



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA AGROPECUÁRIA**

ADRIANA BATISTA MATTOS

**SOROLOGIA E PESQUISA VIRAL PARA DOENÇA DE
NEWCASTLE EM GALINHAS DE QUINTAL NA
MICRORREGIÃO DE FEIRA DE SANTANA, BAHIA -
BRASIL**

Cruz das Almas – Bahia

2013

ADRIANA BATISTA MATTOS

**SOROLOGIA E PESQUISA VIRAL PARA DOENÇA DE
NEWCASTLE EM GALINHAS DE QUINTAL NA
MICRORREGIÃO DE FEIRA DE SANTANA, BAHIA -
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do curso de Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em defesa agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. Laudí Cunha Leite

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Lia Muniz Barreto Fernandes

Cruz das Almas – Bahia

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

M444

Mattos, Adriana Batista.

Sorologia e pesquisa viral para doença de Newcastle em galinhas de quintal na microrregião de Feira de Santana, Bahia – Brasil / Adriana Batista Mattos. _ Cruz das Almas, BA, 2013. 59f.; il.

Orientador: Laudí Cunha Leite.

Coorientador: Lia Muniz Barreto Fernandes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Ave doméstica – Criação. 2.Virologia veterinária – Doença. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.5



Mestrado Profissional em
DEFESA AGROPECUÁRIA

UF
B

Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia

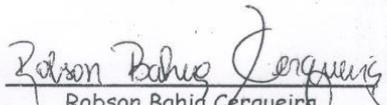
Embrapa

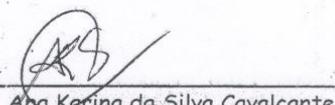
Mandioca e Fruticultura

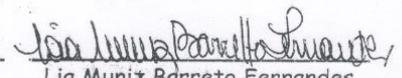
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

Ata da Defesa de **Adriana Batista Mattos**,
aluna do Programa de Pós-Graduação do
curso de mestrado em Defesa Agropecuária da
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

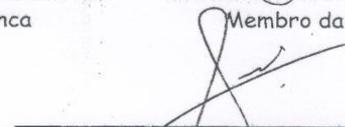
Aos vinte e sete dias do mês de maio de 2013 nas dependências da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em sessão pública, reuniu-se a comissão examinadora constituída pelos professores: Dr. Robson Bahia Cerqueira (presidente), Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante e Dra. Lia Muniz Barreto Fernandes, para examinar e julgar a Dissertação intitulada: "**Sorologia e pesquisa viral para doença de Newcastle em galinhas de quintal na região de Feira de Santana, Bahia - Brasil**" de autoria da aluna regular, Adriana Batista Mattos, do Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária, Curso de Mestrado Profissional. Os trabalhos foram iniciados às 14:30h pelo Professor Robson Bahia Cerqueira, presidente da banca, e depois de encerradas a apresentação e arguição às 17h, os examinadores reuniram-se para avaliação do trabalho tendo o mesmo sido aprovado, de acordo com os pareceres emitidos por cada membro da banca, que serão anexados à presente ata. Proclamados os resultados pelo presidente da banca, foi encerrada a sessão, da qual é lavrado a presente ata, que após lida e aprovada é assinada pelos componentes da banca examinadora, pela mestranda, pelo vice-coordenador do Programa e por todos presentes. Cruz das Almas, 27 de maio de 2013.


Robson Bahia Cerqueira
Presidente


Ana Karina da Silva Cavalcante
Membro da Banca


Lia Muniz Barreto Fernandes
Membro da Banca


Adriana Batista Mattos
Mestranda


Rodrigo Fortes da Silva
Vice-Coodenador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, em especial:

À Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB)

Ao Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia (LASAB)

Ao Laboratório Nacional Agropecuário de São Paulo (LANAGRO – SP)

À Associação Baiana de Avicultores (ABA)

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)

Ao Dr. Laudí Cunha Leite

À Dr.^a Lia Muniz Barreto Fernandes

Ao Cleber de Souza Couto

Ao Itamar Garrido de Souza Pinto

À Márcia Heloísa Cunha Moreira Alves

À Isabella Ramos

À Isabel Maier

À Manoela Barbosa Batista

À Lucyla Maia de Albuquerque Mariz Flor

À Luciana Teixeira

Ao Paulo Raimundo Correia dos Santos

Ao João José Silva de Jesus Batista

Ao Jucivaldo Carneiro Rios

MUITO OBRIGADA DE CORAÇÃO!

RESUMO

A criação de galinha de quintal é uma prática comum em países em desenvolvimento, sendo a doença de Newcastle um fator limitante da sua produtividade. Causada por um vírus RNA, o paramyxovírus aviário tipo 1, a doença de Newcastle acomete várias espécies de aves, sendo a galinha a espécie doméstica mais suscetível. O vírus em galinhas é classificado de acordo com a patogenicidade, sendo que a forma mais virulenta é de notificação obrigatória, requer medidas emergenciais e constitui uma das principais barreiras sanitárias para o livre comércio mundial de aves e seus produtos. No Brasil o plantel avícola comercial é considerado livre da enfermidade, entretanto estudos sorológicos tem sugerido a circulação de vírus vacinal ou de campo em aves não vacinadas na Bahia. Visando mensurar, através da técnica de ELISA indireto, os títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em galinhas de quintal em municípios do principal polo avícola da Bahia, foram analisadas amostras de soro sanguíneo de 875 aves, pertencentes a 92 criatórios localizados próximo às granjas comerciais. Foram submetidas às técnicas convencionais de pesquisa viral, conforme diagnóstico oficial, todas as amostras dos criatórios avaliados que apresentaram títulos de anticorpos superiores a 5.000, em pelo menos uma galinha. Foram detectados títulos de anticorpos com valores extremos, variando de 1 a 14.919 e elevado coeficiente de variação (CV=129%), dados que sugerem a circulação de vírus vacinal ou de campo na região, porém como constatado por RT-PCR em tempo real e isolamento viral, as aves não estavam eliminando o vírus no momento da coleta de amostras. Considera-se que a proximidade entre os criatórios de aves comerciais e de galinha de quintal, as falhas de manejo e deficiência na biosseguridade adotadas nos dois sistemas, podem favorecer a circulação do vírus da doença de Newcastle, representando riscos para a avicultura na região estudada.

Palavras-chave: ELISA, Isolamento viral, Paramyxovirus aviário tipo 1, RT-PCR em tempo real.

ABSTRACT

Creating village chickens is a common practice in developing countries, and Newcastle disease a limiting factor in their productivity. Caused by an RNA virus, the avian paramyxovirus type 1, Newcastle disease affects several species of birds, the chicken is the domestic species most susceptible. The virus is classified according to the pathogenicity in chickens, the most virulent form is notifiable, and requires emergency measures, and it is a major health barrier to free global trade in animals and animal products. Brazil squad in the commercial poultry is considered free of the disease, but serologic studies have suggested the circulation of vaccine virus or field in unvaccinated birds in Bahia. This study aimed measure antibody titers against Newcastle disease virus by indirect ELISA in village chickens in main poultry hub cities of Bahia. Serum samples from 875 birds, belonging to 92 farms, located near to commercial farms were analyzed. All samples in the farm were subjected to conventional viral research, as official diagnosis, when they had at least one antibody titer higher than 5,000. Antibody titers were detected with extreme values ranging 1-14,919 and high coefficient of variation (CV = 129%). These data suggest that there was circulation of vaccine or country virus, but the birds were not eliminating the virus at the time of sample collection, as detected by RT-PCR in real time and viral isolation methods. It is considered that the proximity of the commercial poultry farms and village chicken, flaws management and deficiencies in biosecurity adopted in the two systems may promote the circulation of the virus of Newcastle disease, representing a risk to poultry in the region studied.

Key-words: Avian paramyxovirus type 1, ELISA, Real-time RT-PCR, Virus isolation.

LISTA DE ABREVIATURAS

APMV-1 – Paramixovírus Aviário Sorotipo 1

DN – Doença de Newcastle

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked- Immunosorbent Assay)

F – Proteína de Fusão

HA – Teste de Hemaglutinação

HI – Inibição de Hemaglutinação

HN – Proteína Hemaglutinina-Neuraminidase

IPIC – Índice de Patogenicidade Intracerebral

IPIV – Índice de Patogenicidade Intravenoso

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

LASAB – Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia

M – Proteína de Matriz

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MEM – Meio Mínimo Essencial Base (Minimal Essential Medium)

N – Nucleoproteína

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal (World Organisation for Animal Health)

P – Fosfoproteína

PBS – Solução Salina Tamponada (Phosphate-Buffered Saline)

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PNSA – Programa Nacional de Sanidade Avícola

RNA – Ácido Ribonucleico

RT-PCR – Reação em Cadeia de Polimerase em Transcriptase Reversa

rRT-PCR – RT-PCR em tempo real (real-time RT-PCR)

SPF – Livre de Patógeno Específico (Specific Pathogen Free)

TMME – Tempo Médio de Mortalidade Embrionária

VDN – Vírus da doença de Newcastle

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3 REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1 DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA.....	10
3.2 HISTÓRICO	13
3.3 ETIOLOGIA.....	16
3.4 SINAIS CLÍNICOS E PATOGENICIDADE	20
3.5 LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS	22
3.6 HOSPEDEIROS.....	22
3.7 TRANSMISSÃO.....	25
3.8 DIAGNÓSTICO.....	27
3.8.1 Isolamento e Caracterização Viral.....	28
REFERÊNCIAS	33
ARTIGO 1	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

1 INTRODUÇÃO

A avicultura tem se apresentado como uma importante atividade para o agronegócio brasileiro, pela geração de benefícios sociais e econômicos. Em 2011, foi produzido no Brasil 13,058 milhões de toneladas de carne de frango, saldo 6,8% superior em comparação a 2010, sendo 69,8% destinado ao consumo interno e 30,2% à exportação. A avicultura de corte brasileira se destaca no agronegócio mundial como uma das mais competitivas. O país ocupa a terceira posição no *ranking* mundial dos maiores produtores, sendo superado apenas por Estados Unidos e China, e é líder em exportações de produtos avícolas, tendo comercializado com 145 países em 2011. Ressalta-se ainda a importância da atividade na geração de mais de quatro milhões de empregos e na sustentabilidade das pequenas propriedades (UBABEF, 2012).

As barreiras sanitárias impostas pelos países importadores, em substituição às barreiras tarifárias, constituem atualmente o maior entrave para acesso dos produtos agropecuários aos mercados internacionais. Para o livre comércio mundial de aves e seus produtos, uma das principais barreiras sanitárias é a presença da doença de Newcastle (DN). Atualmente, endêmica em muitos países, esta enfermidade é considerada uma das mais importantes viroses aviárias, devido ao alto poder de infecção viral, gerando impactos econômicos diretos à produção avícola e resultando em embargos à comercialização (OIE, 2012b).

