte da porção responsável pela transcrição da proteína F₀, próximo ao sítio de clivagem desta proteína, os quais são capazes de identificar todas as estirpes do VDN já descritas, independentemente da amostra, da patogenicidade ou do hospedeiro envolvido. A localização destes *primers* no genoma viral foi descrita por TOYODA et al. (1989). Os produtos finais da RT-PCR foram fragmentos de nucleotídeos de 362 pares de base (pb). Todos os

primers foram sintetizados pela SIGMA-Aldrich® (St. Louis, MO 63103, USA), conforme sequência apresentada a seguir:

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

4.1.8.3 SÍNTESE DE cDNA – TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA VIRAL

Para a síntese de cDNA necessário, foi feita uma reação de pré-transcrição, na qual 4µL do RNA extraído foram adicionados a 5µL do *primer* P1 F na concentração de 50 pMol e a 1µL de Água Mili Q autoclavada. A mistura foi submetida ao termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystems®), com ciclo inicial de 95° C, por 3 minutos, a 50° C por 25 minutos e a 4° C até a amostra ser retirada da máquina. Após esse procedimento, foram adicionados os seguintes reagentes para a reação de transcrição reversa: 4,0 µL de First-strand buffer (5x - Invitrogen®); 4,0 µL de DTT – Dithiothreitol (10mM - Invitrogen®); 4,0 µL de dNTP (10mM - Invitrogen®); 0,5 µL de RnaseOUT (40U/ µL – Invitrogen®) e 1 µL de Superscript II (200/ µL - Invitrogen®). As amostras foram submetidas ao seguinte programa do termociclador: 60 minutos a 42° C, 5 minutos a 95° C e a 4° C até a retirada da máquina. O cDNA obtido, quando não utilizado imediatamente, foi acondicionado à temperatura de -70°C até a realização da reação.

4.1.8.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PÓS-TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

A amplificação foi efetuada a partir de 5,0 µL de cDNA, adicionado de 2,5 µL do *primer* sense e anti-sense (50 pMol), 8 µL de dNTP (1,25mM - Invitrogen®); 1,0 µL de TTH – DNA Polimerase (1U/ µL - Invitrogen®); 5 µL de tampão 10x PCR Buffer (200

mM tris HCl; 500mM KCl, Invitrogen®); 5 µL de MgCl₂ e 20 µL de água Milli Q® autoclavada. A amplificação foi efetuada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®). O programa consta de uma etapa de 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial e ativação da enzima), seguida de 35 ciclos de 94°C por 1minuto/ 50°C por 1 minuto e 30 segundos/ 72 °C por 1 minuto e uma etapa final de 72 °C por 5 minutos. Após esta etapa final, a temperatura permaneceu a 4°C até a retirada da amostra.

4.1.8.5 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Os fragmentos gerados na PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen®). Para tanto, uma mistura de 8,0 µL de cada produto amplificado com 2 µL de tampão de corrida foi colocada em um poço do gel, preparado a 1,8% (peso/volume) em tampão TBE 1x (45mM de Tris-Borato e 1mM de EDTA, pH 8,0), com brometo de etídio numa concentração final de 0,5 µg/mL. O gel era submetido à eletroforese sob voltagem de 100 volts, durante 60 minutos e o produto amplificado (amplicons) visualizados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta.

4.1.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL – ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

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

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 INSTALAÇÕES

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

As aves permaneceram alojadas em isoladores de pressão negativa, convencionalmente utilizados para infecções experimentais com patógenos aviários, recebendo água e ração própria para a espécie *ad libitum* (Figura 6).



Figura 6: Isolador de pressão negativa mostrando agapornis mantidos em gaiolas de fundo vazado, suspensas sobre as aves SPF.

4.2.2. AVES EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas seis aves SPF conviventes com quatro agapornis inoculados com uma estirpe velogênica viscerotrópica do VDN ($DIE_{50}=10^{8,15}/0,1$ mL), patogênica

para galinhas. Empregou-se agapornis sem histórico de vacinação ou contato com o VDN, comprovado pelo teste de inibição da hemaglutinação (HI), alojados em gaiolas sem cobertura do fundo, posicionadas, com o auxílio de suportes, acima das aves SPF, no interior dos isoladores de pressão negativa, conforme a Figura 6.

4.2.3 DESAFIO

Após dois dias de aclimação nos isoladores, os agapornis foram inoculados, via óculo-nasal, com uma estirpe velogênica viscerotrópica do VDN. Desse modo, 200 μ L da suspensão do vírus, contendo 10^{8,15} DIE₅₀/0,1mL, foram administrados em cada agapornis, de acordo com o que preconiza o “Código de Regulamentos Federal” (2009), como foi caracterizado no item 4.1.6 do Experimento 1.

Decorridos cinco dias da inoculação dos agapornis com o VDN, as aves SPF foram alojadas junto ao grupo de agapornis, abaixo das gaiolas, havendo contato direto entre as aves SPF e as excretas dos agapornis, a fim de esclarecer o real papel exercido por esta espécie, do ponto de vista epidemiológico, como uma fonte potencial de infecção do VDN para aves comerciais conviventes ou próximas a sua criação.

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

4.2.4 OBSERVAÇÃO CLÍNICA E NECROSCOPIA

Após o desafio, as aves SPF e os agapornis inoculados com uma amostra patogênica do VDN (DIE₅₀=10^{8,15}/0,1 mL) foram observados, diariamente, durante 20 dias, para o registro dos sinais clínicos (morbidade) e da mortalidade. Exames necroscópicos foram realizados em aves que foram a óbito durante o ensaio e/ou eutanasiadas através da administração de uma dose letal de anestésico.

4.2.5 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PÓS-TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)

A extração do RNA viral foi realizada para pesquisa do material genético do vírus empregado no desafio a partir de “pools” de amostras de suabes cloacais colhidos dos agapornis e aves SPF, decorridos nove, 14 e 21 dias após a inoculação dos agapornis. A técnica de PCR utilizada para a análise das amostras foi a mesma descrita no item 4.1.8 do Experimento 1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EXPERIMENTO 1

5.1.1. EXAMES CLÍNICOS

Os agapornis (*Agapornis roseicollis*) vacinados e revacinados via ocular com as estirpes Ulster 2C (Grupo I), B1 (Grupo II) ou LaSota (Grupo III), não mostraram sinais clínicos ou qualquer alteração sugestiva de reações respiratórias pós-vacinais.

A gravidade e a extensão das reações pós-vacinais dependem de inúmeros fatores, tais como, da amostra de vírus vacinal, da presença ou não de outros agentes infecciosos, como o *Mycoplasma gallisepticum*, e da via de administração da vacina (BEARD et al., 1993). Neste aspecto, parece prudente a suposição que a não constatação de estresse respiratório pós-vacinal em agapornis tenha sofrido influência da ausência de infecções concomitantes com outros agentes infecciosos, como o *Mycoplasma sp*, não provocando, assim, reações respiratórias pós-vacinais associadas às condições controladas do experimento.