Causada por um vírus RNA, o paramixovírus aviário tipo 1 (APMV-1), a DN acomete muitas espécies de aves domésticas e selvagens, sendo a galinha a espécie doméstica mais susceptível. Com base na patogenicidade para galinhas, o vírus da doença de Newcastle (VDN) tem sido classificado em três patótipos ou formas: lentogênica, mesogênica e velogênica, com intensidade de virulência crescente. As cepas velogênicas são consideradas de alta virulência e causam alta morbidade e mortalidade em aves comerciais, levando a prejuízos econômicos consideráveis (ALEXANDER, 2003).

O plantel avícola industrial brasileiro é considerado livre da DN (BRASIL, 2011; BRASIL, 2003) e para manutenção deste *status* e levando em consideração a reconhecida importância econômica desta enfermidade, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), recomenda a vigilância sanitária constante (BRASIL, 2002).

Entretanto, apesar dos investimentos da indústria avícola na prevenção da DN, as medidas preventivas ainda não alcançaram os pequenos criatórios de galinhas; a vacinação, por exemplo, amplamente praticada nos criatórios comerciais, por razões sociais e econômicas não é prática comum nos criatórios tradicionais de galinhas com finalidade de subsistência (ALEXANDER, 2000).

Muitos estudos foram realizados sobre a DN em sistemas intensivos de produção, por outro lado, o comportamento do vírus em criatórios tradicionais de galinhas para

subsistência ainda não está completamente compreendido. Este tipo de criação é amplamente praticado em áreas rurais de muitos países em desenvolvimento e sua importância tem sido cada vez mais evidente durante os últimos anos, sendo a DN um fator limitante de sua produtividade (AWAN; OTTE; JAMES, 1994; ALEXANDER; BELL; ALDERS, 2004).

Trabalhos da literatura tem descrito a circulação do VDN no Estado da Bahia. Sales *et al.* (2007) demonstraram que galinhas de quintal não vacinadas apresentaram títulos de anticorpos e coeficiente de variação elevados, sugerindo que estas aves entraram em contato com o vírus de campo, tornando-as uma ameaça aos criatórios comerciais, por sua proximidade. Seguindo a mesma linha de pesquisa e objetivando a análise da presença de anticorpos contra o VDN em avestruzes nos Estados da Bahia e de São Paulo, Fernandes *et al.* (2010), encontraram positividade de 17,9% na Bahia e de 4,7% em São Paulo, mesmo em aves sem relato de vacinação.

Vale salientar que diferentes isolados do VDN tem como particularidade, apresentar uma ampla gama de virulência. Esta variação na virulência do agente, não permite que a detecção do APMV-1 ou a evidência de infecção, sejam suficientes para concluir um diagnóstico (ALDOUS; ALEXANDER, 2001).

Para determinar se o VDN é patogênico são seguidas normas internacionais que definem a metodologia e os critérios para caracterizar o grau de patogenicidade do vírus isolado de aves. No Brasil o diagnóstico deve ser realizado em laboratório oficial

ou credenciado pelo MAPA e confirmado pelo Laboratório de Referencia Nacional, o LANAGRO – SP (BRASIL, 2002). As provas de eleição são o isolamento e identificação do agente viral, seguido da caracterização biológica da patogenicidade através de teste *in vivo* em pintos, ou caracterização por sequenciamento do genoma viral (OIE, 2012a).

Tendo em vista a importância socioeconômica do polo avícola de Feira de Santana para o Estado da Bahia, maior produtor de carne de frango do Norte e Nordeste (UBABEF, 2012) e os estudos sinalizando circulação viral para DN, pretende-se verificar através de sorologia a ocorrência de circulação viral e através de isolamento e caracterização diagnosticar a patogenicidade do vírus circulante. Para tanto, foram selecionados como área de estudo os três municípios de maior representatividade na produção avícola do Estado: Feira de Santana, Conceição da Feira e São Gonçalo dos Campos.

O diagnóstico da situação da DN em criatórios de galinha de quintal na região de Feira de Santana – BA pode ser um relevante instrumento para subsidiar a análise de riscos da doença para a avicultura industrial, bem como, para incrementar as ações de vigilância ativa nesta região, potencializando a capacidade de detecção precoce da doença e de rápida reação frente a uma possível introdução da enfermidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar diagnóstico de situação da DN em criatórios de galinha de quintal nos municípios baianos de Feira de Santana, São Gonçalo dos Campos e Conceição da Feira, e fornecer dados que subsidiem a realização de análise do risco que estas aves possam representar como reservatório desta enfermidade para a avicultura comercial da região.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar através da técnica de ELISA indireto os títulos de anticorpos contra o vírus da DN em criatórios de galinha de quintal nos municípios de Feira de Santana, São Gonçalo dos Campos e Conceição da Feira.

- Pesquisar o vírus da doença de Newcastle, através de técnicas convencionais (isolamento em ovos embrionados, identificação e caracterização biológica), conforme padrão de diagnóstico oficial, em galinha de quintal nos municípios de Feira de Santana, São Gonçalo dos Campos e Conceição da Feira.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA

A DN é também conhecida como Pseudopeste Aviária, *Pseudovogel Pest*, *Geflugelpest*, *Pseudopoultry Plague*, *Avian Pest*, *Avian Distemper*, *Ranikhet Disease*, *Tetelo Disease*, *Korean Fowl Plague* e *Avian Pneumoencephalites* (ALEXANDER, 2003).

Em sua forma de manifestação mais virulenta ou patogênica, é uma doença incluída na lista da Organização Internacional de Sanidade Animal (OIE), para o Código Sanitário para Animais Terrestres, que define as condições sanitárias dos animais para o comércio internacional. A DN de alta patogenicidade deve ser notificada à OIE dentro de 24 horas da primeira ocorrência (OIE, 2012b).

Nesta forma de manifestação, a enfermidade é uma das mais importantes para as aves domésticas em todo o mundo. Nos países onde a forma mais virulenta da enfermidade foi erradicada, os embargos comerciais e restrições causam importantes perdas econômicas durante um foco. Entretanto, a enfermidade causada por cepas de baixa patogenicidade, que acomete aves domésticas em todo o mundo, apesar de diminuir a produtividade, não determina restrições ao comércio internacional (CFSPH, 2012).

Atualmente a OIE, da qual o Brasil é membro signatário, define a enfermidade como:

Doença de Newcastle é uma doença infecciosa das aves causada por um Paramyxovirus aviário do sorotipo 1 (APMV-1), que apresenta um dos seguintes critérios de virulência:

a) o vírus tem um índice de patogenicidade intracerebral (IPIC) em pintos de um dia (*Gallus gallus*) igual ou superior a 0,7, ou

b) a presença de múltiplos aminoácidos básicos é demonstrada no vírus (diretamente ou por dedução) na porção C-terminal da proteína F2 e um resíduo de fenilalanina na posição 117, a qual está localizada na porção N-terminal da proteína F1. O termo 'múltiplos aminoácidos básicos' se refere a pelo menos três resíduos de arginina ou lisina entre os resíduos 113 e 116. A impossibilidade de se demonstrar a presença deste modelo característico de resíduo de aminoácidos exigirá a caracterização do vírus isolado, mediante uma prova de determinação do IPIC.

Nessa definição, os resíduos de aminoácidos são numerados a partir da extremidade N-terminal da sequência de aminoácidos deduzida da sequência nucleotídica do gene F0, onde as posições 113-116 correspondem aos resíduos -4 até -1 a partir do sítio de clivagem (OIE, 2012a, cap. 10.9, art. 10.9.1).

Para ser considerado livre de DN, o país, a zona ou o compartimento, deverá comprovar à OIE a ausência de infecção por um período de 12 meses, causada por um APMV-1 com as características descritas acima (OIE, 2012b).

A vigilância para a enfermidade deve ser realizada no âmbito de um programa contínuo e adaptada à situação de cada país. O uso universal de vacinas vivas e a presença comprovada de cepas de VDN lentogênicas em aves domésticas e silvestres, na maioria dos países, implicam que a presença da infecção não é motivo suficiente para impor medidas de controle (OIE, 2012b). Aliado a esses fatores, os riscos de ocorrência de epizootias e as restrições comerciais impostas aos países exportadores, com ocorrência da enfermidade, fazem com que as medidas de controle sejam definidas no âmbito nacional ou internacional (ALEXANDER, 2003).

No Brasil a DN é de notificação compulsória e em casos de foco são adotadas medidas emergenciais (BRASIL, 1994). Através do Sistema de Inspeção de Produtos de Origem Animal e do Programa de Sanidade Avícola e apoiado na manutenção das estruturas do serviço veterinário oficial e na participação do setor privado, busca-se o cumprimento das normas de sanidade e vigilância para a DN, atualmente em fase de controle e erradicação (BRASIL, 2002; 2006).

Apesar de ser facultada aos estados da federação a vacinação sistemática contra a doença de Newcastle (BRASIL, 2002), os esforços para a profilaxia da enfermidade nos criatórios comerciais consistem na vacinação de rotina através da utilização de vacinas vivas lentogênicas, fabricadas principalmente a partir de estirpes viral La Sota, estirpe B1 e clone 30, bem como, de patótipos assintomáticos entéricos normalmente baseados na estirpe V4, VG-GA e Ulster 2C (ORSI et al., 2009).

3.2 HISTÓRICO

A DN foi descrita pela primeira vez em 1926. Nesta ocasião ocorreram dois surtos em locais distintos: Ilha de Java, na Indonésia e em Newcastle-upon-Tyne, na Inglaterra (KRANNEVELD, 1926; DOYLE, 1927 apud ALEXANDER, 2003). A enfermidade difundiu-se para diversos países, atingindo o Sudeste Asiático, o Oriente Médio e a Europa, ficando configurada a primeira pandemia. Entretanto, surtos de uma doença semelhante à ocorrida em 1926, já haviam sido relatados anteriormente na Europa

Central e na Coréia em 1924. Em 1930 foi descrito um surto similar nos Estados Unidos, sendo na época denominada pneumoencefalite aviária (ALEXANDER, 2003).

O nome DN foi escolhido por Doyle durante os focos da Inglaterra em 1926 e continua a ser usado até os dias atuais, embora quando da referência ao VDN, "paramixovirus aviário tipo 1", o termo APMV-1, seja atualmente empregado (ALEXANDER; BELL; ALDERS 2004).

A doença tem atualmente uma distribuição mundial, e são reconhecidas pelo menos três pandemias. Diferentemente da primeira pandemia de 1926, que levou vinte anos para se espalhar, a segunda, foi reconhecida na década de 1960 no Oriente Médio e em quatro anos atingiu vários continentes. Esta rápida difusão foi associada ao desenvolvimento da indústria avícola e ao comércio mundial de aves, através do transporte aéreo, principalmente de Psitacídeos provenientes da Sudeste Asiático, América Central e América do Sul. Os efeitos devastadores desta segunda pandemia impulsionaram o desenvolvimento de vacinas e a implantação de legislações internacionais que regulamentaram o comércio e a produção de aves (ALEXANDER, 2003; PAULLILO, DORETTO JÚNIOR, 2000).

Uma terceira pandemia ocorreu no final da década de 1970, iniciada no Oriente Médio, foi relatada como uma enfermidade de manifestação neurotrópica, sem sinais respiratórios, observada em pombos de competição. A rapidez da disseminação foi impulsionada pela participação deste tipo de aves em competições e pelo comércio

ilegal de aves, sendo a enfermidade possivelmente ainda endêmica para pombos em várias partes do mundo (ALEXANDER, 2003).

A prevalência da DN em todo o mundo é extremamente difícil de ser determinada. Em alguns países ou áreas, o relato da doença é silencioso ou é relatada ocorrência apenas em aves comerciais, sendo ignorada a ocorrência em criatórios caipira ou de fundo de quintal. Mesmo nas aves criadas comercialmente, a estimativa da distribuição geográfica do VDN não é clara, devido à utilização de vacinas vivas. Alguns países usam vacinas vivas compostas por vírus que são consideradas cepas virulentas em outros países (ALEXANDER; BELL; ALDERS, 2004).

Atualmente a DN velogênica é considerada endêmica na Ásia, Oriente Médio, África, América Central, América do Sul e em partes do México. Cepas lentogênicas são isoladas em aves domésticas em todo o mundo (CFSPH, 2012).

No Brasil, a primeira descrição da DN data de 1953 e foi associada à importação de carcaças de frangos congelados contaminadas pelo vírus, procedentes dos Estados Unidos. Na ocasião foi isolada a mostra M33 do VDN em Belém no Pará e em Macapá, no Amapá (SANTOS, 1954 apud FRANZO, 2007). Após este episódio, a enfermidade se manteve endêmica durante muitos anos em todo o país e atualmente focos esporádicos tem ocorrido em plantéis não comerciais. Os surtos foram controlados, principalmente pela vacinação e por medidas profiláticas complementares (ORSI *et al.*, 2010).

Em 2003, o governo brasileiro declarou os plantéis avícolas comerciais dos principais Estados produtores, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal, livres da DN, com reconhecimento da OIE (BRASIL, 2003).

Entretanto, apesar de todas as medidas de vigilância sanitária e biossegurança adotadas pelo país, focos da enfermidade com manifestação de sinais clínicos ocorreram em aves de criatórios de fundo de quintal nos Estados do Rio Grande do Sul (17 casos envolvendo 44 aves susceptíveis) e Mato Grosso (27 casos envolvendo 78 aves susceptíveis), em 2006. No mesmo ano, como resultado de vigilância ativa realizada em aves residentes, nos 10 km do entorno do sítio de aves migratórias em Manaus - AM, foram identificadas através de isolamento viral, quatro focos, totalizando 79 aves susceptíveis, entre patos e galinhas, sendo diagnosticado apenas um caso por foco, não sendo na ocasião, relatados sinais clínicos (OIE, 2012).

3.3 ETIOLOGIA

Os paramixovírus aviários, isolados de aves, durante algum tempo, foram classificados através de testes sorológicos e análises filogenéticas em nove subtipos, designados APMV-1 a APMV-9 (ALEXANDER, 2003). Entretanto Miller; Decani; Afonso (2010) estudando a caracterização biológica, sorológica e genômica de um paramixovirus recentemente isolado de pinguins *rockhopper* (*Eudyptes chrysocome*)

sugeriram que este vírus representa um novo paramixovírus aviário (APMV), sendo atualmente reconhecidos 10 subtipos (APMV-1 a APMV-10) (OIE, 2012a).

A DN é causada pelo APMV-1, mas o APMV-2, o APMV-3, o APMV-6 e o APMV-7 também causam enfermidades em aves domésticas (SAIF *et al.*, 1997; ZHANG; ZHAO; WANG, 2007; NAYAK *et al.*, 2008; XIAO *et al.*, 2009).

Embora o APMV-1 seja considerado como pertencente a um único sorotipo, diversidade genética e antigênica tem sido reconhecida, existindo atualmente dois sistemas diferentes para classificar o VDN com base na sequência do número de resíduos básicos no sítio de clivagem da proteína de fusão (ALDOUS *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2007).

O primeiro sistema classifica o VDN em seis linhagens com 13 sub-linhagens (KIM *et al.*, 2007), e três sublinhagens foram adicionadas mais tarde (SNOECK *et al.*, 2009). No segundo sistema o APMV-1 é separado em dois subtipos, denominados de classe I e classe II, com base na relação genética entre vírus. Nesta classificação a grande maioria das estirpes de APMV-1 pertence à classe II, que é dividido em, pelo menos, dez genótipos (I a X). Isolados da classe I possuem nove genótipos identificados (1 a 9), são geralmente de baixa patogenicidade e foram encontrados principalmente em aves aquáticas selvagens (CZEGLEDI *et al.*, 2006). Entretanto, novos genótipos são constantemente identificados, normalmente provenientes de epizootias globais e pelas mudanças observadas na sequência genômica do vírus, implicando que

genótipos de baixa e alta virulência estão evoluindo simultaneamente em diferentes localizações geográficas (MILLER; DECANINI; AFONSO, 2010).

Assim como os outros paramixovírus aviários, o APMV1 pertence ao gênero *Avulavirus*, sendo classificado na subfamília *Paramyxovirinae*, família *Paramyxoviridae*, ordem *Mononegavirales*. Os vírus desta família são pleomórficos, envelopados, não segmentados, com genoma de RNA com nucleoproteína de fita simples e polaridade negativa (FAUQUET *et al.*, 2005; MAYO, 2002). Possui morfologia esférica, com cerca de 150 a 200nm de diâmetro e nucleocapside revestido por dupla camada lipídica de 12 a 17nm de diâmetro (ALEXANDER, 2003). O genoma apresenta 15.186 nucleotídeos de comprimento, o que sugeriu a sua reclassificação fora do gênero *Rubulavirus* (LEEJW; PEETERS, 1999).

O genoma viral é constituído por seis genes, 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', que codificam seis polipeptídeos principais: nucleoproteína, fosfoproteína, proteína de matriz viral, proteína de fusão, hemaglutinina-neuraminidase e polimerase, respectivamente. Segundo Steward *et al.* (1993) duas outras proteínas, V e W são produzida por uma mudança de estrutura no interior da região de codificação da fosfoproteína.

A hemaglutinina-neuraminidase (HN) e a proteína de fusão (F) são glicoproteínas estruturais de superfície. Dentro do envelope existe um nucleocapsideo helicoidal central que contém o RNA genômico e as proteínas do nucleocapsideo (NP), fosfoproteína (P) e a grande polimerase RNA-dependente (L), que são responsáveis

pelo início da replicação viral intracelular. Entre o envelope e o núcleo viral localiza-se a matriz (M), que é liberada do núcleo quando da entrada do vírus na célula hospedeira (CHAMBERS *et al.*, 1986; STEWARD *et al.*, 1993).

A hemaglutinina confere ao VDN a capacidade de aglutinar eritrócitos, enquanto que a neuraminidase promove a eluição gradual das partículas virais aglutinadas. A proteína F é a responsável pela fusão do envoltório viral aos receptores da membrana plasmática da célula hospedeira, possibilitando a penetração do nucleocapsídeo (ALEXANDER, 2003).

A replicação intracelular ocorre inteiramente no citoplasma da célula invadida e a transcrição ocorre mediante a ação da polimerase (transcriptase), que produz moléculas capazes de atuar como RNA mensageiros e utilizar os mecanismos da própria célula para tradução das proteínas e do genoma viral. As proteínas sintetizadas na célula infectada são transportadas para a membrana celular, que se modifica. Quando ocorre o alinhamento do nucleocapsídeo próximo a essas regiões modificadas é possível à liberação de novas partículas virais a partir da superfície da célula (PEEPLES, 1988).

A glicoproteína de fusão F é sintetizada por um precursor inativo, F₀, que é proteoliticamente clivada na ligação peptídica de resíduos 116 e 177 por meio de uma enzima da célula invadida, em dois polipeptídeos ligados F₁ e F₂ (GOTOH *et al.*, 1992).

Atualmente existem evidências de que o precursor F0 é um determinante para a virulência dos APMV-1, sendo a sequência de aminoácidos no sítio de clivagem da proteína F (TOYODA *et al.*, 1987; GLICKMAN *et al.* 1988; LIU *et al.*, 2007) e a capacidade das enzimas proteases de clivar a F0 de diferentes tecidos, responsáveis pela patogenicidade da estirpe viral (GOTOH *et al.*, 1992; OGASAWARA *et al.*, 1992).

Estudos tem demonstrado que os vírus virulentos para galinha apresentam sequência de aminoácidos deduzidas do precursor F0 $_{112}R/K-R-Q-K/R-R_{116}$ na porção C-terminal da proteína F2 e F (fenilalanina) no resíduo 117 da porção N-terminal da proteína F1. Os vírus de baixa patogenicidade possuem a sequência de aminoácidos na mesma região de $_{112}G/E-K/R-Q-G/E-R_{116}$ e L (leucina) no resíduo 117 (COLLINS; BASHIRUDDIN; ALEXANDER, 1993).

Em estirpes velogênicas a proteína F tem como característica a presença de dois pares de resíduos de aminoácidos básicos perto do local de clivagem, por outro lado nas cepas lentogênicas, apenas dois aminoácidos estão presentes no local de clivagem e nas mesogênicas estão presentes neste local, dois pares de resíduos de aminoácidos básicos ou uma arginina, e um par de lisina / arginina (ALEXANDER, 2003).

As moléculas de F0 das amostras virulentas de VDN são clivadas em uma grande variedade de tecidos e órgão do hospedeiro resultando em uma infecção sistêmica,

enquanto que as F0 dos vírus de baixa virulência são clivadas em limitados tipos de células, tais como trato respiratório e intestinal (ROTT, 1979).

3.4 SINAIS CLÍNICOS E PATOGENICIDADE

Os sinais clínicos observados em aves infectadas podem variar desde uma infecção assintomática a mortalidade súbita de 100% das aves com apresentação de síndrome respiratória e lesões neurológicas. Esta variação clínica depende de fatores como: o tipo de vírus, a espécie hospedeira, a idade do hospedeiro, a ocorrência de infecção simultânea, situações de estresse ambiental e o estado imunológico do hospedeiro (ALDOUS; ALEXANDER, 2001; ALEXANDER, 2004; KING, 2008).