A propósito, literatura pertinente (DORETTO JÚNIOR, 1997, LIMA, 2005, CAMPIONI, 2008, DENADAI, 2009), respectivamente, em pintos de corte, galinhas d'angola, gansos-da-china e periquitos-australianos, de diferentes idades, indica ausência de sinais clínicos de reação vacinal com o emprego de amostras Ulster 2C, B1 e LaSota, administradas via ocular ou oral.

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, de acordo com 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 frequentemente 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 tem outras infecções respiratórias latentes, que se acentuam pelo estímulo vacinal, conforme relatos de DUEE e DIERS (1967); MEULEMANS (1975) e VILLEGAS et al. (1976).

Por outro lado, também em pintos de corte, as vias de administração ocular e oral têm sido associados com mínimas reações respiratórias pós-vacinais (BEARD e HANSON, 1984; SILVA, 1995; DORETTO JÚNIOR, 1997).

5.1.2 EXAME SOROLÓGICO

As médias aritméticas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) ($\log_2$) dos soros dos agapornis vacinados e revacinados contra a DN, em diferentes programas imunoproliféricos, estão presentes na Tabela 3 e Figura 7.

As aves deste ensaio, procedentes de matrizes não imunizadas contra a DN, independentemente do tratamento vacinal, apresentaram-se destituídas de anticorpos passivos (maternos) aferidos pela reação de HI aos cinco meses de idade. Por sua vez, a partir dos sete meses de idade, os títulos de anticorpos dos soros dos agapornis (Grupos I a III) já eram decorrentes da imunização ativa, através do emprego das estirpes vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota, conforme o grupo.

Analisando, ainda, a Tabela 3 e a Figura 7, nota-se que o grupo controle não apresentou níveis de anticorpos séricos detectáveis contra o VDN, como era esperado, uma vez que as aves não foram imunizadas contra a DN. De outra parte, todos os lotes de agapornis que receberam vacinas preparadas com as amostras Ulster 2C, B1 e LaSota, em processo de revacinação contra a DN (Grupos I, II e III), em linhas gerais, responderam ao estímulo antigênico, produzindo títulos de anticorpos aferidos pela reação de HI. No entanto, observaram-se alguns títulos nulos de HI aos seis, sete e meio e oito meses e meio de idade (Tabela 3 e Figura 7). Em estudo realizado com periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) foram observados, da mesma forma, títulos nulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação aos seis meses e meio, sete e

oito meses e meio de idade, em aves submetidas a diferentes programas de vacinação contra a doença de Newcastle (DENADAI et al, 2010). Por outro lado, as revacinações aos seis e meio, sete e meio e oito meses e meio de idade elevaram os títulos de anticorpos durante o período experimental, porém, a elevação após os sete meses e meio de idade foi inferior às elevações observadas após os seis meses e meio e oito meses e meio de idade.

Os baixos títulos de anticorpos observados nas aves vacinadas com as estirpes Ulster 2C e B1, em sua maioria, condizem com o baixo poder de difusão da estirpe Ulster 2C (McFERRAN e NELSON, 1971) e a baixa capacidade de invasão da estirpe B1 para galinhas (HOFSTAD, 1951). Da mesma forma, títulos elevados de anticorpos detectados para os agapornis vacinados com a estirpe LaSota estão compatíveis com o grande potencial de difusão desta cepa também para galinhas (WINTERFIELD et al., 1957).

De um modo geral, os resultados estatísticos evidenciaram, por ANOVA e Teste de Tukey, diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os lotes de agapornis vacinados com as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota. Analisando-se a Tabela 3, foi possível notar que a estirpe vacinal LaSota conferiu maior grau de imunidade aos agapornis, quando comparada às estirpes Ulster 2C e B1.

As vantagens que a vacina da estirpe LaSota oferece em relação à estirpe vacinal B1 em galinhas estão amplamente documentadas na literatura consultada (WINTERFIELD et al., 1957; TAVASSOLI, 1971; BUTTERFIELD et al., 1973; BORLAND e ALLAN, 1980; PAULILLO, 1980; FASSI-FEHRI et al., 1985; RAJESWAR e MASILLAMONY, 1993). Embora este tipo de vacina apresente o inconveniente de desencadear reações respiratórias indesejáveis em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*) (ALLAN, 1971), o mesmo não foi encontrado em agapornis, o que reforça a primazia na utilização desta estirpe vacinal na imunização desta espécie.

Merece especial atenção o fato de que, a rigor, nenhum trabalho de pesquisa relacionando resposta imunológica frente a diferentes programas de imunização contra a doença de Newcastle (Ulster 2C, B1 e LaSota), na espécie *Agapornis roseicollis*, foi encontrado nas literaturas nacional e internacional consultadas.

Da mesma forma, diante da ausência de outros parâmetros comparativos, em face das poucas informações contidas na literatura compulsada, o esquema de vacinação aplicado aos agapornis utilizados no presente estudo foi elaborado de forma empírica, no decurso do próprio experimento, com base nos resultados sorológicos obtidos a cada colheita de sangue, embora estudos realizados com periquitos-australianos tenham sido tomados como base inicial para o delineamento do experimento (DENADAI, 2010).

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

Tabela 3. Médias aritméticas dos títulos ($\log_2$) de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) dos soros de agapornis (*Agapornis roseicollis*) submetidos a diferentes esquemas de vacinação contra a doença de Newcastle, em período compreendido entre cinco e nove meses e meio de idade, nos diferentes grupos (n=48), Jaboticabal, 2012.

Grupo	Vacinação Via Ocular (5 meses)	Revacinação Via Ocular 6 meses e $\frac{1}{2}$, 7 meses e $\frac{1}{2}$, e 8 meses e $\frac{1}{2}$ de idade	Médias aritméticas dos títulos de HI ($\log_2$) ¹									
			Idade das aves (meses)									
			5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	
I	Ulster 2C	Ulster 2C	0,0	2,17b	2,33a	7,33ab	0,0a	5,83ab	0,0	4,33a	5,67a	
II	B1	B1	0,0	0,0a	2,17a	5,5a	1,5ab	5,5a	0,0	5,17ab	5,67a	
III	LaSota	LaSota	0,0	4,4c	3,33a	8,33b	3,0b	7,0b	0,0	6,0b	7,33b	
IV*	-	-	0,0	0,0a	0,0b	0,0c	0,0a	0,0c	0,0	0,0c	0,0c	

* Grupo controle – recebeu apenas solução fisiológica.