Com base na manifestação clínica observada em galinhas, Beard e Hanson (1984) agruparam as cepas virais em cinco formas ou patótipos: DN velogênica viscerotrópica (patótipo de Doyle), que se apresenta de forma aguda e letal, com lesões hemorrágicas no trato digestivo; DN velogênica neurotrópica (patótipo de Beach), com alta mortalidade, lesões neurológicas e síndrome respiratória; DN mesogênica (patótipo de Beaudette) apresenta infecção respiratória aguda e às vezes infecção nervosa com baixa mortalidade; DN lentogênica (patótipo de Hitchner) causa uma leve ou inaparente infecção respiratória em galinhas e é amplamente utilizada para fabricação de vacinas; e a forma entérica-assintomática (patótipo Ulster) com infecção intestinal inaparente.

Entretanto esta é uma divisão considerada apenas didática, pois em situações de campo ou mesmo experimentais usando galinhas livres de patógenos específicos (SPF), ocorrem sobreposições das formas de manifestação. Em algumas situações no campo, os sinais clínicos induzidos por cepas de baixa patogenicidade podem ser evidenciados, apresentando sinais clínicos semelhantes aos de vírus patogênicos (ALEXANDER; BELL; ALDERS, 2004).

Não existem sinais patognomônicos, mas, em termos gerais, são considerados sinais clínicos de DN: depressão; diarreia; edema de cabeça; crista e barbela; sinais nervosos, como paralisia e torcicolo; sinais respiratórios; redução do ganho de peso e da postura de ovos (ALEXANDER, 2000). Outras características típicas da doença incluem: rápida propagação, morte em 2 a 3 dias, taxa de mortalidade superior a 50% em populações não vacinadas, e um período de incubação de 3 a 6 dias ou, em raras ocasiões, 2 a 15 dias (BEARD; HANSON, 1984).

3.5 LESÕES ANATOMOPATOLÓGICAS

As lesões macroscópicas e microscópicas não podem ser consideradas patognomônicas para qualquer forma da DN. Normalmente as aves acometidas por cepas virulentas do VDN apresentam aparência febril, carcaça desidratada e lesões hemorrágicas no trato intestinal, principalmente no proventrículo, duodeno, jejuno e íleo. Quando há envolvimento do sistema respiratório, são encontradas lesões hemorrágicas, congestão e aerossaculite. Por outro lado, mesmo em aves exibindo

sinais neurológicos, não são encontradas lesões macroscópicas no sistema nervoso central. As alterações microscópicas consistem basicamente em hiperemia, necrose, encefalomielite não purulenta, infiltração celular e edema. Esses achados podem ser encontrados em diversos órgãos e no sistema nervoso central, não tendo entretanto significado diagnóstico (ALEXANDER, 2000; ALEXANDER; BELL; ALDERS, 2004).

3.6 HOSPEDEIROS

A DN acomete aves domésticas e selvagens provocando sinais clínicos em algumas espécies e em outras não, sendo a galinha a espécie doméstica mais afetada. O VDN foi também isolado em alguns mamíferos, entretanto sem apresentar importância epidemiológica. Em humanos provoca conjuntivite (NELSON *et al.* 1952; HALES; OSTLER, 1973; NAKAMURA *et al.* 2004;).

Em levantamento bibliográfico realizado por Kaleta e Baldauf (1988), foi relatada infecção experimental ou natural em 27 das 50 ordens aviárias existentes, envolvendo 241 espécies de pássaros. Entretanto, provavelmente todas as aves são susceptíveis a infecção pelo VDN, apesar das espécies terem níveis diferentes de susceptibilidade (ALEXANDER, 2003).

Como uma grande variedade de subtipos sorológicos têm sido isolados de aves aquáticas silvestres assintomáticas, acredita-se que estas espécies são o reservatório natural do vírus, implicando em seu importante papel como agente transmissor para

aves domésticas (ALEXANDER, 1995). Existem indicações de que aves silvestres infectadas tem o potencial de propagar o VDN de forma muito rápida e por longas distâncias (ABOLNIK, 2007).

Os dois grandes elos da cadeia epidemiológica da DN são as aves aquáticas silvestres (reservatório primordial) e as aves domésticas (reservatório secundário). Os antecedentes revelam uma epidemiologia complexa e uma história não linear da transformação da virulência do agente. No hospedeiro primário, formas primitivas do vírus (cepas apatogênicas) circularam de forma assintomática e através de passagem em aves domésticas foram convertidas em cepas virulentas. Portanto, as aves domésticas são o cenário para a conversão em virulência e para a manutenção de cepas virulentas (CZEGLÉDI *et al.*, 2008).

As espécies mais susceptíveis são os galiformes, os faisões, os psitacídeos, as ratitas e os pombos. Dentre as de susceptibilidade moderada encontram-se as aves de rapina, os pinguins e os passeriformes, sendo as menos susceptíveis as aves aquáticas, os gansos, os corvos e os pelicanos. De forma geral, os patótipos virais de alta virulência são associados normalmente a aves tropicais, principalmente psitacídeos, enquanto que os de baixa virulência são normalmente associados a aves aquáticas (CROSS, 1995).

Animais como cães, gatos, raposas e roedores eliminam o vírus por 72 horas após ingerir carcaças de aves contaminadas, podendo atuar como reservatórios

transitórios e transmitir o VDN através da contaminação do meio ambiente (AWAN; OTTE; JAMES, 1994).

No homem, tanto as cepas vacinais quanto as virulentas de aves doentes podem infectar e causar sinais clínicos. O principal sintoma clínico observado é uma conjuntivite que se desenvolve em até 24 horas após a exposição do vírus ao olho (SWAYNE; KING, 2003). Tem caráter ocupacional, limitando-se a laboratoristas, equipes de vacinação (principalmente via aerossol) e pessoas que manuseiam aves infectadas e suas carcaças. O contato casual com aves infectadas representa baixo risco de infecção humana. Não existe relato de propagação entre humanos, mas estes quando infectados podem eliminar o vírus (ALEXANDER, 2003).

3.7 TRANSMISSÃO

A transmissão entre animais ocorre de forma horizontal como resultado da inalação de partículas ou gotículas ou ingestão de material infeccioso excretado, como fezes. Os vírus que não induzem sinais respiratórios significativos e os assintomáticos são transmitidos principalmente através de fezes contaminadas. A transmissão aérea fica evidente a partir da administração de vacinas vivas por aerossol, sendo a infecção estabelecida pela via respiratória. Existem, entretanto, poucas evidências experimentais de infecção aérea entre aves infectadas e aves sensíveis em condições de campo, mesmo sobre curtas distâncias (ALEXANDER, 2004). Li *et al.* (2009) comprovaram experimentalmente a transmissão via aérea em curta distância através

aerossóis, transmitidos entre galinhas infectadas e galinhas livres de patógenos específicos (SPF). Entretanto, a via aérea de infecção tem pouco significado e o sucesso da transmissão do agente depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e densidade.

Para que ocorra a introdução e manutenção do VDN em uma população aviária faz-se necessário a existência de reservatórios e/ou disseminadores. Portanto, os fatores provavelmente envolvidos na manutenção da infecção são: a presença de indivíduos portadores; a introdução de aves susceptíveis; a multiplicidade de espécies aviárias em convívio contíguo, especialmente quando estão presentes aves silvestres e domésticas e a heterogeneidade de estirpes do vírus (AWAN; OTTE; JAMES, 1994).

Em resumo, as principais formas de introdução e propagação do vírus em uma área livre são: a) o movimento de aves selvagens migratórias com papel significativo na propagação do vírus em áreas onde a enfermidade já esteja estabelecida, já que a maioria das cepas circulantes nessas espécies é de baixa virulência, não sendo, entretanto excluído a possibilidade de infecção primária; b) o comércio mundial de aves de cativeiro e de caça, pombos correios e aves domésticas mantidas para fins de recreação; c) a comercialização de aves comerciais vivas e produtos avícolas; d) o movimento de pessoas e equipamentos; e) alimentos avícolas e água contaminada; f) propagação aérea (ALEXANDER, 2004).

O fator mais importante para a introdução do VDN em aves caipira é a aquisição de galinhas infectadas. Spradbrow (1994) afirma que existe uma tendência em atribuir os surtos em galinhas de quintal a condições sazonais, já que em muitos países a enfermidade tem uma maior ocorrência em determinadas épocas do ano. Entretanto o autor alerta que, as condições sazonais podem ser apenas um fator indiretamente envolvido e que o aumento da circulação de galinhas pode ser a influência direta. Salienta que tem sido sugerido que na Indonésia, por exemplo, os focos pode estar relacionados à venda de galinhas para custear a compra de sementes de arroz para plantio, em Uganda ao movimento de pessoas desempregadas durante o período seco que levam galinhas como presentes em visitas a parentes, ou mesmo em muitos países a épocas festivas, quando aumenta a oferta de aves para venda em mercados.

Awan, Otte e James (1994) apontam para a importância das galinhas de quintal na manutenção da enfermidade em uma região. A introdução de aves sensíveis através da eclosão constante, e a probabilidade de que algumas aves ou criatórios não sejam infectados em um primeiro momento do surto, implica que nem todos os animais tornam-se infectados ao mesmo tempo e permite a manutenção da infecção na população por um longo tempo, provavelmente de uma forma cíclica.

3.8 DIAGNÓSTICO

A ampla variação na virulência do vírus da DN implica que a sua detecção ou a evidência de infecção é insuficiente para um diagnóstico adequado. O diagnóstico de infecções pelo VDN objetiva definir as estratégias de controle da doença e apoiar a investigação epidemiológica, já que as medidas de controle diferem conforme a patogenicidade do agente (ALDOUS; ALEXANDER, 2001).

A ampla variedade de sintomas e as diferentes respostas à infecção por diferentes hospedeiros fazem com que os sinais clínicos e as lesões associadas aos diferentes patótipos determinem apenas uma suspeita da enfermidade, não apresentando uma base confiável para o diagnóstico. Portanto, a realização de provas laboratoriais é essencial para a comprovação da ocorrência da doença e para a determinação da patogenicidade da amostra, sendo o isolamento e identificação do vírus considerados métodos de diagnósticos definitivos (ALEXANDER, 2003).

O diagnóstico convencional para DN baseia-se no isolamento viral em ovos embrionados, combinado a testes sorológicos, sendo o mais usado a inibição da hemaglutinação e determinação da patogenicidade (ALEXANDER; MANVELL, 2002; OIE, 2012a).

3.8.1 Isolamento e Caracterização Viral

Vários sistemas de cultura de células são usados para propagação do VDN, entretanto o ovo embrionado de galinha é o mais utilizado para a realização do isolamento viral. Uma suspensão tratada com antibiótico obtida a partir de suabes de traqueia ou orofaringe e suabes cloacais ou fezes provenientes de aves vivas, ou de fezes e amostras de órgãos retirados de aves mortas, são inoculados na cavidade alantóide de ovos embrionados livres de agentes específicos (SPF) com 9 a 11 dias de idade. Os ovos são então incubados a 37°C, durante 4 a 7 dias, e a morte dos embriões verificada a cada 12 horas. Ovos com embriões mortos e todos os ovos no final do período de incubação tem o fluido alantóide testados para a atividade hemaglutinante (HA) e / ou pelo uso de métodos moleculares específicos, sendo o RT-PCR em tempo real (rRT-PCR) o mais utilizado. Em caso de reação positiva na hemaglutinação, realiza-se testes para a inibição de hemaglutinação (HI) com um anti-soro monoespecífico de APMV-1. Em caso de reação positiva na HI para VDN, a identificação do isolado pode ser realizada através da técnica de neutralização viral e a caracterização pode ser obtida por meio de testes de patogenicidade inoculando aves susceptíveis ou ovos embrionados ou por determinação de aminoácidos no sítio de clivagem da proteína F0 (ALEXANDER, 2003; OIE, 2012a).

A detecção direta do VDN pode ser efetuada segundo Brown *et al.* (1999) através de provas de imunohistoquímica, imunoperoxidase e hibridização *in situ*.

Reações cruzadas podem ser observadas no HI entre os diferentes sorotipos do paramixivírus aviários, especialmente entre APMV-1, APMV-3 e APMV-7. Uma alternativa para a caracterização do vírus é a utilização de painéis de soros de referência ou anticorpos monoclonais (MAbs) produzidos contra amostras do VDN. A utilização de painéis de MAbs permite associar os isolados de acordo com suas capacidades biológicas e epidemiológicas (RUSSEL; ALEXANDER, 1983).

Ensaio sorológico como o ensaio imunoenzimático (ELISA) também tem sido utilizados, mas com valor diagnóstico e na vigilância limitado para DN devido à utilização quase universal de vacinas, sendo impossível diferenciar aves infectadas de aves vacinadas. O ELISA tem se tornado a técnica de eleição para monitoramento e estudos de soroprevalência da DN, devido à possibilidade de automação e a disponibilidade de kits comerciais padronizados (YUSOFF; TAN, 2001).

Rotineiramente os testes mais utilizados para a definição da patogenicidade são o Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC) em pintos de um dia, o Índice de Patogenicidade Intravenoso (IPIV) em aves de seis semanas de idade e o Tempo Médio de Morte Embrionária (TMME) em embriões de galinha (DORETO JÚNIOR; PAULILLO, 2006). Entretanto é definido por acordo internacional, que a avaliação definitiva da virulência deve ser determinada pelo teste de IPIC, devido a sua especificidade e sensibilidade. Neste teste a variação na virulência dos diferentes isolados é refletida no índice que varia de 0,0 (vírus avirulentos) a 2,0 (vírus altamente virulentos) (OIE, 2012a).

Apesar dos testes de isolamento viral seguido de testes *in vivo* para determinação da patogenicidade, representarem o padrão de referência, sendo amplamente utilizados por sua sensibilidade e especificidade, são laboriosos, demandam vários dias para execução e requerem experimentos com animais vivos, o que é indesejável atualmente (ALDOUS; ALEXANDER, 2001). Além disso, apesar de serem capazes de definir a virulência de um isolado, não possibilitam identificar as relações biológicas e epidemiológicas de amostras com a mesma virulência (RUSSEL; ALEXANDER, 1983). A OIE orienta a utilização do IPIC apenas quando da existência de forte justificativa com base nas circunstâncias epidemiológicas, retirando a utilização da prova da rotina laboratorial para diagnóstico em amostras para vigilância de aves saudáveis (OIE, 2012a).

Por outro lado, os métodos moleculares possibilitam a identificação e caracterização das amostras virais e são utilizados como ferramenta para determinação da origem do VDN e da disseminação da doença, com grande vantagem sobre as outras técnicas por sua rapidez e precisão, além de requerer um único teste de diagnóstico (ALDOUS; ALEXANDER, 2001; ALEXANDER, 2003).

Dentre as técnicas moleculares que permitiram identificação do VDN têm sido relatados os métodos de tipagem patogênica baseados em transcrição reversa RT-PCR seguido de eletroforese em gel de agarose, sequenciamento de produtos de RT-PCR, ensaio de mobilidade em heterodúplex, análise de endonuclease de restrição

dos produtos de amplificação e a utilização de sondas fluorogênicas (WISE *et al.* 2004).

Como o APMV-1 possui genoma de RNA, a base para a maioria das técnicas moleculares utilizadas para detectar e caracterizar os vírus envolve uma Reação em Cadeia pela Polimerase - Pós Transcrição Reversa do RNA (RT-PCR). Através da transcrição reversa, o RNA viral passa a DNA complementar (cDNA), que pode ser utilizado em análises subsequentes, associado a outras técnicas moleculares que permitem a caracterização viral, como por exemplo análise com enzimas de restrição, hibridização da sonda e o sequenciamento de nucleotídeos (ALDOUS; ALEXANDER, 2001; MILLER; DECANINI; AFONSO, 2010).

Atualmente a RT-PCR tem sido amplamente utilizada para detecção e tipagem patogénica e genotipagem de APMV-1 isolados de líquido alantóides de ovos embrionados inoculados ou em tecidos e fezes de aves infectadas. No entanto, a variabilidade genética do APMV-1 isolado deve ser cuidadosamente considerada devido a resultados falsos negativos (MILLER; DECANINI; AFONSO, 2010).

PCR em tempo real e PCR em tempo real de transcrição reversa (rRT-PCR) são técnicas que oferecem alta sensibilidade proporcionada pelo RT-PCR convencional, com a vantagem de evitar a etapa de processamento pós-PCR, permitindo economia de tempo e material (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002). Wise *et al.* (2004) desenvolveram rRT-PCR com alta especificidade para detecção de infecção por VDN

velogênico e mesogênico, sendo obtida uma correlação positiva entre os resultados rRT-PCR e isolamento viral. A técnica desenvolvida foi indicada para triagem rápida e vigilância em aves de risco, já que não identifica todas as amostras com isolamento viral positivo, não devendo, portanto substituir completamente o isolamento viral.

As técnicas de biologia molecular e sequenciamento de aminoácidos no sítio de clivagem da proteína F0 foram reconhecidas pela OIE e estão sendo amplamente utilizadas na caracterização do VDN. Entretanto, apesar da demonstração da presença de múltiplos aminoácidos básicos no local de clivagem F0, confirmar o potencial virulento do vírus, a falha na detecção de NDV sem múltiplos aminoácidos básicos no local de clivagem F0 através de técnicas moleculares, não confirma a ausência de vírus virulentos. Incompatibilidade de primer, ou a possibilidade de uma população mista de vírus virulentos e avirulentos significa que o isolamento do vírus e uma avaliação *in vivo* de virulência, como o IPIC, continuará a ser necessário (OIE, 2012a).

REFERÊNCIAS

ABOLNIK, C. Molecular epidemiology of Newcastle disease and avian influenza in South Africa. 2007. 286f. PhD thesis, Faculty of Natural and Agricultural Sciences Department of Zoology and Entomology, University of Pretoria. Disponível em: <<http://upet.up.ac.za/thesis/availablr/etd-06202007-123059/>> . Acesso em: 09 mar. 2013.

ALDOUS, E.W.; ALEXANDER, D.J. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). **Avian Pathology**, v. 30, n. 2, p. 117-128, 2001.

ALDOUS, E.W.; MYNN, J.K.; BANKS, J.; ALEXANDER, D.J. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. **Avian Pathology**, v. 32, n. 3, p. 239-257, 2003.

ALEXANDER D.J. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, n. 2, p. 105-126, 1995.

ALEXANDER D. J. Newcastle disease and other avianparamyxoviruses. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 19, n. 2, p. 443 - 462, 2000.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses and pneumovirus infections: Newcastle disease. In: Saif Y. M. (Ed.). **Diseases of Poultry**, 11 ed. Ames: Iowa State University Press, USA, p. 63-92, 2003.

ALEXANDER, D. J.; BELL, J. G.; ALDERS, R. G. Technology review: Newcastle disease with special emphasis on its effect on village chickens. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**. Roma, 26p., 2004. Disponível em: <www.fao.org/docrep/006/y5162e/y5162e00.htmEm cache>. Acesso em: 16 nov. 2012.

ALEXANDER D.J.; MANVELL R.J. **In: ALEXANDER D.J.** Proceedings of the joint eighth annual meetings of the national Newcastle disease and avian influenza laboratories of countries of the European Union, v. 19, 2002, 123p.

ALEXANDER, D. J.; RUSSELL, P. H.; COLLINS, M. S. Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 1 characterisation of isolated viruses. **Veterinary Record**, v. 114, p. 444 - 446, 1984.

AWAN, M.A.; OTTE, M.J.; JAMES, A.D. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. **Avian Pathology**, v. 23, n. 3, p. 405 - 423. 1994.

BEARD, C.W.; HANSON, R.P. Newcastle disease. In: HOFSTAD M.S.; BARNES, H.J.; CALNEK, B.W.; REID, W.M.; YONDER, H.W. (Ed.), **Diseases of poultry**. 8 ed. Ames: Iowa State University Press, p. 425-470, 1984.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 182, de 08 de novembro de 1994**. Aprova as Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico da Doença de Newcastle. Publicada no Diário Oficial da União de 11/11/1994, Seção 1, Página 17003.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa DSA Nº32, de 13 de maio de 2002**. Aprova as Normas Técnicas de Vigilância para a doença de Newcastle e Influenza Aviária, e de controle e erradicação para a doença de Newcastle. Publicado no Diário Oficial da União em 14 de maio de 2002, Seção 1, Página 28.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa DSA Nº11, de 1º de setembro de 2003. **Declara os plantéis avícolas industriais dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Distrito Federal livres da doença de Newcastle**. Publicado no Diário Oficial da União em 05 de setembro de 2003, Seção 1, Página 3.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa DSA Nº17, de 07 de abril de 2006. **Aprova, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade Avícola, o Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle**. Publicado no Diário Oficial da União em 10 de abril de 2006, Seção 1, Página 6.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Norma Interna DSA nº 03, de 03 de outubro de 2011.

BROWN, C.; KING, D.J.; SEAL, B.S. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 125-132, 1999.

CFSPH - THE CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. **Newcastle disease**. College of Veterinary Medicine. Iowa State University. Animal Disease Information, p. 1-7. Disponível em: <<http://cfsph.iastate.edu>>. Acesso em: 13 mar. 2012.

CHAMBERS, P.; MILLAR, N.; RICHARD, W.; BINGHAM, R.W.; EMMERSON, P.T. Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin-neuraminidase and the large protein. **Journal of General Virology**, v. 67, n. 3, p. 475-486, 1986.

COLLINS, M.S.; BASHIRUDDIN, J.B.; ALEXANDER, D.J. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. **Archives of Virology**, v. 128, n. 3-4, p. 363-370, 1993.

CROSS R. G. Paramyxovirus - 1 infection (Newcastle disease) in free living pet birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 4, n. 2, p. 92-95, 1995.