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

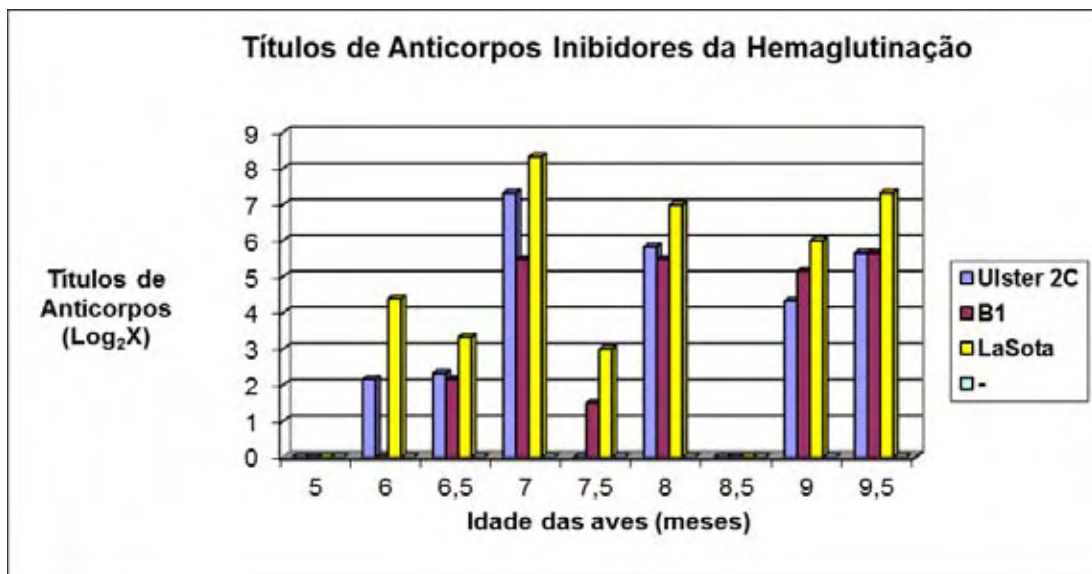


Figura 7. Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de agapornis (*Agapornis roseicollis*) submetidos a diferentes esquemas de vacinação contra a doença de Newcastle.

5.1.3 DESAFIO

Os resultados do desafio com vírus patogênico ($\text{EID}_{50}=10^{8,15}/0,1\text{mL}$) da DN em agapornis estão presentes na Tabela 4.

Todas as aves SPF utilizadas para controle da patogenicidade da estirpe virulenta do VDN sucumbiram ao desafio, decorridos até cinco dias após a infecção experimental, como mostra a Tabela 4. Nas seis aves, os sinais clínicos mais evidentes foram caracterizados, a princípio, por apatia, anorexia, penas eriçadas e conjuntivite, seguidos de espirros e crepitações respiratórias. Na sequência, foram observados sinais clínicos mais severos, como dispnéia, diarreia profusa com fezes esverdeadas, secreção naso-ocular abundante e mucóide, terminando com prostração e morte.

Todas as aves SPF apresentaram, de forma geral, as mesmas lesões macroscópicas, dentre as quais foram mais evidentes: edema do tecido subcutâneo ao redor dos olhos e pescoço, exsudato seroso/catarral presente no conduto nasal, laringe e traqueia; traqueia e laringe hemorrágicas, congestão pulmonar, proventriculite hemorrágica, hemorragia no esôfago, necrose e úlceras no trato intestinal. Os

distúrbios circulatórios das vias aéreas superiores foram caracterizados por hemorragias entre os anéis traqueais, acompanhados de exsudato catarral luminal, estando compatíveis com os descritos em galinhas por DORETTO JÚNIOR e PAULILLO (2007) e PAULILLO e DORETTO JÚNIOR (2009).

Ainda com relação aos resultados do desafio dos agapornis vacinados ou não contra o VDN (Grupos I a IV) (Tabela 4), constatou-se que os animais do grupo controle (Grupo IV) não evidenciaram sinais e lesões sugestivos da DN, mostrando-se refratários à doença clínica frente a este vírus. Nos grupos de aves vacinadas (Grupos I a III), como se poderia esperar, o percentual de proteção ao desafio foi total ou 100,0% (Tabela 4).

Existe uma correspondência entre altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação e a resistência das aves ao desafio, frente a uma estirpe virulenta do VDN, embora baixos títulos não indiquem, necessariamente, ausência de proteção (OWOLODUN e AJYBOIE, 1975). Desse modo, em valores médios, os anticorpos inibidores da hemaglutinação guardam correspondência com os valores de proteção ao desafio (MONTENEGRO et al., 1978; THEKISOE et al., 2004).

Tabela 4. Resultados do desafio com vírus patogênico da doença de Newcastle, em agapornis (*Agapornis roseicollis*) aos 12 meses de idade, nos diferentes grupos (n=24).

Grupo	Vacinação Via ocular (5 meses)	Revacinação via ocular (6 meses e $\frac{1}{2}$, 7 meses e $\frac{1}{2}$, (e 8 meses e $\frac{1}{2}$ de idade)	Nº de Aves Testadas	% média de Proteção ao desafio com o VDN
I	Ulster 2C	Ulster 2C	6	100
II	B1	B1	6	100
III	LaSota	LaSota	6	100
IV*	Controle	- - -	6	100
AVES SPF**			6	0

*Grupo controle – recebeu apenas solução fisiológica

** Specific-Pathogen-Free: controle da patogenicidade do VDN

A propósito, existem evidências de que estirpes patogênicas do VDN, provenientes de espécies diferentes, somente demonstram sua verdadeira patogenicidade após a primeira passagem em frangos de corte (ALEXANDER, 1997; 2003; ALEXANDER e SENNE, 2008), ou após a adaptação ao novo hospedeiro.

Neste enfoque, podemos supor que as estirpes patogênicas do VDN, oriundas de frangos de corte, somente evidenciariam sua real patogenicidade após a adaptação nas aves do gênero *Agapornis*, o que poderia explicar o comportamento refratário desta espécie frente ao VDN.

Outro aspecto pertinente está associado ao fenômeno da mutação presente em amostras do VDN, após passagens sucessivas, originando novas estirpes virais, provavelmente com alteração da sequência dos aminoácidos básicos presentes no sítio de clivagem F_0 . Infortunadamente, a frequência de tal evento, qual seja a taxa de mutação do VDN, é desconhecida na história da enfermidade de Newcastle (KING, 1999).

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

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

5.1.4. PESQUISA DO MATERIAL GENÉTICO DO VÍRUS DE NEWCASTLE (VDN)

Os resultados da RT-PCR dos agapornis, nos diferentes grupos, após o desafio estão presentes na Tabela 5 e Figura 8.

Examinando a Tabela 5, com particular atenção ao lote de agapornis do grupo controle (Grupo IV), observa-se a detecção de material genético do VDN dos suabes cloacais aos nove e 21 dias pós-desafio, o que vem confirmar a susceptibilidade desta espécie ao VDN. A não-detecção de material genético no grupo controle aos 14 dias pós-infecção provavelmente deveu-se à eliminação intermitente do VDN. Resultados semelhantes foram encontrados por CARRASCO (2007) e DENADAI et al. (2011), em estudos realizados com pombos (*Columba livia*) e periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*), respectivamente, onde foi detectada a eliminação do genoma do VDN de forma intermitente. Em contraste, nos lotes de agapornis vacinados (Grupos I a III), decorridos nove, 14 e 21 dias da inoculação da estirpe virulenta, a pesquisa de material genético do VDN foi nula, como pode ser observado na Figura 8.

LIMA (2005) demonstrou experimentalmente que galinhas d'angola (*Numida meleagris galeata*) não manifestaram sinais clínicos quando desafiadas com uma amostra patogênica do VDN. Contudo, ficou demonstrado o estado de portador até aos 30 dias após a infecção experimental com este patógeno. Situação semelhante foi demonstrada em outras espécies, tais como perdizes (PAULILLO et al., 1999), patos (FRANZO et al., 2004), codornas (LIMA et al., 2004a, 2004b) e periquitos-australianos (DENADAI, 2011).

Pelos resultados obtidos neste estudo, por meio de RT-PCR, com os agapornis controle (Grupo IV), ficou demonstrado o estado de portador do VDN por esta espécie, durante o período avaliado, decorridos até 21 dias da infecção experimental com este patógeno (Tabela 5).

O fato de não ter sido revelado material genético do VDN em agapornis vacinados (Grupos I a III) torna evidente a importância da vacinação nesta espécie,

pois estando as aves imunizadas, não haveria possibilidade de replicação do VDN em quantidade suficiente para a infecção posterior de outras espécies de aves domésticas ou selvagens conviventes.

Nesse enfoque, ressalte-se aqui, mais uma vez, que a ampla cobertura vacinal recebida pelos agapornis (Grupos I a III), indubitavelmente, contribuiu efetivamente para a não detecção de material genético do VDN nesta espécie animal. Em verdade, a instituição de programas imunoproláticos contra a enfermidade de Newcastle específicos para criação de agapornis, 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, quais sejam o estado portador de VDN em agapornis e a importância da imunoprolaxia na supressão deste estado.

Tabela 5. Pesquisa do material genético viral para o vírus da doença de Newcastle, por reação de cadeia de polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), a partir de suabes de cloaca em agapornis (*Agapornis roseicollis*) vacinados e revacinados contra a doença de Newcastle, obtidos aos nove, 14 e 21 dias após-desafio (dpi), nos diferentes grupos experimentais (n=24).

Grupo	Vacinação (5 meses)	Revacinação 6 meses e 1/2, 7 meses e 1/2, e 8 meses e 1/2 de idade	Genoma viral do VDN (RT-PCR)		
			9 dpi	14 dpi	21 dpi
I	Ulster 2C	Ulster 2C	-	-	-
II	B1	B1	-	-	-
III	LaSota	LaSota	-	-	-
IV	Controle*	-----	+	-	+

*Grupo controle – recebeu apenas solução fisiológica

- = ausência da estirpe patogênica do VDN

+ = presença da estirpe patogênica do VDN

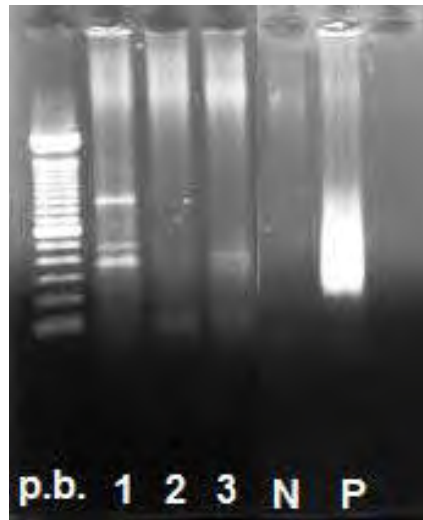


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose com os produtos da RT-PCR provenientes do suabe cloacal de agapornis submetidos a diferentes programas de vacinação e posteriormente desafiados com uma estirpe velogênica do VDN. Da esquerda para a direita: Marcador de Pares de base (100 pb); amostras aos nove (1), 14(2) e 21(3) dias pós-infecção (dpi); Controle Negativo (N) e Controle Positivo (P).

5.2 EXPERIMENTO 2

5.2.1. DESAFIO, OBSERVAÇÃO CLÍNICA, NECROSCOPIA E REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE PÓS-TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR) DOS AGAPORNIS (*Agapornis roseicollis*) INOCULADOS COM O VDN

Todas as seis aves SPF utilizadas para controle da patogenicidade da estirpe virulenta do VDN sucumbiram entre 48 e 72 horas após o desafio. Sinais clínicos e lesões sugestivas da DN foram similares àqueles descritos no item 5.1.3. (Experimento 1).

Por outro lado, 100% dos agapornis desafiados com o VDN não evidenciaram sinais clínicos sugestivos da DN, mostrando-se refratários à doença clínica frente a este vírus.

Na Tabela 6 e Figura 9 estão apresentados os resultados da pesquisa de genoma viral do VDN, por RT-PCR, em agapornis inoculados com a estirpe velogênica do VDN, no período pós-desafio.

Nos agapornis, a detecção do material genético do VDN deu-se aos nove e 21 dias após o desafio, enfatizando-se, assim, a susceptibilidade desta espécie ao VDN. Além disso, o fato de ter sido detectado material genético do VDN, a partir de suabes cloacais dos agapornis, permite caracterizar o estado de portador do VDN desta espécie animal, até aos 21 dias após a infecção com este patógeno.

Examinando ainda a Tabela 6 e Figura 9, observa-se que não houve a detecção de material genético do VDN dos suabes cloacais de agapornis aos 14 dias pós-desafio. Tal fato pode ser justificado pela eliminação intermitente do VDN.

Esses resultados, ainda que em potencial, analisados dentro do enfoque epidemiológico da DN, induzem à ponderação de que os agapornis podem se constituir em um problema para a avicultura comercial, bem como para aves selvagens, sejam elas criadas em cativeiro ou de vida livre.

Tabela 6. Resultados da excreção do VDN em agapornis (*Agapornis roseicollis*), aos nove, 14 e 21 dias após o desafio (dpi), por reação de cadeia de polimerase pós-transcrição reversa (RT-PCR), a partir de suabes cloacais, em agapornis (*Agapornis roseicollis*) não vacinados contra a DN.