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

CZEGLÉDI, A.; UJVÁRI, D.; SOMOGYI, E.; WEHMANN, E.; WERNER, O.; LOMNICZI, B. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. **Virus Research**, v. 120, n. 1-2, p. 36-48, 2006.

DORETTO JUNIOR L., PAULILLO A. C. Doença de Newcastle. In: Andreatti Filho, R.L. (Ed.) **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, p. 168-181, 2000.

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

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy**. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego; Elsevier Academic Press, p. 655-663, 2005, 1258p.

FERNANDES, L.M.B.; SILVA, P.S.; RAMOS, I.; SALES, T.S.; FABIANE E. Soroepidemiologia da doença de Newcastle em plantéis de avestruzes dos Estados da Bahia e de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 135-140, 2010.

FRANZO, V.S. Ocorrência da doença de Newcastle no Brasil e no mundo. **Revista de Ciências Veterinárias**, v. 5, p. 81-85, 2007.

GLICKMAN, R.L.; SYDDALL, R.J.; IORIO, R.M.; SHEEHAN, J.P.; BRATT, M.A. Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. **Journal of Virology**, v. 62, n. 1, p. 354-356, 1988.

GOTOH, B.; OHNISHI, Y.; INOCENCIO, N.M.; ESAKI, E.; NAKAYAMA, K.; BARR, P.J.; THOMAS, G.; NAGAI, Y. Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. **Journal of Virology**, v. 66, n. 11, p. 6391-6397, 1992.

HALES, R.H.; OSTLER, H.B. Newcastle disease conjunctivitis with subepithelial infiltrates. **British Journal of Ophthalmology**, v. 57, n. 9, p. 694-697, 1973.

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

KING, D. J. Foreign Animal Disease: Newcastle disease. **Committee on Foreign and Emerging Disease** of the United States Animal Health Association, v. 70, p.343-350, 2008.

KIM, L. M.; KING, D. J.; CURRY, P. E.; SUAREZ, D. L.; SWAYNE, D. E.; STALLKNECHT, D. E.; SLEMONS, R. D.; PEDERSEN, J. C.; SENNE, D. A.; WINKER, K.; AFONSOET, C. L. Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. **Journal of Virology**, v. 81, n. 22, p. 12641-12653, 2007.

KRANEVELD, F.C. A poultry disease in the Dutch East Indies. **Ned Indisch B1 Diergeneeskd**, v. 38, p. 448-450, 1926.

LEEIJW, O.; PEETERS, B. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 1, p. 131-136, 1999.

LI, X.; CHAI, T.; WANG, Z.; SONG, C.; CAO, H.; LIU, J.; ZHANG, X.; WANG, W.; YAO, M.; MIAO, Z. Occurrence and transmission of Newcastle disease virus aerosol originating from infected chickens under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 3-4, p. 226-232, 2009.

LIU, H.; WANG, Z.; WU, Z.; ZHENG, D.; SUN, C.; BI, D.; ZOU, Y.; XU, T. Molecular epidemiological analysis of Newcastle disease virus isolated in China in 2005. **Journal of Virological Methods**, v. 140, n. 1-2, p. 206-211, 2007.

MAYO, M.A. Virus Taxonomy. **Archives of Virology**, v. 147, p. 1071-1076, 2002.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MILLER, P.J.; DECANINI, E.L.; AFONSO, C.L. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 26-35, 2010.

MILLER J.P.; KIM L.M.; IP H.S.; AFONSO C.L. *Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus*. **Virology**, v. 391, n. 1, p. 64-72, 2009.

MILLER, P. J.; AFONSO, C. L.; SPACKMAN, E.; SCOTT, M. A.; PEDERSEN, C. J.; SENNE, D. A.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; SWAYNE, D. E. Evidence for a new Avian Paramyxovirus Serotype-10 detected in *Rockhopper Penguins* from the Falkland Islands. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11496-11504, 2010.

NAKAMURA, K.; OHTA, Y.; ABE, Y.; IMAI, K.; YAMADA, M. Pathogenesis of conjunctivitis caused by Newcastle disease viruses in specific-pathogen-free chickens. **Avian Pathology**, v. 33, n. 3, p. 371-376, 2004.

NAYAK B.; KUMAR S.; COLLINS P. L.; SAMAL S. K. Molecular characterization and complete genome sequence of avian paramyxovirus type 4 prototype strain duck/Hong Kong/D3/75. **Virology Journal**, v. 5, p. 124, 2008.

NELSON, C.B.; POMEROY, B. S.; SCHRALL, K.; PARK, W. E.; LINDEMAN, R. J. An outbreak of conjunctivitis due to Newcastle disease virus (NDV) occurring in poultry workers. **American Journal of Public Health**, v. 42, n. 6, p. 672-678, 1952.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SANIDADE ANIMAL (OIE). **Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)**. 7 ed., v. 1, 2012a. Online. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 22 out. 2012.

_____. **Terrestrial Animal Health Code**. 21 ed., v. 1, 2012b. Online. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/>. Acesso em: 22 out. 2012.

_____. **Disease Information**. Immediate Notifications and Follow-ups. 2012c. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary>. Acessado em: 20 nov. 2012.

OGASAWARA, T.; GOTOH, B.; SUZUKI, H.; ASAKA, J.; SHIMOKATA, K.; ROTT, R.; NAGAI, Y. Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 2, p. 467-472, 1992.

ORSI, M.A.; DORETTO JUNIOR, L.; CAMILLO, S.C.A.; REISCHAK, D.; RIBEIRO, S.A.M.; RAMAZZOTI, A.; MENDONÇA, A.O.; BUZZINARO, M.G.; ARNES, C.W. A survey for maintenance of virulent Newcastle disease virus-free area in poultry production in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p.368-375, 2010.

ORSI, M.A.; DORETTO JÚNIOR, L.; REISCHAK, D.; DA SILVA L.H.A.; SPILKI, F.R.; BUZZINARO, M.G.; ARNS, C.W. Newcastle disease vírus vaccine strains: immunogenicity is not influenced by ICPI. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 11, n. 2, p. 129-133, 2009.

PAULILLO, A.C.; DORETTO JÚNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). **Doenças das Aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícola, p. 267-281, 2000, 490p.

PEEPLES, M.E. Newcastle disease virus replication. In: Alexander, D.J. **Newcastle Disease**, (Ed). Boston: Kluwer Academic Publishers, v. 8, p. 45-78, 1988.

ROTT, R. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxoviruses. **Archives of Virology**, v. 59, n. 4, p. 285-298, 1979.

RUSSEL, P.H.; ALEXANDER D.J. Antigenic variation of Newcastle disease virus strains detected by monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v. 75, n. 4, p. 243-253, 1983.

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

SAIF, Y. M; MOHAN, R.; WARD, L.; SENNE, D. A.; PANIGRAHY, B.; DEARTH, R. N. Natural and experimental infection of turkeys with avian paramyxovirus-7. **Avian Disease**, v. 41, n. 2, p. 326-329, 1997.

SALES, T.S.; HERVAL, E.F.G.; CÉSAR, A.E.R.; RAMOS, I; BATINGA, T.B.; SILVA, P.S.; MAIA, P.C.C.; FERNANDES, L. Títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em três diferentes sistemas de criação avícola na região de Feira de Santana – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 386- 393, 2007.

SNOECK, C.J.; DUCATEZ, M.F.; OWOADE, A.A.; FALEKE, O.O.; ALKALI, B.R.; MARC, C.; TARNAGDA, Z.; OUEDRAOGO, J.; MAIKANO, I.; OKWEN, M.; KREMER, J.R.; MULLER, C. P. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. **Archives of Virology**, v. 154, p. 47-54, 2009.

SPRADBROW, P.B. Newcastle disease in village chickens. **Poultry Science Review**, v. 5, p. 57-96, 1994.

STEWART, M.; VIPOND I.B.; MILLAR N.S.; EMMERSON P.T. RNA editing in Newcastle disease virus. **Journal of General Virology**, v. 74, n. 12, p. 2539- 2547, 1993.

SWAYNE, D.E.; KING, D.J. Avian influenza and Newcastle disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 11, p. 1534-1540, 2003.

TOYODA, T.; SAKAGUCHI T.; IMAI K.; INOCENCIO 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**, v. 158, n. 1, p. 242-247, 1987.

UBABEF. UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTORES. **Informes UBABEF**, Dados do Setor, ano1, n.9, 2012. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 30 out. 2008.

WISE, M. G.; SUAREZ, D. C.; SEAL, B. S.; PEDERSON, J. C.; SENNE, D. A.; KING, D. J.; KAPCZYNSKI, D. R.; SPACKMAN, E. Development of a Real-Time Reverse Transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical sample. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 329-338, 2004.

XIAO, S.; PALDURAI, A.; NAYAK, B.; SUBBIAH, M.; PETER, L. COLLINS P. L.; SIBA, K.; SAMAL, S. K. Complete genome sequence of avian paramyxovirus type 7 (Strain Tennessee) and comparison with other paramyxoviruses. **Virus Research**, v. 145, n. 1, p. 80-91, 2009.

YUSOFF, K.; TAN W.S. Newcastle disease virus: Macromolecules and opportunities, **Avian Pathology**, v. 30, n. 5, p. 439-455, 2001.

ZHANG, G. Z.; ZHAO, J. X.; WANG, M. Sorological survey on prevalence of antibodies to avian paramyxovirus serotype 2 in China. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 137-139, 2007.

ARTIGO 1

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Sorologia e pesquisa viral para doença de Newcastle em galinhas de quintal na microrregião de Feira de Santana, Bahia - Brasil.

Serology and viral research for Newcastle disease in village chickens in Feira de Santana microregion, Bahia State, Brazil

MATTOS, Adriana Batista¹; LEITE, Laudí Cunha²; FERNANDES, Lia Muniz Barreto³;
COUTO, Cleber de Souza⁴

**Sorologia e pesquisa viral para doença de Newcastle em galinhas de quintal na
microrregião de Feira de Santana - BA**

(Serology and viral research for Newcastle disease in village chickens in Feira de Santana
microregion, Bahia State, Brazil)

A.B. MATTOS^{1,*}; L.C. LEITE²; L.M.B. FERNANDES³; C.S. COUTO⁴; C.O. MENDES⁵

¹Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia - ADAB, Feira de Santana, BA. *E-mail:
adriana.mattos@adab.ba.gov.br

²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Cruz das Almas, BA

³Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, BA

⁴Universidade do Estado da Bahia - UNEB, Serrinha, BA

⁵Aluna de pós-graduação - UFRB, Cruz das Almas, BA

RESUMO

Visando mensurar, através da técnica de ELISA indireto, os títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em galinhas de quintal em municípios do principal polo avícola da Bahia, foram analisadas amostras de soro sanguíneo de 875 aves, pertencentes a 92 criatórios localizados próximo às granjas comerciais. Foram submetidas às técnicas convencionais de pesquisa viral, conforme diagnóstico oficial, todas as amostras dos criatórios avaliados que apresentaram títulos de anticorpos superiores a 5.000, em pelo menos uma galinha. Foram detectados títulos de anticorpos com valores extremos, variando de 1 a 14.919 e elevado coeficiente de variação (CV=129%), dados que sugerem a circulação de vírus vacinal ou de campo na região, porém como constatado por RT-PCR em tempo real e isolamento viral, as aves não estavam eliminando o vírus no momento da coleta de amostras. Considera-se que a proximidade entre os criatórios de aves comerciais e de galinha de quintal, as falhas de manejo e deficiência na biossegurança adotadas nos dois sistemas, podem favorecer a circulação do vírus da doença de Newcastle, representando riscos para a avicultura na região estudada.