Aves	Pesquisa do material genético do VDN (RT-PCR)		
	9 dpi	14 dpi	21dpi
Agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>)	+	-	+

+ = resultado positivo

- = resultado negativo

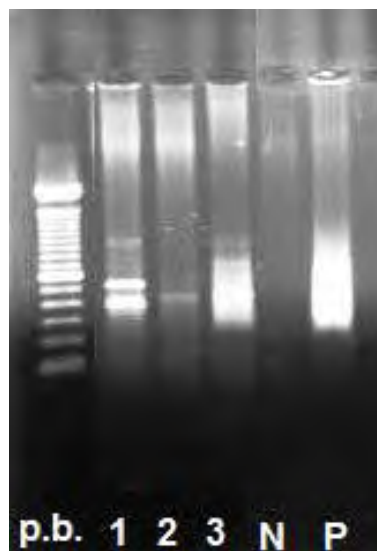


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose com os produtos da RT-PCR provenientes do suabe cloacal de agapornis desafiados com uma estirpe velogênica do VDN. Da esquerda para a direita: Marcador de Pares de base (100 pb); amostras aos nove (1), 14(2) e 21(3) dias pós-infecção (dpi); Controle Negativo (N) e Controle Positivo (P).

5.2.2 OBSERVAÇÃO CLÍNICA, NECROSCOPIA, REAÇÃO DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PÓS-TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR) DAS AVES SPF CONVIVENTES COM AGAPORNIS (*Agapornis roseicollis*) INOCULADOS COM O VDN

Os dados apresentados na Tabela 7 mostram que duas das aves SPF (33,33%) conviventes com agapornis infectados com uma estirpe patogênica ($EID_{50}=10^{8,15}/0,1\text{mL}$) do VDN morreram decorridos até 10 dias após o contato próximo ou direto entre as espécies. No entanto, 100% das aves SPF apresentaram sinais clínicos e lesões compatíveis com a DN, confirmados pela pesquisa do material genético do VDN, decorridos nove, 14 e 21 dias após o desafio, conforme apresentado na Figura 10.

Observaram-se nas aves SPF sinais clínicos como apatia, anorexia, penas eriçadas, conjuntivite e espirros. Na sequência, foram observados sinais clínicos mais severos, como dispnéia, diarreia, secreção naso-ocular, evoluindo para prostração e morte. As lesões macroscópicas mais evidentes nas aves SPF foram edema do tecido subcutâneo ao redor dos olhos e pescoço, exsudato seroso/catarral presente no conduto nasal, laringe e traqueia; traqueia e laringe hemorrágicas, congestão pulmonar, proventriculite hemorrágica, esôfago hemorrágico e hemorragias e necrose no trato intestinal.

Por tais resultados, é certo que os agapornis inoculados com o VDN, embora não tenham manifestado a doença clínica, eliminaram vírus em quantidade suficiente para induzir infecção nas aves SPF conviventes. Além disso, obviamente, as aves SPF conviventes com os agapornis inoculados com o VDN não eram vacinadas contra a enfermidade de Newcastle e, portanto, não possuíam imunidade para impedir a infecção. Em adição, nas aves domésticas, algumas estirpes patogênicas do VDN causam mortalidade logo após a introdução de apenas pequena quantidade de unidades infecciosas do VDN, enquanto outras necessitam de um milhão ou mais de unidades infecciosas de vírus para induzir mortalidade (BEARD e HANSON, 1984).

Neste aspecto, alguns autores buscam explicação para o comportamento viral antagônico, quando avaliado em espécies diferentes. Analisando a base molecular da patogenia dos Paramyxovirus, a virulência é tida como o resultado de uma relação complexa entre o vírus e seu hospedeiro, no qual a capacidade de uma estirpe viral em provocar a doença está intimamente relacionada com a capacidade das proteases do hospedeiro em clivar ou não certas estruturas polipeptídicas virais (ROTT, 1979; GARTEM, 1980, citados por ALEXANDER et al., 1984). Em decorrência deste fato, é provável que a especificidade das proteases de agapornis seja diferente da especificidade das proteases de galinhas. Contudo, a seleção das estirpes virais susceptíveis às proteases de um hospedeiro não necessariamente exclui a possibilidade de ocorrer, de forma simultânea, susceptibilidade às proteases de outro hospedeiro (ALEXANDER et al., 1984).

Pelos achados alcançados, então, neste trabalho, empregando-se animais de experimentação, quais sejam aves SPF em contato direto com excretas de agapornis inoculados com o VDN, ficou patente a transmissão de vírus desta última espécie, decorridos até 21 dias da infecção experimental com este patógeno para aves SPF conviventes, o que vem realçar a importância dos agapornis, do ponto de vista epidemiológico, como potencial fonte de infecção do VDN para aves domésticas em convívio ou próximas a sua criação, ou como fator desencadeante de surtos da enfermidade para populações de frangos de corte, poedeiras comerciais e outras espécies de aves domésticas ou selvagens em convívio ou próximas ao seu hábitat natural e/ou em confinamento.

Em linhas gerais, é pertinente notar que o esclarecimento de importantes aspectos epidemiológicos da enfermidade de Newcastle, entre eles, o papel representado pelos agapornis (*Agapornis roseicollis*) como fonte de infecção de VDN para aves domésticas conviventes, abre novas fronteiras para investigação dessa enfermidade em outras espécies aviárias domésticas, selvagens, exóticas e/ou migratórias, em confinamento ou não.

Tabela 7. Resultados da observação clínica, lesões macroscópicas e excreção do VDN (RT-PCR) de aves SPF conviventes com agapornis (*Agapornis roseicollis*) inoculados com o vírus de Newcastle, aos nove, 14 e 21 dias após o desafio (dpi).

Parâmetros	Aves SPF conviventes com agapornis (<i>Agapornis roseicollis</i>) inoculados com o VDN (n=6)		
	9 dpi	14 dpi	21dpi
Sinais clínicos sugestivos do VDN	+	+	+
Mortalidade (%)	33,33	33,33	33,33
Lesões sugestivas do VDN	+	+	+
Pesquisa do material genético do VDN (RT-PCR)	+	+	+

+ = resultado positivo

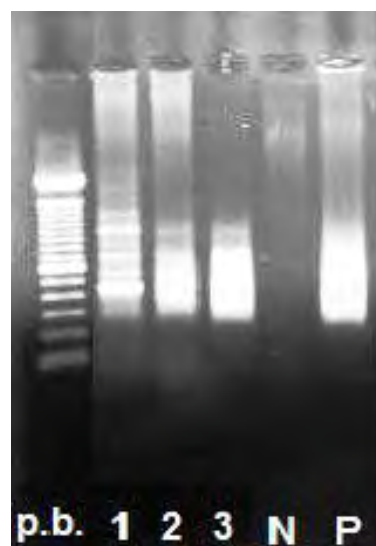


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose com os produtos da RT-PCR provenientes do suabe cloacal de aves SPF conviventes com agapornis desafiados com uma estirpe velogênica do VDN. Da esquerda para a direita: Marcador de Pares de base (100 pb); amostras aos nove (1), 14(2) e 21(3) dias pós-infecção (dpi); Controle Negativo (N) e Controle Positivo (P).