Palavras-chave: ELISA, Isolamento viral, Paramyxovirus aviário tipo 1, RT-PCR em tempo real

ABSTRACT

This study aimed measure antibody titers against Newcastle disease virus by indirect ELISA in village chickens in main poultry hub cities of Bahia. Serum samples from 875 birds, belonging to 92 farms, located near to commercial farms were analyzed. All samples in the farm were subjected to conventional viral research, as official diagnosis, when they had at least one antibody titer higher than 5,000. Antibody titers were detected with extreme values ranging 1-14,919 and high coefficient of variation (CV = 129%). These data suggest that there was circulation of vaccine or country virus, but the birds were not eliminating the virus at the time of sample collection, as detected by RT-PCR in real time and viral isolation methods. It is considered that the proximity of the commercial poultry farms and village chicken, flaws management and deficiencies in biosecurity adopted in the two systems may promote the circulation of the virus of Newcastle disease, representing a risk to poultry in the region studied.

Keywords: Avian paramyxovirus type 1, ELISA, Real-time RT-PCR, Virus isolation

INTRODUÇÃO

Considerada uma das mais importantes viroses aviárias, a doença de Newcastle (DN) representa uma das principais barreiras sanitárias para o livre comércio mundial de aves e seus produtos (OIE, 2012a). É causada por um vírus RNA, do gênero Avulavirus, família Paramyxoviridae, também conhecido como paramixovírus aviário sorotipo 1 (APMV-1) (Fauquet e Fargette, 2005). Com base na patogenicidade para galinhas, o vírus tem sido classificado em três patótipos: lentogênico, mesogênico e velogênico, com intensidade de virulência crescente (Alexander, 2003).

O plantel avícola industrial brasileiro é considerado livre da DN (Brasil, 2011, 2003). Entretanto, trabalhos da literatura tem descrito a circulação do vírus vacinal ou de campo da doença de Newcastle no Estado da Bahia, em galinhas de quintal (Sales *et al.*, 2007) e em avestruzes (Fernandes *et al.*, 2010). Contudo, a particularidade do vírus da doença de Newcastle (VDN) em apresentar uma ampla gama de virulência não permite que a detecção

ou a evidência de infecção conclua o diagnóstico (Aldous e Alexander, 2001). Assim sendo, para determinar se o VDN é patogênico são seguidas normas internacionais que definem a metodologia e os critérios para caracterizar o grau de patogenicidade. No Brasil, o diagnóstico deve ser realizado em laboratório oficial ou credenciado pelo MAPA e confirmado pelo laboratório de referência nacional, o Laboratório Nacional Agropecuário de São Paulo (LANAGRO – SP) (Brasil, 2002). As provas de eleição são o isolamento e identificação viral, seguido da caracterização biológica da patogenicidade através de teste “*in vivo*” em pintos, ou caracterização por sequenciamento genético (OIE, 2012b).

Tendo em vista os estudos sinalizando circulação viral para DN, pretendeu-se verificar, através de sorologia, a ocorrência de contato com o vírus e, através de isolamento e caracterização viral, diagnosticar a patogenicidade do vírus circulante em galinhas de quintal nos três municípios de maior representatividade na produção avícola do Estado da Bahia. Este diagnóstico pode ser um relevante instrumento para subsidiar na análise de riscos da doença para a avicultura, bem como, para incrementar as ações de vigilância, potencializando a capacidade de detecção precoce e de rápida reação frente a uma possível introdução da enfermidade.

MATERIAL E MÉTODOS

A vigilância epidemiológica, a coleta e o envio de amostras para diagnóstico da doença de Newcastle (DN) foram realizados de acordo com o padrão oficial estabelecido pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola, através da Instrução Normativa Nº 32, de 13 de maio de 2002, do Ofício Circular/DSA Nº 07, de 24 de janeiro de 2007 e do Ofício Circular/DSA Nº 91, de 14 de junho de 2010.

Visando potencializar o mecanismo de detecção de atividade viral, caso esta esteja presente, foram escolhidos os municípios de Feira de Santana, São Gonçalo dos Campos e Conceição da Feira, cuja configuração do plantel avícola comercial representa um risco maior de difusão de agentes etiológicos. Nestes municípios encontra-se localizada a maior concentração de matrizeiros, incubatórios, fábricas de ração, abatedouros e granjas de frango de corte do

Estado da Bahia, pertencentes às diversas empresas integradoras e empresas particulares (Souza, 2004).

Tendo em vista a impossibilidade de obtenção do efetivo atual de criatórios de galinhas de quintal, as propriedades amostradas foram escolhidas segundo o critério de proximidade com as granjas comerciais. As granjas comerciais, que serviram de referência, foram escolhidas de forma aleatória, usando o banco cadastral da Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB) e obedecendo a um critério de distribuição geográfica, para que não fossem selecionadas granjas vizinhas e para que as principais áreas de concentração de granjas dos municípios estudados fossem amostradas.

As propriedades amostradas seguiram a distribuição demonstrada na Tab. 1.

Tabela 1 Distribuição de propriedades e amostras por município

MUNICÍPIO	Nº PROPRIEDADES	Nº AMOSTRAS
Feira de Santana	31	296
Conceição da Feira	27	293
S. Gonçalo dos Campos	34	286
TOTAL	92	875

As visitas e coletas de amostras foram realizadas no período de 31 de maio a 10 de setembro de 2012 e contou com o apoio técnico, estrutural e financeiro da ADAB.

Foram amostradas aves com mais de 60 dias de idade, sendo coletado para análises laboratoriais: suabes de traqueia, suabes de cloaca e amostras de sangue para obtenção de soro sanguíneo. As amostras de sangue foram colhidas de forma a possibilitar a obtenção de amostras de soro em duplicidade, e os suabes foram coletados individualmente e acondicionados em meio de cultura MEM (“Minimal Essential Medium”). As amostras foram congeladas, em freezer -20°C, até encaminhamento para os laboratórios.

Os soros sanguíneos foram analisados no Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia (LASAB), através de Kits comerciais de ELISA indireto (IDEXX FlockChek, do IDEXX Laboratories, Inc.). Esta prova foi utilizada como método de triagem, realizada seguindo as recomendações do fabricante e os resultados interpretados através do programa xCheck. A

leitura foi realizada em fotocolorímetro automático ELISA, marca “BIO RAD”, modelo PR 2100, com filtro de 620 nm de comprimento de onda da luz.

Em planteis com uma ou mais aves apresentando títulos de ELISA acima de 5.000 (cinco mil), as amostras de todas as aves da propriedade foram enviados ao LANAGRO-SP. Adotou-se o limite de 5.000 para diminuir o número de amostras que seriam enviadas ao laboratório nacional de referência e também porque a chance de isolamento viral seriam maiores nestas amostras.

Inicialmente as amostras de soro sanguíneo foram submetidas novamente à técnica de ELISA indireto, seguindo o procedimento padrão do LANAGRO - SP.

Dos suabes cloacais e traqueais foi obtido um inóculo viral para cada tipo de amostra por propriedade, sendo os itens de ensaio preparados a partir de uma suspensão 10 a 20% (peso/volume), em PBS (Solução Salina Tamponada), pH 7,2; adicionada de uma solução de antibiótico, para submissão às técnicas de RT-PCR em tempo real (rRT-PCR) e isolamento viral. Como as amostras encaminhadas foram resultantes de vigilância passiva, o LANAGRO - SP realizou as duas provas concomitantemente, seguindo o padrão oficial adotado.

A técnica de rRT-PCR, utilizada para amplificação do gene M, foi adaptada de Wise *et al.* (2004) e do protocolo padrão do National Veterinary Services Laboratories (NVSL), USDA, Ames-Iowa (2010). Baseia-se na técnica de rRT-PCR, com reação de transcrição reversa e PCR one step, com o kit One Step RT-PCR da marca Ambion. Os resultados foram obtidos por emissão de fluorescência quando da amplificação de DNA na presença de sonda interna aos “primers” marcados com reagente fluorescente FAM e quencher BlackHole. As reações foram realizadas em termociclador para PCR em tempo real, plataforma Applied Biosystems, modelo 7500 e/ou 7500 fast, e os resultados analisados e emitidos por “software” do fabricante do equipamento.

O ensaio para APMV-1 matriz foi usado, no LANAGRO-SP, como triagem e todas as amostras suspeitas e positivas foram confirmadas por isolamento viral e rRT-PCR para amplificação do gene F.

O isolamento viral foi realizado por inoculação em ovos embrionados de galinha SPF, de 8 a 11 dias de idade, em até três passagens, e identificação viral por tipificação usando antissoros de referência contra APMV-1 ao APMV-9, através da inibição da hemaglutinação (HI), segundo a norma descrita pela Portaria Nº 182, de 08 de novembro de 1994 do MAPA. Nos casos de isolamento positivo, a virulência do patógeno é determinada através do índice de patogenicidade intracerebral (IPIC) em pintos de um dia, descritos na mesma Portaria ou caracterização por sequenciamento genético.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os criatórios estudados possuíam uma média de 38 galinhas, mantidas em sistema de manejo tradicional, com presença de aves de idades variadas, manejo sanitário e nutricional inadequado e os animais não contavam com assistência médica veterinária e nem com programas de vacinação.

As amostras analisada através de ELISA indireto revelaram títulos de anticorpos com valores extremos, variando de 1 a 14.919, e demonstraram alta dispersão relativa ($CV=129\%$) (Tab. 2). Em aves não vacinadas, a presença de anticorpos específicos no ELISA é um indicativo de que as aves foram expostas ao VDN em algum momento de sua vida, mas não necessariamente que estão enfermas no momento da amostragem. Entretanto, na prática, títulos elevados de anticorpos são indicativos de infecção recente (Abdullsattar, 2004).

O teste de ELISA indireto é amplamente utilizado para avaliar a resposta de anticorpos contra o VDN, sendo extremamente útil para confirmar o sucesso dos programas de vacinação (Miller *et al.*, 2010a). A principal vantagem dos Kits comerciais usados atualmente é a facilidade de execução, além de permitir um rápido processamento de múltiplas amostras, uma alta sensibilidade e especificidade (Alexander, 2003). Entretanto, apesar de ser a técnica de eleição para monitoramentos e estudos de soroprevalência, possui valor limitado no diagnóstico e na vigilância para DN, uma vez que, com a utilização quase universal de vacinas, é impossível diferenciar aves infectadas de aves vacinadas (Yusoff e Tan, 2001).

Tabela 2 Títulos sorológicos para doença de Newcastle, pelo método de ELISA indireto, na região de Feira de Santana

Município ¹	n	CV %	TÍTULO							
					1.000 a					
			Mín.	Máx.	≤ 999		4.999		≥ 5.000	
		n	%	n	%	n	%			
C. da Feira	293	140,8	1	14.919	179	61,1	97	33,1	17	5,8
F. de Santana	296	103,6	1	9.331	188	63,5	104	35,1	4	1,4
S. G. Campos	286	118,6	7	11.589	184	64,3	94	32,9	8	2,8
TOTAL	875	129,2	1	14.919	551	63,0	295	33,7	29	3,3

¹Municípios de Conceição de Feira, Feira de Santana e São Gonçalo dos Campos.

No Brasil, a vacinação sistemática contra DN é facultativa aos estados da federação (Brasil, 2002). Na Bahia, é prática comum vacinar as aves comerciais, sendo utilizadas atualmente as cepas: VGGA, HB1, La Sota e PHY.LMV.42. Apesar de não haver relato de vacinação a campo de galinhas de quintal, nos criatórios amostrados observou-se presença de aves de linhagem melhorada, que possivelmente foram vacinadas contra DN no incubatório. As aves de linhagem caipira comercializadas na região são vacinadas no incubatório com a cepa VG/GA.

O uso de vacina com cepas lentogênicas pode levar a atrasos no diagnóstico laboratorial, sendo identificadas acidentalmente nas amostras durante várias semanas após a administração da vacina (Van Eck *et al.*, 1991).

Os títulos elevados de anticorpos encontrados no presente estudo podem ser ainda consequência do sistema tradicional de manejo adotado, que pode levar a situações de estresse, deficiência nutricional, ausência de controle através de vacinação, favorecendo a infecção; da elevada densidade de aves na região estudada; do convívio direto das galinhas de quintal com espécies silvestres e da proximidade dos criatórios de quintal com os galpões de aves comerciais vacinadas (Tadesse *et al.*, 2005; Musa *et al.*, 2009). Pode estar, portanto associado a desafio de campo, mesmo com cepas de baixa virulência.

Por outro lado, falhas nas medidas de biossegurança frequentemente observadas na avicultura comercial, como a proximidade entre criatórios de espécies diferentes e com idade e

procedências variadas, podem promover a reciclagem de vários patógenos (Oliveira *et al.*, 2007).

De acordo com os resultados obtidos no ELISA indireto, utilizado como prova de triagem, foram enviadas ao LANAGRO - SP, para diagnóstico definitivo para DN, amostras de 16 criatórios que apresentaram pelo menos uma amostra com título superior a 5.000. O LANAGRO, dentro da sua rotina de análise, refaz a análise de sorologia por ELISA indireto e estes resultados estão demonstrados na Tab. 3.

Paralelamente ao teste de ELISA indireto, no LANAGRO, os suabes cloacais e traqueais foram submetidos ao diagnóstico definitivo através de RT-PCR em tempo real, que resultou negativo na amplificação do gene M. Este resultado foi confirmado no isolamento viral até a terceira passagem em ovos embrionados de galinhas SPF.

Tabela 3 Resultado do teste de Elisa indireto realizado no LANAGRO-SP

Município ¹	Nº de criatórios	Nº de galinhas amostradas	Resultado positivo	
			n	%
Conceição da Feira	8	82	69	84,15
Feira de Santana	4	46	36	78,26
S. G. dos Campos	4	33	30	90,91
TOTAL	16	161	135	83,85

¹Municípios de Conceição de Feira, Feira de Santana e São Gonçalo dos Campos.

A técnica de rRT-PCR, utilizada atualmente no LANAGRO - SP, desenvolvida por Wise *et al.* (2004), é utilizada para identificar o APMV 1 (ensaios do gene matriz - M) e para diferenciar a virulência (ensaio de gene de fusão - F). O primeiro identifica paramyxovírus não virulentos (cepas vacinais e lentogênicas) e virulentos (mesogênicos e velogênicos) e o segundo é utilizado para o diagnóstico molecular de amostras virulentas e altamente virulentas. Entretanto a vasta diversidade genômica do VDN aumenta a possibilidade de falhas de diagnóstico, resultando em resultado falso negativo. Segundo a OIE, para confirmar um resultado negativo é necessário a realização de isolamento viral e testes de patogenicidade em aves SPF, pois a ocorrência de incompatibilidade de primer, ou a possibilidade de uma população mista de vírus virulentos e avirulentos pode mascarar o resultado (OIE, 2012a).

Miller *et al.* (2010b) alertam para a necessidade de vigilância epidemiológica constante e caracterização proativa das estirpes circulantes para assegurar que os reagentes imunológicos e de PCR sejam eficazes na identificação de VDN em circulação no mundo.

CONCLUSÕES

A detecção de altos títulos de anticorpos anti-VDN e elevado coeficiente de variação (CV) em galinhas de quintal nos três municípios estudados sugerem a circulação de vírus vacinal ou de campo na região. Porém, como constatado por rRT-PCR e isolamento viral, as aves não estavam eliminando o vírus no momento da coleta de amostras. Estes resultados sugerem que as aves tiveram contato com o vírus vacinal ou com cepas de baixa virulência, já que as aves não manifestavam sintomatologia clínica compatível com a enfermidade.

A proximidade entre os criatórios de aves comerciais e de galinha de quintal, as falhas de manejo e deficiência na biossegurança adotadas nos dois sistemas, podem favorecer a circulação do VDN, representando um fator de risco para a avicultura na região estudada. É fundamental que os estudos de vigilância epidemiológica do VDN sejam realizados continuamente, abrangendo o monitoramento das diversas populações aviárias, tanto domésticas comerciais e de subsistência, quanto silvestres de cativeiro e de vida livre. A vigilância e caracterização do vírus circulante são importantes para a compreensão da epidemiologia do vírus na região e conseqüentemente no planejamento do controle da doença e de estratégias de vacinação tanto para a avicultura comercial quanto para os criatórios de quintal.

REFERÊNCIAS

ABDULLSATTAR, F. Newcastle disease. *Vet. Medicine Journal*, v.1, p.157-165, 2004.

ALDOUS, E.W.; ALEXANDER, D.J. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol.*, v.30, n.2, p.117-128, 2001.

ALEXANDER, D.J. Newcastle disease, other avian *Paramyxoviruses* and pneumovirus infections. In: SAIF, Y.M. (Ed.). Diseases of poultry, 11.ed. Ames: Iowa State University, 2003. p.64-87.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 182, de 08 de novembro de 1994. Aprova as Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico da Doença de Newcastle. Publicada no Diário Oficial da União de 11/11/1994, Seção 1, Página 17003.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA Nº32, de 13 de maio de 2002. Aprova as Normas Técnicas de Vigilância para a doença de Newcastle e Influenza Aviária, e de controle e erradicação para a doença de Newcastle. Publicado no Diário Oficial da União em 14 de maio de 2002, Seção 1, Página 28.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA Nº11, de 1º de setembro de 2003. Declara os plantéis avícolas industriais dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Distrito Federal livres da doença de Newcastle. Publicado no Diário Oficial da União em 05 de setembro de 2003, Seção 1, Página 3.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ofício Circular / SDA nº 7, de 24 de janeiro de 2007. Assunto: Procedimentos permanentes de vigilância para influenza aviária e doença de Newcastle.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ofício Circular / SDA nº 91, de 14 de junho de 2010. Assunto: PNSA - procedimentos permanentes de vigilância.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Norma Interna SDA nº 03, de 03 de outubro de 2011.

FAUQUET, C.M.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,124 unassigned species. *Virology*, v.2, n.64, 10p., 2005.

FERNANDES, L.M.B.; SILVA, P.S.; RAMOS, I. et al. Soroepidemiologia da doença de Newcastle em plantéis de avestruzes dos Estados da Bahia e de São Paulo. *Cienc. Rural*, v.40, n.1, p.135-140, 2010.

MILLER, P.J.; AFONSO, C.L.; SPACKMAN, E. et al. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype-10 detected in *Rockhopper Penguins* from the Falkland Islands. J. Virol., v.84, n.21, p.11496-11504, 2010a.

MILLER, P.J.; DECANINI, E.L.; AFONSO, C.L. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. Infect. Genet. Evol., v.10, p.26-35, 2010b.

MUSA, U.; ABDU, P.A.; DAFWANG, I. et al. Seroprevalence, seasonal occurrence and clinical manifestation of Newcastle disease in rural household chickens in Plateau State, Nigeria. Int. J. Poult. Sci, v.8, n.2, p.200-204, 2009.

NVSL. NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES. Real-Time RT-PCR for detection of virulent Newcastle disease virus in clinical samples, v.5, 2010.

OLIVEIRA, D.D.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; FLATSCHART, R.B. et al. Indirect ELISA for the detection of IgG specific to Newcastle disease virus in quail serum. Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec., v.59, n.5, p.1344-1347, 2007.

OIE. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SANIDADE ANIMAL. Terrestrial Animal Health Code. Paris, 21ª Ed., v.1, 2012a. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/>>. Acessado em: 18 ago. 2012.

_____. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Paris, 7ª ed., v.1, 2012b. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 23 set. 2012.

SALES, T.S.; HERVAL, E.F.G.; CÉSAR, A.E.R. et al. Títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em três diferentes sistemas de criação avícola na região de Feira de Santana - Bahia. Rev. Bras. Saúde Prod. An., v.8, n.4, p.386-393, 2007.

SOUZA, W.A. Competitividade da cadeia agroindustrial de frango de corte do Recôncavo Sul da Bahia. Bahia Análises & Dados, v.13, n.4, p.889-905, 2004.

TADESSE, S.; ASHENAFI, H.; ASCHALEW Z. Seroprevalence study of Newcastle disease in local chickens in central Ethiopia. Intern. J. Appl. Res. Vet. Med., v.3, n.1, p. 25-29, 2005.

VAN ECK, J.H.H.; VAN WILTENBURG, N.; JASPERS, D. An Ulster 2C strain-derived Newcastle disease vaccine: efficacy and excretion in maternally immune chickens. *Avian Pathol.*, v.20, n.3, p.481-495, 1991.

WISE, M.G.; SUAREZ, D.C.; SEAL, B.S. et al. Development of a Real-Time Reverse Transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical sample. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, n.1, p. 329-338, 2004.

YOSOFF, K.; TAN, W.S. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathol.*, v.30, n.5, p.439-455, 2001