6. CONCLUSÕES

Embora a DN continue sendo exaustivamente pesquisada em aves comerciais de corte e postura, alguns possíveis elos da cadeia epidemiológica da doença, entre os quais, incluem-se aves selvagens, tais como o agapornis, têm sido pouco estudados. No caso particular do Brasil, apesar do elevado grau de desenvolvimento da avicultura, poucos estudos tem sido realizados envolvendo a participação de aves selvagens na epidemiologia da DN e também de outras enfermidades aviárias.

As aves selvagens estão amplamente distribuídas por todo o território nacional, tanto nas áreas urbanas, como nas rurais, e chegam a ocupar os mesmos espaços físicos destinados às criações comerciais de aves, à procura de alimento e água. Quando se considera aves selvagens de vida livre, estas podem carrear o VDN para dentro das granjas comerciais e, ainda, em condições favoráveis, propiciar a transmissão das amostras virais presentes em granjas para as demais aves de vida livre. Dentro desse contexto, fica esclarecido o importante papel exercido por aves do gênero *Agapornis*, em especial, a espécie em estudo, *Agapornis roseicollis*, como possível fonte de disseminação do VDN, seja para aves comerciais, seja para outras aves selvagens.

Desse modo, os resultados, discutidos e interpretados à luz da bibliografia compulsada, conduzem às seguintes inferências:

1. As vacinações utilizando as estirpes Ulster 2C, B1 e LaSota não causaram sinais clínicos de reação vacinal em agapornis (*Agapornis roseicollis*);
2. Os programas imunoproliféricos ensaiados, mediante o emprego das amostras vacinais Ulster 2C, B1 e LaSota apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre si no estímulo da resposta imune humoral (HI);
3. A estirpe vacinal LaSota conferiu maior grau de imunidade aos agapornis (*Agapornis roseicollis*), quando comparada às estirpes Ulster 2C e B1;

4. Os agapornis (*Agapornis roseicollis*) mostraram-se refratários à enfermidade clínica após o desafio com VDN patogênico ($EID_{50}=10^8,15/0,1\text{mL}$);
5. Os agapornis (*Agapornis roseicollis*) mostram-se sensíveis à infecção experimental com o VDN patogênico;
6. Ficou demonstrado o estado de portador de VDN dos agapornis (*Agapornis roseicollis*), decorridos até 21 dias da infecção experimental com este patógeno, por meio de RT-PCR;
7. Ficou caracterizada a importância da imunoprofilaxia na supressão do estado de portador do VDN dos agapornis (*Agapornis roseicollis*);
8. Ficou evidenciada a importância dos agapornis (*Agapornis roseicollis*) do ponto de vista epidemiológico, como fonte disseminadora do VDN para aves SPF conviventes, decorridos até 21 dias da infecção experimental com este patógeno.

7. REFERÊNCIAS

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

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

ALDOUS, E.W.; ALEXANDER, D.J. Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*): a review. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 181-185, 2008.

ALDOUS, E.W.; COLLINS, M.S.; McGOLDRICK, A.; ALEXANDER, D.J. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.80, p.201-212, 2001.

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

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

ALEXANDER, D.J. The epidemiological and control of Avian Influenza and Newcastle disease. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburg, v.112, p.105-126, 1995.

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.

ALEXANDER, D.J. Newcastle disease. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; GLISSON, J.R.; FADLY, A.M.; MACDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. (Ed). **Diseases of Poultry**. 11th ed. Wiley: Iowa State Press, 2003. p. 64-86.

ALEXANDER, D.J.; PARSONS, G.; MARSHALL, R. Infection of fowls with Newcastle disease virus by food contaminated with pigeon faeces. **Veterinary Record**, London, v.15, p.601-602, 1984.

ALEXANDER, D.J.; SENNE, D.A. Newcastle Disease, other paramyxoviruses and Pneumovirus infection. In: SAYF Ym (Ed) **Diseases of Poultry**. 12th ed. Iowa State University Press, 2008. p. 75-100.

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

APRIL, M.M.; PEARSON, J.E. Experimental infection of Rosellas (*Platycercus eximius*) with velogeic viscerotropic Newcastle disease virus (VVNDV). **Avian Diseases**, Kenett Square, v. 30, n.2, p.438-440, 1986.

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

BALLAGI-PORDÁNY, A.; WEHMANN, E.; HERCZEG, J.; BELÁK, S.; LOMNICZI, B. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. **Archives of Virology**, New York, v.141, p.243-261, 1996.

BEARD, W.; BRUGH, M. Immunity to Newcastle disease. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.36, p. 509-512, 1975.

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**. 8th 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 I chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v.37, p. 222-225, 1993.

BOCKMA, B. Report of the committee on transmissible disease of poultry and other avian species. In: Proceedings of the United States Animal Health Association (USAHA), 1998, p. 638-9.

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.

BRUGH, M.; BEARD, C.W. Atypical disease produced in chickens by Newcastle disease virus isolated from exotic birds. **Avian Diseases**, Kenett Square, v. 28, n. 2, p. 482-488, 1984.

BUTTERFIELD, W.K.; DARDIRI, A.H.; YEDLOUTISCHNIG, R.J. Protection of chickens afforded by commercial lentogenic vaccines against challenge exposure to velogênica Newcastle disease virus. **Avian Disease**, Kenett Square, v. 17, n. 2, p. 279-283, 1973.

CAMPBELL, T.W. **Avian hematology and cytology**. Ames: Iowa State University Press, 1988.

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

CARRASCO, A.O.T. **Infecção experimental de pombos com estirpes do vírus da doença de Newcastle de baixa e alta patogenicidade**. 2005. 71f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

CARRASCO, A.O.T.; SEKI, M.C.; RASO, T.F.; PAULILLO, A.C.; PINTO, A.A. Experimental infection of Newcastle disease virus in pigeons (*Columba livia*): humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. **Veterinary Microbiology**. 2007

CARRASCO, A.O.T.; FREITAS NETO, O.C.; LAGES, S.L.; SOUZA, R.L.M.; BERCHIERI JUNIOR, A.; PINTO, A.A. Adaptation of Hemagglutination Inhibition Technique (HI) for the Diagnosis of Newcastle Disease in Ostriches (*Struthio camellus*). **Vírus Reviews & Research**, v.13, p. 1-11, 2008.

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

Código de Regulamentos Federal, Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), Título 9 - **Animal and animal products**. Cap. 1, seção 113.329, p. 767-768. Washington DC, USA, 2009.

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

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

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

DEIN, F.J. Hematology. In: HARRISON G.J. (Ed). **Clinical avian medicine and surgery**. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.174-191.

DEMÉTRIO, C. **Levantamento sorológico pesquisa do vírus da doença de Newcastle em irerês migratórios, *Dendrocygna viduata* (Anseriformes: Anatidae)**,

na cidade de São Paulo. 2002. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

DENADAI, J.; PAULILLO, A.C.; SCHMIDT, E.M.S; MARTINS, G.R.V; LAPERA, I.M.; CARRASCO, A.O.T. Clinical and Immunological Aspects of Newcastle Disease Vaccination in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.8, p. 765-766, 2010.

DENADAI, J.; PAULILLO, A.C.; MARTINS, G.R.V.; SCHMIDT, E.M.S; CARRASCO, A.O.T. Relevance of Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in experimental epidemiology of Newcastle disease. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n.9, p. 691-693, 2011.

DOCHERTY, D.E.; FRIEND, M. Newcastle Disease. In: FRIEND, M; FRANSON, J.C. Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds, Washington: **Biological Resources Division National Wildlife**, Health Center, p. 175-180, 1999.

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

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

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

EBERHARD, J. R. Evolution of nest-building behavior in Agapornis parrots. **The Auk**, v. 115, n.2, p.455-464, 1998.

ERICKSON, G.A.; MARÉ, C.J.; GUSTAFSON, G.A.; MILLER, L.D.; PROCTOR, S.J.; CARBREY, E.A. Interactions between Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease Virus

and Pet Birds of Six Species. I. Clinical and Serologic Responses and Viral Excretion. **Avian Diseases**, Kenett Square, v.21, n.4, p.642-655, 1977.

ERICKSON, G.A.; BRUGH, M.; BEARD, C.W. Viscerotropic Velogenic Newcastle disease in pigeons: clinical disease and immunization. **Avian Diseases**, Kenett Square, v.24, n.1, p.257-267, 1980.

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

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

FORSHAW, J. M. **Parrots of the world**. Princeton: Princeton University Press, 2010, 328p.

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

GALLILI, G.E.; BEN-NATHAN, D. Newcastle disease vaccines. **Biotechnology Advances**, New York, v.16, n.2, p.343-366, 1998.

GERLACH, H. Viruses. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian Medicine: principles and application**, Lake Worth: Wingers Publishing, 1994. p.920-926.

HALABURDA, T. Nutricion. **Agapornis: ver y conocer**. Barcelona, Ed Hispano Europea, 2008. p. 34.

HASTENREITER, H. La maladie de Newcastle au Brésil. **Bulletim Official International Epizzoties**, v.85, p.813-817, 1976.

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

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

ICTV – The International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>>. Acesso em: out. de 2011.

ITO, N. M. K.; PRESTES, A. A.; NICIPORCIUKAS, M.C. Newcastle disease virus: some biological characteristics of twelve samples isolated in Brazil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.23, n.1, p. 47-53, 1986.

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

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

KANT, A.; KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D.J.; BALK, F.; TER HUURNE, A. Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, Hundington, v.26, p.837-849, 1997.

KAPCZYNSKI, D. R.; KING, D.J. Protection chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from Callifornia 2002 exotic Newcastle disease outbreak. **Vaccine**, Athens, v.23, p. 3424-3433, 2005.

KHO, C.L.; MOHD-AZMI, M.L.; ARSHAD, S.S.; YUSOFF, K. Performance of an RT-Nested PCR Elisa for detection of Newcastle disease virus. **Journal of virological Methods**, Amsterdam, v.86, p.71-83, 2000.

KING, D. J. Enfermedad de Newcastle. In: Congresso Latinoamericano de Avicultura, 16, 1999, Lima. **Anais...** p.56-62.

KOUWUENHOVEN, B. Newcastle Disease. In: McFERRAN, J.B.; McNULTY, M.S. (Ed.). **Virus infection in birds**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science. 1993. p. 341-361, 1993.

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

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

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

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

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

LEEUW, O.; PEETERS, B. Complete nucleotide sequence of Newcastle Disease vírus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily *Paramyxovirinae*. **Journal of General Virology**, London, v.80, p.131-136, 1999.

LIMA, F. S.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Evaluation of different programs of Newcastle disease vaccination in japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **International Journal of Poultry Science**, Lasani, 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**, Lasani, v. 3, n. 7, p. 483-484, 2004b.

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

LIMA, R.G. **Análise filogenética de psittaciformes (aves) com base em caracteres morfológicos siringeais e osteológicos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências, na área de Zoologia) - Intituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano de Contingência à Influenza Animal e Doença de Newcastle. Disponível em: <http://agricultura.gov.br/animal/sanidade_animal> Acesso em agosto de 2012.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/>> Acesso em out. 2011.

McFERRAN, J. B.; NELSON, R. Some properties of an avirulent Newcastle disease virus. **Archiv für dir gesamte Virusforschung**, Belfast 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**, Huntingdon, n. 17, 1988, p. 509-513, 1988.

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

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.

MILLAR, N.S.; CHAMBERS, P.; EMMERSON, P.T. Nucleotide sequence of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle Disease virus, strain Ulster: Molecular basis of variation in pathogenicity between strains. **Journal of General Virology**, London, v.69, p.613-620, 1998.

MONTENEGRO, S.A.; REIS, R.; OLIVEIRA, A.A. Vacinas lentogênicas (B1 e LaSota) contra a doença de Newcastle, comercializadas no Brasil. 1. Avaliação da qualidade. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v.30, n.2, p. 143-154, 1978.

MOREAU, R.E. Aspects of evolution in the parrot genus *Agapornis*. **Ibis: A Quarterly Journal of Ornithology**, London, v.90, p.206-239, 1948.

NANTHAKUMAR, T.; KATARIA, R.S.; TIWARI, A.K.; BUTCHAIHAH; KATARIA, J.M. Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and Restriction Enzyme Analysis. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.24, p.275-286, 2000.

NISHIZAWA, M.; PAULILLO, A. C.; NAKAGHI, L. S. O. ; NUNES, A. D.; CAMPIONI, J. M.; DORETTO JUNIOR, L. Newcastle disease in with pekin ducks: response to experimental vaccination and challenge. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.09, p.123-125, 2007.

OBERDORFER, A.; WERNER, O. Newcastle Disease vírus: detection and characterization by PCR of recent German isolates differing in pathogenicity. **Avian Pathology**, Huntingdon, v.27, p. 237-243, 1998.

OIE – World Organization for Animal Health. Disponível em:<http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=5103>, 2006.

OIE – World Organization for Animal Health. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf>, 2009.

OIE – World Organization for Animal Health. Disponível em :<<http://oie.int/>>. Acesso em: out. de 2011.

OIE – World Organization for Animal Health. Disponível em:<http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_immediate_summary>. Acesso em maio de 2012.

OLIVEIRA JUNIOR, J.G.; PORTZ, C.; LOUREIRO, B.O.; SCHIAVO, P.A.; FEDULLO, L.P.L.; MAZUR, C.; ANDRADE, C.M. Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2003, v. 33, n. 2, p. 381- 383.

OLIVEIRA, R. L; GIRÃO, F.G.F. Prevalência da doença de Newcastle, Brasil, 1971-979. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 1979, Belo Horizonte. **Anais...** 2006, p.122-28.

OWOLODUN, B.Y.; AJIBOYE, E.A. Newcastle disease vaccines: a study of duration of immunity and properties of LaSota vaccine given in drinking water. **British Veterinary Journal**, London, v.131, p. 580-585, 1975.

PANSHIN, A.; SHIHMANTER, E.; WEISMAN, Y.; ÖRVELL, C.; LIPKIND, M. Antigenic heterogeneity among the fields isolates of Newcastle disease virus (NDV) in relation to the vaccine strain.1. Studies on viruses isolated from wild birds in Israel; **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v.25, p.95-108, 2002.

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**. 2 ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p. 267-281.

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 e investigación del estado de portador del virus. In: CONGRESSO 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. Importancia de las codornices japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) en la epidemiología experimental de la enfermedad de Newcastle. In: **CONGRESSO CONTROAMERICANO DEL CARIBE DE AVICULTURA**, 17. 2002, La Habana. CD-room.

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 administração com a estirpe lentogênica LaSota em frangos de corte. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.3, n.1, p.73-79, 1987.

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, USP**, São Paulo, v.19, n.1, p.9-43, 1982.

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 peredices (*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.

PHALEN, D.N. Implications of viruses in clinical disorders. In: HARRISON G.J.; LIGHTFOOT, T.L. **Clinical avian medicine**. Florida: Spix Publishing, 2006. p. 18-19.

RAJESWAR, J.J.; MASILLAMONY, P.R. Spray vaccine against Newcastle disease. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 70, n.5, p. 402-404, 1993.

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

REHMANI, S.F. Newcastle disease vaccination: A comparison of vaccines and routes of administration in Pakistan. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.25, p.241-248, 1996.

REIS, J.; NÓBREGA, P. **Tratado de doenças das aves**. RELATÓRIO ANUAL UBA 2003-2004. 2. ed. São Paulo: Edições Melhoramento, 1956. 123p.

RICHTZENHAIN, L.J.; PAULILLO, A.C.; PINTO, A.A.; KRONKA, S.N. Relation between the hemagglutination inhibition test and the indirect Elisa in the serologic monitoring of laying hens submitted to different systems of vaccination against Newcastle disease. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.24, p.187-191, 1993.

ROY, P.; VENUGOPALAN, A.T.; SELVARANGAM, R.; RAMASWAMY, V. Velogenic Newcastle disease virus in captive wild birds. **Tropical Animal Health and Production**, Midlothian, v. 30, p. 299-303, 1998.

SAKAI, K.; SAKABE, G.; TANI, O.; NAKAMURA, M.; TAKEHARA, K. Antibody responses in ostriches (*Struthio camelus*) vaccinated with commercial live and killed Newcastle disease vaccines. **Journal Veterinary Medical Sciences**, Tokyo, v. 68, n.6, p. 627-629, 2006.

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

SCHMIDT, E.M.S.; PAULILLO, A.C.; CARON, L.F.; FILHO, T.F.; AUGUSTINI, M.; VENTURA, H.L.B.; DORETTO JUNIOR, L. Clinical and Immunological Parameters of Newcastle Disease Vaccination in Juvenile Ring - Necked Pheasants (*Phasianus colchicus*). **International Journal of Poultry Science**, Lasani, V. 7, n. 3, p. 283-284, 2008.

SCHMIDT, E.M.S.; PAULILLO, A.C.; MARTINS, G.R.V.; DENADAI, J.; LAPERA, I.M. Immunological and Clinical Parameters of Newcastle Disease Vaccination in Bronze Turkeys (*Meleagris gallopavo*). **International Journal of Poultry Science**, Lasani, V. 9, n.2, p. 180-182, 2010.

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

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

SEAL, B.S.; KING, D.J.; SELLERS, H.S. The avian response to Newcastle disease virus. **Developmental & Comparative Immunology**, New York, v. 24, p.257-268, 2000.

SILVA, A.S.; MAHL, D.L.; SOARES, J.F.; FACCIO, L.; DAU, S.L.; ZANETTE, R.A.; MONTEIRO, S.G. Parasitismo por *Isospora* sp. em *Agapornis fischeri* (Pássaro-do-Amor) Criados Em Cativeiro No Brasil. **Caderno de Pesquisa Sér. Bio.**, Santa Cruz do Sul, vol. 21, n. 1, p. 53-57, 2009.

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. 66f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

SILVA J.S.A.; MOTA R.A.; VILELA S.M.O.; DORETTO JUNIOR L.; PINHEIRO JUNIOR J.W.; SILVA L.B.G. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of the agreste region of the State of Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciências Avícolas*, Campinas, v. 8, n. 2, p. 125-129, 2006.

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

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

TAKADA, A.; KIDA, H. Protective immune response of chickens against Newcastle disease, induced by the intranasal vaccination with inactivated vírus, *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.50, p.17-25, 1996.

TAVASSOLI, A. Immune response of chickens to four lentogenic strains of Newcastle disease virus propagated in lamb kidney cell cultures. *Archives of Razi Institute*, Teheran, v. 23, p. 129-135, 1971.

THEKISOE, M.M.O.; MBATI, P.A.; BISSCHOP, S.P.R. Different approaches to the vaccination of free ranging village chickens against Newcastle disease in Qwa-Qwa South Africa. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v.101, p.23-30, 2004.

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

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

VAITSMAN, J.; MOUSSATCÉ, I. Doença de Newcastle. Ministério da Agricultura, 1954. p. 56 (Boletim 801 do Serviço de Informação Agrícola)

VERWOERD, D.J.; OLIVER, A.; GUMMOW, B.; GERDES, G.H.; WILLIAMS, R. Experimental infection of vaccinated slaughter ostriches in a natural, open air feedlot facility with virulent Newcastle disease virus. **Avian Diseases**, Kenett Square, v.43, p.442-452, 1999.

VICKERS, M.L.; HANSON, R.P. Experimental infection and serologic survey for selected paramyxoviruses in Red-Winged Blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.16, n.1, p.125-130, 1980.

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

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

WESTBURY, H. Newcastle disease virus: an evolving pathogen?. **Avian Pathology**, Geelong, v. 30, p. 5-11, 2001.

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 A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

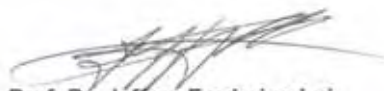


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 007292/10 do trabalho de pesquisa intitulado "**Estudo de parâmetros clínicos e imunitários da vacinação contra a doença de Newcastle e sua importância epidemiológica em Agapornis (*Agapornis roseicollis*)**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Carlos Paulillo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 15 de abril de 2010.

Jaboticabal, 19 de abril de 2010.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA