

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

MARTA BRITO GUIMARÃES

**Detecção do vírus da Influenza Aviária, *Paramyxovirus* tipo 1
(vírus da Doença de Newcastle), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*
em aves silvestres e domésticas próximas às granjas avícolas
comerciais nas regiões de Mogi das Cruzes e Louveira do Estado de São Paulo**



São Paulo

2012

Marta Brito Guimarães

Detecção do vírus da Influenza Aviária, *Paramyxovirus* tipo 1 (vírus da Doença de Newcastle), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em aves silvestres e domésticas próximas às granjas avícolas comerciais nas regiões de Mogi das Cruzes e Louveira do Estado de São Paulo"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Patologia Animal

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

De acordo: _____


Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2720
FMVZ

Guimarães, Marta Brito
Detecção do vírus da Influenza Aviária *Paramyxovirus tipo 1* (vírus da Doença de Newcastle), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em aves silvestres e domésticas próximas às granjas avícolas comerciais nas regiões de Mogi das Cruzes e Louveira do Estado de São Paulo / Marta Brito Guimarães. -- 2012.
134 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Jose Piantino Ferreira.

1. Influenza aviária. 2. Doença de Newcastle. 3. *Paramyxovirus* tipo I. 4. *Mycoplasma gallisepticum*. 5. *Mycoplasma synoviae*. 6. Aves silvestres. 7. Galinha de subsistência.
I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

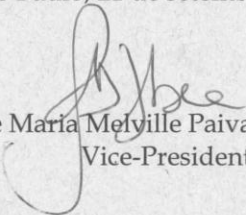
Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de vírus da Influenza aviária, Paramyxovirus tipo 1 (vírus da doença de Newcastle), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em aves silvestres de vida livre e aves domésticas de subsistência próximas às Granjas de Mogi das Cruzes e Louveira, no Estado de São Paulo ", protocolado sob o nº 1797/2009, utilizando amostras biológicas de 150 (cento e cinquenta) aves, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Detection of Influenza virus, Paramyxovirus I (Newcastle Disease) , *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in wild birds and backyard chickens around chicken farms in Mogi das Cruzes and Louveira, São Paulo state", protocol number 1797/2009, utilizing biological samples from 150 (one hundred fifty) birds, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 21 de setembro de 2012.


Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 20171-3	Data da Emissão: 02/08/2011 08:52
Dados do titular	
Nome: MARTA BRITO GUIMARÃES	CPF: 119.038.588-01
Título do Projeto: DETECÇÃO DE MYCOPLASMA GALLISEPTICUM, PARAMYXOVIRUS TIPO I (DOENÇA DE NEWCASTLE) E VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA EM AVES DE VIDA LIVRE CAPTURADAS PRÓXIMAS ÀS GRANJAS AVÍCULAS COMERCIAIS	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta de amostras biológicas de aves silvestres	07/2009	08/2010
2	coleta de amostras biológicas de aves silvestres	08/2010	08/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Antônio José Piantino Ferreira	COORDENADOR- TITULAR	020.645.148-21	-	Brasileira
2	CAMILA PELOSO BELLO	PESQUISADORA	339.693.998-07	-	Brasileira
3	Renata Ferreira Hurtado	PESQUISADORA	323.144.298-26	439268898 SSP-SP	Brasileira
4	liliane milanelo	PESQUISADORA	126.833.508-80	200379069 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	MOGI DAS CRUZES	SP	Mogi das Cruzes, São Paulo	Fora de UC
2	SALESOPOLIS	SP	Barragem Ponte Nova	Fora de UC
3	LOUVEIRA	SP	Louveira	Fora de UC

Atividades X Táxons

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 81578577



Página 1/3

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Guimarães, Marta Brito

Título: Detecção do vírus da Influenza Aviária, *Paramyxovirus* tipo 1 (vírus da Doença de Newcastle), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em aves silvestres e domésticas próximas às granjas avícolas comerciais nas regiões de Mogi das Cruzes e Louveira do Estado de São Paulo.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos pássaros que representam Deus e a liberdade...
Liberdade que nos permite voar, criar, mudar e decidir sem medo os caminhos da vida.

À minha família, que sem ela nada seria possível.



AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram deste trabalho direta ou indiretamente e que puderam contribuir para que esse desafio fosse realizado da melhor forma possível.

Ao meu orientador Prof. Antonio J. P. Ferreira pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao Departamento de Patologia e ao Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ.

Aos responsáveis pelas granjas de reprodução, postura e corte de Mogi das Cruzes e Louveira (Emília, Alfredo e Renato).

Aos proprietários das aves de fundo de quintal: Miguel, Renato, Gerardo e Terezinha.

A toda equipe da biblioteca pela dedicação e trabalho surpreendentes.

À WCS - Wildlife Conservation Society, patrocinadora do projeto.

ALLEGRETTI, L. A verdade e a alegria sobre tudo.

BELLO, C.P. O humor na hora certa.

CORRAL, L.R. Paciência e amizade acima de tudo.

CUNHA, M.P.; AZEVEDO, N, P.; DAVIES, Y. O apoio, a ajuda, a amizade e a confiança.

FARIA, M.; ZANETTI, D. O riso e a conversa, essenciais para a sobrevivência humana.

FERREIRA, C. A. S. Persistência e organização. O que um pós-graduando deve ter.

GUIMARÃES, Ms.Bs. Todos com a genética do amor.

HURTADO, R. F. Talvez nem o céu seja o limite.

KNÖBL, T. Persistência e compreensão. A conquista do sucesso.

MENÃO, M.C. Paciência com ensino. Essencial para um excelente mestre.

METTIFOGO, E. Pesquisa e técnica. Dicas que não estão nas publicações

MILANELO, L.; FITORRA, L. S. A união faz a força.

MORAES, M.E. Fé, onde quer que ela esteja.

NARANJO, L.; SANTADER, S. Perseverança e dedicação, a essência desta dupla.

REVOLLEDO, L. Ajuda e amizade.

RODRIGUES, L. Sempre presente na minha vida. Minha admiração pelo seu trabalho.

SANCHES, L. A paz na alma de uma mulher. A ajuda sem fim.

SILVA, L. R. Sempre presente na minha vida. Minha admiração pelo seu trabalho.

SINHORINI, J.A.; SINHORINI, I e S. A força da alma iluminada, transforma o corpo.

TIMENESKY, J. ; SELMA. A doação sem intenção.

VANTRELLS, R. Sua inteligência e o meu respeito por ela.

et al. – muitas vezes são os que mais nos ajudam e nem mesmo sabemos. São todos aqueles que me dizem bom dia, dão um sorriso ou apenas trocam um olhar de carinho. Obrigada!!

RESUMO

GUIMARÃES, M. B. **Detecção do vírus da Influenza aviária, *Paramyxovirus* tipo 1 (vírus da Doença de Newcastle), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, em aves silvestres e domésticas próximas às granjas avícolas comerciais nas regiões de Mogi das Cruzes e Louveira, no Estado de São Paulo.** [Detection of Influenzavirus, *Paramyxovirus* I, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in free-ranging birds and backyard chicken around poultry farms in Mogi das Cruzes and Louveira, São Paulo state]. 2012. 134 f Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Objetivou-se, neste trabalho, detectar o vírus da Influenza aviária, *Paramyxovirus* tipo 1 (doença de Newcastle), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, respectivamente pelas técnicas de RT-PCR e PCR, em aves domésticas e aves em vida livre próximas às granjas avícolas nas cidades de Mogi das Cruzes e Louveira do Estado de São Paulo. As aves silvestres foram capturadas, anilhadas, submetidas à avaliação de estado geral e à coleta de suabes de orofaringe e cloaca. As aves de subsistência ou “fundo de quintal” seguiram o mesmo protocolo com a exceção do anilhamento, e tiveram amostras de sangue coletadas para a pesquisa de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* pela técnica de ELISA indireto. Foram considerados os aspectos da biodiversidade entre as espécies silvestres capturadas e a biossegurança nas granjas. As aves silvestres apresentaram resultados negativos nesta pesquisa, no entanto, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* foram detectados pela técnica da PCR nas aves de subsistência, assim como apresentaram títulos de anticorpos para os agentes acima citados e para o *Paramyxovirus* tipo I. Duas granjas não possuíam medidas de biosseguridade adequadas permitindo o contato de animais de vida livre com as aves de “fundo de quintal” e com as aves de produção, o que pode facilitar a disseminação de patógenos de interesse para a saúde pública e para a avicultura comercial.

Palavras-chave: Influenza Aviária. Doença de Newcastle. *Mycoplasma gallisepticum*. *Mycoplasma synoviae*. Aves Silvestres. Galinhas de Subsistência.

ABSTRACT

GUIMARÃES, M. B. **Detection of Influenzavirus, *Paramyxovirus I*, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in free-ranging birds and backyard chicken around poultry farms in Mogi das Cruzes and Louveira, São Paulo state.** [Detecção do vírus da Influenza aviária, *Paramyxovirus* tipo 1 (vírus da Doença de Newcastle), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, em aves silvestres e domésticas próximas às granjas avícolas comerciais nas regiões de Mogi das Cruzes e Louveira, no Estado de São Paulo]. 2012. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The aim of this study is to detect avian influenza virus, Newcastle disease virus (*Paramyxovirus I*), *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in backyard chicken and wildlife birds around commercial poultry farms using RT-PCR and PCR. The birds were captured with mist nets, identified with aluminium leg rings, subjected to the assessment of clinical conditions and samples were collected by oral and cloacal swabs. The same was done with backyard chicken without the identification with leg rings. Blood samples were collected from backyard chicken and tested for antibodies against *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Paramyxovirus I* by indirect ELISA test. This study was conducted in Mogi das Cruzes and Louveira, São Paulo state, where the commercial poultry is considered an activity of great importance. The results were negative to wild birds, but we could detect *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by PCR and antibodies titles for *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and Newcastle disease in backyard chickens. Two farms didn't have appropriate biosecurity measures, allowing intense contact with free-living birds, backyard chicken and poultry facilitating spread of pathogens with concern to human health and poultry farms.

Keywords: Bird Influenza. *Mycoplasma gallisepticum*. *Mycoplasma synoviae*. Wild Birds. Backyard Poultry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 -	Mapa do Estado de São Paulo, destacando os municípios onde foram realizadas as coletas a campo.....	53
Figura 2 -	Mapa com a distribuição das áreas de coleta com G1, G2 e G3 representando as localizações das granjas em amarelo, e GS1, GS2, GS3 e GS4 representando as localizações das criações das aves de subsistência em vermelho e a Barragem Ponte Nova em branco.....	53
Figura 3 -	Distribuição dos galpões das granjas: a = G2, b = G3, c = G1.....	54
Figura 4 -	Rede de neblina colocada em frente aos arbustos.....	55
Figura 5 -	Rede de neblina colocada próxima ao galpão na granja de postura.....	56
Figura 6 -	Pássaros silvestres nos galpões.....	57
Figura 7 -	Galpão de aves para corte.....	58
Figura 8 -	Pássaros sobre os comedouros da granja.....	58
Figura 9 -	Vista da Barragem Ponte Nova.....	59
Figura 10 -	Galpão de aves de subsistência GS1.....	61
Figura 11 -	Galinheiro com diversas raças de aves na criação GS2.....	62
Figura 12 -	Área aberta com arbustos e vegetação abundante na criação de aves GS3.....	63
Figura 13 -	Galinheiro da criação de aves GS4.....	64
Figura 14 -	<i>Columbina talpacoti</i> capturada em rede de neblina.....	65
Figura 15 -	Contenção manual e identificação da espécie.....	68
Figura 16 -	Observação de ectoparasitas e anilhamento.....	68
Figura 17 -	Biometria e coleta de suabe de orofaringe.....	68
Figura 18 -	Famílias de aves capturadas nas granjas e BPN.....	83
Figura 19 -	Comparação das concentrações séricas de IgG em logaritmo natural (ln) contra a doença de Newcastle nas aves de subsistência.....	96
Figura 20 -	Comparação das concentrações séricas de IgG em logaritmo natural (ln) contra a <i>Mycoplasma gallisepticum</i> nas aves de subsistência.....	96
Figura 21 -	Comparação das concentrações séricas de IgG em logaritmo natural (ln) contra a <i>Mycoplasma synoviae</i> nas aves de subsistência.....	97

Figura 22 - Média da concentração de anticorpos para DNC (ln) nas aves das diferentes criações estudadas.....	97
Figura 23 - Média da concentração de anticorpos para Mg (ln) nas aves das diferentes criações estudadas.....	98
Figura 24 - Média da concentração de anticorpos para Ms (ln) nas aves das diferentes criações estudadas.....	98
Figura 25- Eletroforese das amostras positivas para Mg e Ms.....	100

QUADROS

Quadro 1 - Segmentos de genes do vírus da influenza A, com as proteínas e suas funções.....	30
Quadro 2 - Características e exames diagnósticos das doenças pesquisadas.....	47
Quadro 3 - Valores positivos para <i>Paramyxovirus</i> tipo I, Mg e Ms preconizados pelo <i>Kit</i> IDDEX®..	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição do Meio Frey	67
Tabela 2	Sequência dos iniciadores, acesso ao <i>GenBank</i> e condições de reação PCR ou RT-PCR dos agentes estudados.....	74
Tabela 3	Diferenças de produção, biosseguridade, estação do ano e plantel das granjas.....	78
Tabela 4	A riqueza de espécies capturadas, a abundância aparente e o índice de diversidade Shannon de aves capturadas nas granjas e na BPN.....	81
Tabela 5	Presença de <i>Zonotrichia capensis</i> em relação às demais espécies capturadas nos locais estudados.....	84
Tabela 6	Presença de <i>Passer domesticus</i> em relação às demais espécies capturadas nos locais estudados.....	84
Tabela 7	Condição corporal, idade e presença de ácaros nas aves silvestres capturadas na granja G1.....	86
Tabela 8	Condição corporal, idade e presença de ácaros nas aves silvestres capturadas na granja G2.....	87
Tabela 9	Condição corporal, idade e presença de ácaros nas aves silvestres capturadas na granja G3.....	89
Tabela 10	Número total de indivíduos, abundância aparente, porcentagem de jovens, porcentagem de aves em condição corporal regular ou ruim e porcentagem de aves com ácaros de penas nas três espécies dominantes nas granjas estudadas.....	90
Tabela 11	Títulos de IgG sérica encontrados na reação de ELISA nas aves da criação GS1.....	92
Tabela 12	Títulos de IgG sérica encontrados na reação de ELISA nas aves da criação GS2.....	93
Tabela 13	Títulos de IgG sérica encontrados na reação de ELISA nas aves da criação GS3.....	94
Tabela 14	Títulos de IgG sérica encontrados na reação de ELISA nas aves da criação GS4.....	94
Tabela 15	Títulos de anticorpos séricos através de ELISA para Newcastle, <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i> (In).....	95
Tabela 16	Comparação dos resultados da PCR para Mg nas criações de subsistência.....	99
Tabela 17	Comparação dos resultados da PCR para Ms nas criações de subsistência.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEF	Associação Brasileira de Exportadores e Produtores de Frango
AVIPA	Avicultura Integral e Patologia Animal
BPN	Barragem Ponte Nova
DAEE	Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNC	Doença de Newcastle
CDC	Doença Respiratória Crônica
C.V.	Coefficiente de Variação
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAO	Food and Agriculture Organization
G	Granja
GS	Galinha de Subsistência
HA	Hemaglutinina
HI	Inibição da Hemaglutinação
IA	Influenza Aviária
IAAP	Influenza Aviária Altamente Patogênica
IABP	Influenza Aviária de Baixa Patogenicidade
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
IPI	Índice de Patogenicidade Intracerebral
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
Ms	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NA	Neuraminidase
NP	Nucleoproteína
NC	Newcastle
OIE	Organização Internacional de Epizootias
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNP	Complexo composto por RNA e NP
SAR	Soroaglutinação Rápida
VI	Vírus da Influenza
VIA	Vírus da Influenza Aviária
VDN	Vírus da Doença de Newcastle
UBABEF	União Brasileira de Avicultura e Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	INFLUENZA AVIÁRIA	27
2.1.1	Histórico	27
2.1.2	Características do Vírus	28
2.1.3	Replicação viral	30
2.1.4	Características da doença	31
2.2	DOENÇA DE NEWCASTLE	33
2.2.1	Histórico	33
2.2.2	Características do vírus	34
2.2.3	Características da Doença	35
2.3	MYCOPLASMA GALLISEPTICUM E MYCOPLASMA SYNOVIAE	38
2.3.1	Histórico	38
2.3.2	Características do Micoplasma	40
2.3.3	Características da doença	41
2.4	EXAMES LABORATORIAIS.....	43
2.4.1	Exames sorológicos	43
2.4.1.1	Soroaglutinação rápida em placa (SAR).....	44
2.4.1.2	Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI).....	45
2.4.1.3	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	46
2.4.2	Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	47
3	OBJETIVOS	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1	ÁREA DE ESTUDO	52
4.2	CARACTERÍSTICAS DAS GRANJAS E DA BARRAGEM PONTE NOVA.....	54
4.2.1	Granja de reprodução (G1)	54
4.2.2	Granja de Postura (G2)	55
4.2.3	Granja de Corte (G3)	57
4.2.4	Barragem Ponte Nova	58
4.3	CARACTERÍSTICAS DAS CRIAÇÕES DE SUBSISTÊNCIA.....	60

4.4	CAPTURA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE AVES SILVESTRES	64
4.5	AVALIAÇÃO CLÍNICA E COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	65
4.6	COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE AVES DE SUBSISTÊNCIA	69
4.7	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA OS TESTES MOLECULARES	69
4.7.1	Extração de DNA	70
4.7.2	Primers utilizados na Amplificação de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i>	70
4.7.3	Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	70
4.7.4	Extração de RNA utilizando o método de TRIZOL/BRAZOL	71
4.7.5	Primers utilizados na amplificação dos vírus RNA	72
4.7.6	Técnica da Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)	72
4.7.7	Eletroforese	73
4.7.8	Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) para VNC, Mg e Ms	75
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	75
4.8.1	Análise estatística com os dados obtidos das aves silvestres	76
4.8.2	Análise estatística com os dados obtidos das aves de subsistência	76
5	RESULTADOS	77
5.1	PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES DE AVES SILVESTRES CAPTURADAS	78
5.2	IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	79
5.2.1	Comparação das frequências de espécies mais prevalentes entre as granjas e BPN	84
5.3	AVALIAÇÃO DAS AVES SILVESTRES	85
5.4	PCR E RT-PCR EM AMOSTRAS DE AVES SILVESTRES	91
5.5	PESQUISA DE TÍTULO DE ANTICORPOS EM AVES DE SUBSISTÊNCIA	91
5.6	PCR E RT-PCR EM AMOSTRAS DE AVES DE SUBSISTÊNCIA	99
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÃO	116
	REFERÊNCIAS	118
	APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	133
	APÊNDICE B - FICHA DE CAMPO UTILIZADA PARA AS AVES SILVESTRES	134



1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira ocupa o primeiro lugar como país exportador e mantém a terceira posição na produção mundial de aves (ABEF, 2008). O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) normatiza o controle sanitário do plantel avícola em relação às doenças de interesse comercial. Os investimentos realizados decorrem principalmente da prevenção e controle de doenças de importância mundial, como a Influenza Aviária, a Doença de Newcastle e a Micoplasmose (BRASIL, 2009).

A Influenza Aviária (IA) é uma doença sistêmica que pode ser altamente letal. As mortes de seres humanos e de centenas de milhões de aves ocorreram pelo mundo, e resultaram em enormes prejuízos para a atividade avícola (LIPATOV et al., 2004; GIMENO, 2009). Os sintomas nas aves variaram de acordo com a virulência do agente. Dessa forma, a doença recebeu a denominação de Influenza Aviária de Alta Patogenicidade para a forma mais virulenta do vírus e Influenza Aviária de Baixa Patogenicidade para a forma menos severa deste (COX; SUBBARAO, 1999).

A Influenza aviária (IA) faz parte da lista de doenças notificáveis pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) que determina os padrões de saúde e sanitários para as doenças de animais (SWAYNE; HALVORSON, 2008).

Os enormes prejuízos econômicos decorrem da dependência do subtipo do vírus, da espécie de ave infectada, do número de estabelecimentos atingidos, dos métodos de controle utilizados e da velocidade de execução de ações de controle e erradicação. Essas perdas estão relacionadas às ações de sacrifício e destruição de aves, custos das atividades de quarentena, vigilância e mercados consumidores (SWAYNE; HALVORSON, 2008).

O vírus da Influenza A pertencente à família Orthomyxoviridae, apresenta maior ocorrência em aves aquáticas, capacidade de mutação genética e adaptação a outras espécies de hospedeiros como a população humana e espécies animais. A contaminação pode ocorrer pelo contato direto, indireto, aerossóis e exposição de fômites contaminados com o vírus (WEBBY; WEBSTER, 2003; SWAYNE; HALVORSON, 2008).

Apesar do Brasil não ter ocorrência de surtos da doença, estudo mostrou que o vírus está presente em aves silvestres (KAWAMOTO et al., 2005).

A Doença de Newcastle (DNC) é considerada uma das maiores causas de perdas econômicas da avicultura mundial e apresenta distribuição global (ALEXANDER, 2001). É uma enfermidade causada pelo *Paramyxovirus* tipo I, pertencente ao gênero *Avulavirus* e à

família Paramyxoviridae (LEIGHTON; HECKERT, 2007; PAULILLO; JÚNIOR, 2009). Diferentes graus de severidade da doença podem ocorrer dependendo da virulência da cepa viral, ou seja, desde uma infecção subclínica, onde os sintomas são inaparentes ou discretos, até uma doença fatal (ZANETTI et al., 2005).

A infecção pode ocorrer através da inalação ou ingestão de partículas virais presentes no ar, fezes, carcaça e fômites contaminados. O vírus já foi encontrado em aproximadamente 250 espécies de aves silvestres e de produção (LEIGHTON; HECKERT, 2007), porém, no Brasil, poucos estudos foram desenvolvidos em aves silvestres (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2003; SILVA et al., 2006).

A Micoplasmose é uma infecção causada por bactérias do gênero *Mycoplasma*, da família Mycoplasmateaceae e ordem Mollicutes. São bactérias procariotas, sem parede celular e são capazes de sobreviver no ambiente de um (01) a três (03) dias. Os micoplasmas têm predileção pelas membranas mucosas e serosas das aves, e provocam comprometimentos respiratórios, articulares e urogenitais. As lesões causadas nas aves de produção reduzem o ganho de peso, aumentam as condenações de carcaças, diminuem a produção de ovos, e ocorre aumento nos gastos com medicamentos, o que torna a doença uma das mais onerosas da avicultura comercial mundial (NASCIMENTO, 2000; BACK, 2002).

Em 1994, *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) emergiu como agente causador de doença em pássaros silvestres da espécie *Carpodacus mexicanus*, no leste dos Estados Unidos, e posteriormente foi diagnosticada na espécie *Carduelis tristis* (LUTRELL et al., 1998). A doença nessa espécie se caracterizou principalmente por conjuntivite, secreção nasal e debilidade. Os estudos mimetizando as condições em vida livre mostraram que a baixa densidade de pássaros em uma determinada área, diminuía a frequência de interação entre as espécies, ocasionando menor estresse e menos propensão à reinfecção (DHONDT et al., 2012).

Mycoplasma gallisepticum (Mg) e *Mycoplasma synoviae* (Ms) foram isolados e detectados em uma grande diversidade de espécies, o que pode representar um risco de transmissão deste patógeno para as aves de produção comercial (LIERZ et al., 2008).

Os testes sorológicos para a detecção de anticorpos nas criações de frangos de corte, galinhas de postura e aves reprodutoras, devem ser um instrumento para o controle de micoplasmas na avicultura industrial, pois uma vez que este seja introduzido na granja requer, na maioria das vezes, a desocupação do ambiente para o sucesso da erradicação do agente (CARDOSO et al., 2006).

Programas de prevenção e controle devem incluir monitoria periódica (sorologia, cultura, isolamento e identificação) e vacinação, além de medidas de biossegurança (LEY, 2003).

Influenza aviária (IA), vírus da Doença de Newcastle (VDN), *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) e *Mycoplasma synoviae* (Ms) são patógenos economicamente significativos para o PNSA, no Brasil e os pássaros silvestres podem ser um dos principais disseminadores dessas doenças para as aves de produção.

Este estudo tem como objetivo contribuir com a investigação desses agentes em aves silvestres capturadas em áreas ao redor de granjas avícolas em Mogi das Cruzes e Louveira e na área da Barragem Ponte Nova. Assim como, nas aves domésticas de subsistência de criações da região de Mogi das Cruzes para que medidas de controle e prevenção possam ser adotadas para garantir a saúde pública e a economia da indústria avícola no país.



2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil abrange uma área de 8.512.000 Km² que ocupa 47,3% da superfície da América do Sul, sendo considerado o quinto país no globo terrestre em extensão territorial (SICK, 1997). Possui uma das maiores bacias hidrográficas e florestas do mundo, atingindo uma enorme multiplicidade de biomas particulares (SIGRIST, 2006). Dentre eles, a Mata Atlântica que ocorre sob a forma de uma faixa de transição de amplitude variável, cujos limites geográficos entre este e os biomas vizinhos, como o Cerrado e a Caatinga, foram estabelecidos em 1993, pelo Decreto Federal n° 750/93 (BENCKE; MAURICIO, 2006).

A Mata Atlântica é considerada a segunda maior floresta da América do Sul, se destacando pela biodiversidade e alto endemismo. Porém, atualmente, somente 7,5% desta floresta permanece pouco degradada, sendo considerada o bioma mais susceptível do país (MYERS, 2000; SOS MATA ATLÂNTICA, 2012).

As questões ambientais se intensificaram nos últimos anos, com ênfase na integração dos efeitos da destruição de florestas e a volatilidade do clima, os quais podem oferecer condições para o aparecimento de doenças emergentes. A identificação dos problemas relacionados à destruição do meio ambiente no Brasil, data do fim do século XVIII. No entanto, apenas em 1937 houve a criação da primeira unidade de conservação pública (EPSTEIN, 2002; GOERCKE, 2006).

Um dos maiores desafios para a conservação da Mata Atlântica têm sido a degradação e a fragmentação de áreas. Em consequência houve a destruição do habitat tanto pela ocupação humana, quanto pela agricultura e pecuária, incluindo a produção avícola (DEEM; KARESH; WEISMAN, 2001). A exploração deste ambiente, compromete a riqueza da biodiversidade das 1.020 espécies de aves, das quais 188 são endêmicas desta região (SOS MATA ATLÂNTICA, 2012).

As aves são indicadores de biodiversidade e foram usadas de maneira eficaz na avaliação da conservação de áreas, assim como na identificação de grandes centros de endemismo terrestre (WEGE; GOERCKE, 2006).

Dentro da Classe Aves, a ordem Passeriformes é uma das mais numerosas e diversificadas em espécies e ocupam uma grande variedade de nichos ambientais pelo mundo (PERKINS; SWAYNE, 2003). Compreende 5.739 espécies ou 59,1% das espécies de aves descritas que se distribuem em 45 famílias (SICK, 1997). No Brasil, a diversidade da avifauna é composta por aproximadamente 1.832 espécies (CBRO, 2011).

Dentro desta ordem, encontram-se algumas espécies sinantrópicas que são consideradas excelentes exploradoras de meios urbanos com baixa diversidade de espécies (MACGREGOR et al., 2010).

No Brasil, o reforço populacional de aves silvestres em diversos biomas tem sido realizado com a soltura de animais apreendidos pelo tráfico. Desde 2008, foi criada a Instrução Normativa nº179 de 25 de junho de 2008 que normatiza o controle sanitário e a realização de exames laboratoriais de doenças que acometem, principalmente, as aves de produção (IBAMA, 2012). As solturas são realizadas em áreas previamente cadastradas pelo IBAMA e podem estar localizadas em regiões de produção avícola.

A avicultura é um dos recursos alimentares mais desenvolvidos do mundo, sendo considerada uma importante fonte de proteína animal. No ano de 1995, o consumo mundial foi de 54,9 milhões de toneladas e no ano de 2000 foi de 65,6 milhões de toneladas, ou seja, um aumento de 10,7 milhões de toneladas neste período. Em 2000, particularmente as Américas (América do Sul, Central e Norte) foram responsáveis pelo consumo de 28,6 milhões de toneladas, representando 44% da produção mundial (GIMENO, 2009).

O consumo de aves é favorecido pelos preços competitivos em relação aos outros tipos de carne (bovina e suína) e a preferência do consumidor pela carne branca como fonte de proteína animal. O consumo de carne de frango e ovos aumentou nos últimos anos quando comparado ao consumo de qualquer outra fonte de proteína animal (FAO, 2012).

O Brasil é classificado mundialmente como o maior exportador de carne de frango e o terceiro maior produtor avícola (ABEF, 2008). Segundo a UBABEF (União Brasileira de Avicultura e Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos) a produção de carne de frango atingiu 12,230 milhões de toneladas em 2010. Houve um crescimento de 11,38% em relação a 2009, aproximando-se da China, considerado o segundo maior produtor mundial (ABEF, 2008a).

Estima-se que 48,1% das exportações mundiais até 2020, terão origem nacional (MAPA, 2011). Quanto à produção de ovos, no 1º trimestre de 2012 foram produzidas 671.176 milhões de dúzias de ovos de galinha. Este valor representa um aumento de 8,2% e de 1,4%, respectivamente, em relação ao 1º trimestre e ao 4º trimestre de 2011. São Paulo foi o Estado com a maior produção de ovos de galinha, representando 29,3% do total nacional (IBGE, 2012a).

Programas governamentais brasileiros foram criados para prevenir a saúde da população humana e avícola. Assim como, garantir a segurança sanitária do comércio internacional (GIMENO, 2009). Segundo as Portarias nº193 de 19 de setembro de 1994 e o

Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) tem como objetivo orientar o controle do estado sanitário das aves de produção. Em 2006, foi aprovada a Instrução Normativa nº17 que instituiu o Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle, cuja notificação é obrigatória (BRASIL, 2009).

Por outro lado, aparte ao desenvolvimento da indústria avícola, ocorre a exploração extensiva de aves de fundo de quintal em função da predominância de alguns fatores sociais como a mudança no consumo de alimentos e no investimento econômico. É fato que a produção de aves de subsistência não apresenta fiscalização ou acompanhamento governamental e desta forma, os registros destas criações são desconhecidos (BUCHALA et al., 2006a; GIMENO, 2009).

As aves de fundo de quintal são criações adotadas como práticas que podem apresentar diversas finalidades como: exposição, *hobby* e companhia até para o consumo e venda local de carne e ovos (SMITH et al., 2012; HAMILTON-WEST et al., 2012).

No Chile, após a avaliação dos proprietários dessas criações através de questionários constatou-se que o perfil desses indivíduos era de pessoas que mantinham as aves como tradição familiar (HAMILTON-WEST et al., 2012).

Esses animais são expostos a uma grande variedade de infecções concomitantes ou não, causadas por vírus, bactérias ou parasitas. A infecção por parasitas ocorre nas aves mais debilitadas, tornando-as susceptíveis às outras infecções (AWAN; OTTE; JAMES, 1994; HERNANDEZ-DIVERS et al., 2006).

O aumento da densidade de criações de aves em proximidades com as populações humanas podem favorecer o risco de transmissão de doenças entre as populações de aves e das aves para os seres humanos (XAVIER et al., 2011; SMITH et al., 2012).

Os mercados de aves vivas se encontram em várias partes do mundo e servem de alimento para as populações locais, as quais muitas vezes preferem o consumo de carne fresca. As aves podem se tornar fontes de infecção de diversos agentes, principalmente IA, pois as aves saudáveis ou doentes podem desempenhar o papel de carreadoras deste agente (VAN DEN BERG, 2009).

Nos Estados Unidos, desde 1986 esses mercados foram reconhecidos como importantes reservatórios do vírus da Influenza. Neste ano foi encontrado o mesmo subtipo do vírus de baixa patogenicidade (H5N2) tanto em aves comerciais como nas aves encontradas nos mercados do nordeste dos EUA (SENNE et al., 2003; SENNE, 2007).

Na Ásia, os mercados de aves vivas foram fontes do vírus da Influenza Aviária de Alta Patogenicidade (IAPP) H5N1 com a transmissão para 18 pessoas e a morte de seis delas (SIMS, 2007; SELWOOD, 2010). A interação de aves de diferentes idades e espécies, por exemplo, frangos com aves aquáticas, é uma prática comum na maioria dos países do sul da África, o que facilita a disseminação do vírus. Dessa forma, esses mercados possibilitam a proximidade de aves domésticas e selvagens em cativeiro, aumentando o risco de infecção cruzada (VAN DEN BERG, 2009).

Na Ásia e África foram identificadas cepas lentogênicas, mesogênicas e velogênicas do vírus da Doença de Newcastle (VDN) em aves de subsistência, assim como a presença do vírus da influenza H5N1 (ALEXANDER, 1988; VAN DEN BERG, 2009).

Em Chancay, no Peru, as aves mortas foram utilizadas como alimento para suínos em 15% das granjas pesquisadas e revelou ser este um potencial mecanismo para a adaptação do vírus da influenza a outra espécie (MCCUNE et al., 2012).

No estudo de Soos, et al. (2008), as galinhas de subsistência apresentavam idades diferentes e as medidas de biossegurança raramente eram empregadas nas criações.

A falta de divulgação aliada à movimentação humana entre as criações de aves de subsistência e as aves de produção, propicia a transmissão de doenças relevantes como a Influenza aviária para as aves comerciais (BURNS et al., 2011).

No Brasil, a atual legislação sobre o controle sanitário de aves domésticas de subsistência ou de “fundo de quintal” ainda está em desenvolvimento pelos órgãos competentes de Defesa Sanitária Animal, cujo programa de saúde animal deveria ser capaz de garantir e assegurar a exploração avícola em escala industrial. Buchala et al. (2006a) citaram que deve ser prioritária a preservação dos plantéis de multiplicação genética, e que estes devem estar livres dos patógenos responsáveis por enfermidades que representem importância para a saúde humana e animal.

Na lista de doenças de notificação obrigatória preparada pela Organização Mundial da Saúde Animal se encontram a Influenza Aviária, a doença de Newcastle (*Paramyxovirus tipo I*), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* (OIE, 2012a). O estudo destas doenças aviárias é de grande importância, pois podem acometer aves silvestres, aves domésticas de subsistência e de produção, com vasto interesse para a saúde pública e a economia avícola mundial.

2.1 INFLUENZA AVIÁRIA

2.1.1 Histórico

Na história da humanidade existem relatos de diversas pandemias, cujas descrições sugerem o vírus da influenza como agente da infecção. Em 412 a. C., Hipócrates descreveu a ocorrência de uma “epidemia de febre”, rapidamente disseminada, com surtos de doença respiratória febril e alta taxa de mortalidade (SELLWOOD, 2010). No século XX, as pandemias de 1918, 1957 e 1968 afetaram a população humana levando à morte mais de 40 milhões de pessoas (ALEXANDER; BROWN, 2000; MORAES; SALLE; CARON, 2009; SELLWOOD, 2010). No Brasil, o surto ocorreu no início da primavera e coincidiu com a segunda onda global da pandemia em outubro de 1918 (SELLWOOD, 2010).

A influenza Aviária também conhecida como peste aviária foi descoberta em 1878 por Edoardo Perroncito, na Itália e foi uma das primeiras doenças descritas apresentando um agente etiológico ultra filtrável (ALEXANDER, 2009).

As aves pertencentes as ordens Anseriformes e Charadriiformes são consideradas potenciais reservatórios e participam da perpetuação do vírus da IA na natureza (LEBARBENCHON et al., 2010; VERHAGEN et al., 2012).

Nas aves silvestres, o primeiro isolamento do vírus da influenza ocorreu em 1961, proveniente de andorinhas do mar (*Sterna hirundo*), na África do Sul (BECKER, 1996).

No Brasil, o vírus da Influenza aviária foi isolado pela primeira vez em 1980, de fezes de irerês (*Dendrocygna viduata*) e de aves exóticas no Estado do Rio de Janeiro (SALCEDO, 1980).

As aves silvestres apresentam diferenças de sintomatologia e prevalência de mortalidade dependendo da espécie envolvida e do subtipo do agente encontrado.

Em 2005, mais de 600 aves aquáticas de vida livre morreram infectadas com o vírus IAAP H5N1 no lago da reserva natural de Qinghai, na China. Este vírus foi isolado, em 2006, de dois (02) casos fatais em humanos, na Turquia (SELLWOOD, 2010).

Em pássaros *Acrocephalus arundinaceus* e *Turdus pallidus* foram observadas diferenças de manifestações clínicas após a inoculação do vírus da influenza H5N1. Este ocasionou a mortalidade de 100% das aves da primeira espécie e sobrevivência da segunda por mais de oito (08) dias, com eliminação contínua do vírus. Desta forma, compreendeu-se

que as aves apresentavam respostas diferentes frente aos desafios com o vírus da IA (FUJIMOTO et al., 2010).

Os estudos filogenéticos com o vírus da influenza aviária estabeleceram uma correlação entre o vírus encontrado em galinhas e pássaros. A identificação das cepas A/Chicken/Vic/1/85 (H7N7) e A/Starling/Vic/5156/85 (H7N7) demonstraram uma proximidade na sequência genética que ocasionou alta mortalidade das aves envolvidas na doença (NESTOROWICZ et al., 1987).

No sul da França, o vírus da IA não foi detectado em amostras de 713 aves capturadas no inverno e 237 aves capturadas na primavera pertencentes à ordem Passeriformes mesmo coabitando o ambiente das aves aquáticas (LEBARBENCHON et al., 2010).

Fuller et al. (2010) consideraram que a vigilância sobre os pássaros deveria ser maior em relação às epizootias, pela capacidade dessas aves exercerem o papel de carreadoras na transmissão dos vírus dentro da cadeia epidemiológica da Influenza Aviária, assumindo a mesma importância que aves aquáticas e domésticas.

Atualmente, cinquenta e um países relataram casos de IAAP (influenza aviária altamente patogênica) H5N1 em aves domésticas ou de vida livre, entre 2003 e 2012. No final de novembro de 2011 houve 596 casos em humanos com 334 relatos de morte humana pelo vírus de alta patogenicidade H5N1(OIE, 2012b).

2.1.2 Características do Vírus

A Influenza aviária (IA) é causada pelo vírus da influenza do tipo A, pertencente à família Orthomyxoviridae (MORAES, 2009), que apresenta genoma segmentado, de senso negativo e fita única de RNA. Existem cinco gêneros desta família: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, também denominados influenza tipos A, B e C, *Thogotovirus* e *Isavirus*. Somente os vírus do gênero *Influenzavirus A* infectam as aves (ALEXANDER, 2007; HAAHEIM, 2010).

Os vírus influenza tipo A foram divididos em subtipos de acordo com as relações antigênicas das glicoproteínas de superfície, definidas como hemaglutininas (HA) e neuraminidases (NA). Existem 16 subtipos de HA (H1 a H16) e nove subtipos de NA (N1 a N9), sendo que o vírus apresenta a combinação de um antígeno HA e um antígeno NA. Todos

os subtipos do vírus influenza A foram isolados de espécies aviárias aquáticas. (ALEXANDER, 2007; SELLWOOD, 2010; HAAHEIM, 2010).

Os vírus da Influenza Aviária Altamente Patogênica (IAAP) foram caracterizados pelos subtipos H5 e H7. No entanto, nem todos os vírus com estes subtipos são classificados como vírus altamente patogênicos, podendo ser considerados como vírus da Influenza Aviária de Baixa Patogenicidade (IABP) (ALEXANDER, 2007). Se uma única célula animal for infectada simultaneamente com dois subtipos diferentes de vírus, poderão emergir novas combinações de proteínas HA e NA (STALKNECHT et al., 2007).

Os rearranjos do vírus da Influenza são comuns em populações de vida livre. Estes representam um mecanismo em potencial para a inserção de genes de subtipos de vírus de IA (incluindo novos subtipos de HA) dentro dos vírus da influenza existentes em animais ou humanos. Esse processo de rearranjo não apresenta possibilidade de correção pelas polimerases celulares e é denominado de “shift” antigênico.

Além disso, o vírus da Influenza é susceptível às mutações genéticas espontâneas que podem ocorrer nas sequências das proteínas HA e NA. Estas mutações podem alterar a antigenicidade dessas proteínas de superfície, cujo processo é denominado de “drift” antigênico (STALKNECHT, et al., 2007; MORAES, 2009).

Os virions da Influenza geralmente são esféricos ou pleomórficos, podendo ocorrer como formas filamentosas. Apresentam entre 80 e 120 nm de diâmetro e envelopes que são derivados dos lipídios da membrana plasmática da célula hospedeira (SWAYNE; HALVORSON, 2008). Possuem nucleocapsídeo segmentado com simetria helicoidal e podem ter tamanhos que variam entre 30 e 120 nm de comprimento (NODA et al., 2006). O genoma tem oito (08) segmentos separados que codificam 10 proteínas, das quais oito são estruturais (quadro 1). O comprimento destes segmentos podem variar entre 874 e 2.396 nucleotídeos e o tamanho do genoma pode diversificar entre 10 e 14,5 Kb (STALKNECHT et al., 2007; HAAHEIM, 2010).

Quadro 1 - Segmentos de genes do vírus da influenza A com as proteínas e suas funções.

Segmento	Proteína	Função
1	PB2	Complexo polimerase. Replicação viral
2	PB1(-F2)	
3	PA	
4	HA	Hemaglutinina. Proteína de superfície glicosilada. Inicia a infecção pela ligação aos receptores celulares. Antigenicamente altamente variável. Existem 16 subtipos.
5	NP	Nucleoproteína que encapsula os segmentos de RNA. O complexo RNA-NP é denominado RNP
6	NA	Neuraminidase. Proteína de superfície glicosilada. Enzima que divide o vírus a partir da célula hospedeira. Antigenicamente variável. Existem nove subtipos.
7	M1	Proteína matriz. Localizada abaixo da camada de superfície lipídica. Antigenicamente muito estável.
	M2	Canal de íon, existem poucas cópias na membrana viral. Antigenicamente muito estável.
8	NS1	Proteína não estrutural, a função não é bem entendida. Acredita-se que inibe a síntese de interferon pelo hospedeiro.
	NS2(NEP)	Auxilia na exportação do complexo RNA com a NP para o citoplasma.

Fonte: Haaheim (2010)

2.1.3 Replicação viral

O vírus inicia a sua replicação com a adsorção da partícula viral à membrana da célula hospedeira. Este se liga especificamente nos receptores contendo ácido siálico (SA) α 2-3Gal, presente, principalmente, nas células do trato intestinal das aves. As cepas de influenza humana se ligam preferencialmente aos receptores SA α 2-6 Gal presentes nas células epiteliais do trato respiratório (STALKNECHT et al., 2007).

Em humanos, os receptores SA α 2-3 Gal estão presentes no trato respiratório, porém parecem ser menos acessíveis, pois estão localizados mais profundamente nas via aéreas

inferiores, o que explica a restrição de replicação de vírus aviários em humanos (SHINYA, 2006).

A adesão do vírus da influenza à célula ocorre pela hemaglutinina do envelope viral. Esta proteína é um trímero que deve ser clivado por proteases orgânicas transformando o precursor desta molécula, denominada H₀, em subunidades da hemaglutinina H₁ e H₂, para que as partículas virais se tornem infecciosas (STALKNECHT, 2007; ALEXANDER, 2009). O pH de 5 ou 6 auxilia na adsorção do vírus. A capacidade de clivagem pelo hospedeiro determina a patogenicidade do subtipo viral (MORAES et al., 2009; HAAHEIM, 2010).

No trato respiratório e digestório existem baixas concentrações de proteases tripsina-*like* que clivam os vírus não patogênicos. No entanto, as proteases subtilisina-*like* que clivam amostras patogênicas se encontram em várias células de diferentes tecidos e permitem a disseminação do vírus no organismo (ALEXANDER, 2009).

Após a adesão, o vírus perde o capsídeo no citoplasma da célula e o RNA viral migra para o núcleo celular, onde ocorrerá a transcrição e a síntese de RNAm. Posteriormente, o RNAm migrará para o citoplasma, será traduzido no retículo endoplasmático para a síntese das proteínas virais. As proteínas produzidas nos ribossomos serão transportadas para o complexo de Golgi onde poderão sofrer modificações pós traducionais (SWAYNE; HALVORSON, 2008).

Os RNAs recém produzidos migram com as proteínas e se organizam para a saída da célula pelo processo de brotamento. Neste momento, a glicoproteína neuraminidase permite a eluição viral ou o rompimento das ligações dos vírus pela hemaglutinina com os receptores de membrana (MORAES et al., 2009; HAAHEIM, 2010).

2.1.4 Características da doença

A transmissão do vírus em aves de vida livre ocorre pela via fecal/oral e trato respiratório (STALKNECHT et al., 2007), porém, os vírus da influenza altamente patogênicos causam morte muito rápida nas aves e é possível que poucos vírus sejam excretados durante o curso da infecção (ALEXANDER; SENNE, 2008).

Em pássaros *Acrocephalus scirpaceus* infectados com H5N1 foi demonstrada que a eliminação viral pelo trato respiratório era maior do que pelo trato intestinal (FUJIMOTO et

al, 2010). Bertran et al. (2012), sugeriram que falcões poderiam adquirir o vírus da IAAP e/ou IABP através da ingestão de presas infectadas.

Os sinais clínicos podem ser classificados de acordo com a cepa envolvida e a susceptibilidade do hospedeiro. O vírus da influenza aviária de baixa patogenicidade (IABP) é comum em aves de produção. Também pode ser encontrado em outras espécies aviárias apresentando sinais clínicos como: baixa produção de ovos, inapetência, penas eriçadas, edema de cabeça, sinais respiratórios moderados incluindo dispneia, secreção ocular e nasal (KENT et al., 2006; SELLWOOD, 2010).

A influenza aviária de alta patogenicidade (IAAP) se caracteriza pela rápida disseminação, morte súbita, com mortalidade de 100% das aves. Pode causar sinais respiratórios, acompanhados por hemorragia interna, cianose, diarreia e morte (SELLWOOD, 2010). Falcões inoculados com o vírus da IAAP podem manifestar sinais neurológicos antes do óbito (BERTRAN, 2012). Nesta doença se encontram lesões necróticas e hemorrágicas em diversos órgãos, além de edema de face, cabeça, pescoço e patas podendo estar acompanhada de hemorragias, petéquias e equimoses. Nos órgãos internos foram descritos quadros hemorrágicos e necrose em mucosas e serosas (SWAYNE; HALVORSON, 2008).

Os achados patológicos são variáveis de acordo com o patotipo do vírus. Na doença provocada pelo vírus da IABP foram descritos inflamação fibrinopurulenta em seio nasal, traqueia, sacos aéreos e brônquios, além de exsudatos inflamatórios no oviduto de fêmeas. Esporadicamente rins e pâncreas podiam estar acometidos (SWAYNE; HALVORSON, 2008).

Os vírus podem estar protegidos pela matéria orgânica das próprias aves como secreções nasais, oculares e fezes. Temperaturas frias e condições de umidade favorecem a longa sobrevivência do vírus em ambientes ocupados por aves reservatórios (FULLER et al., 2010; SWAYNE; HALVORSON, 2008). Os virions são sensíveis ao calor, solventes lipídicos, detergentes (aniônicos, catiônicos ou neutros), formaldeído, irradiação e agentes oxidantes (STALKNECHT et al., 2007).

2.2 DOENÇA DE NEWCASTLE

2.2.1 Histórico

A doença recebeu este nome por ter ocorrido o primeiro surto na primavera de 1926, em uma granja próxima a cidade de Newcastle-on-Tyne, na Inglaterra. No entanto, outros relatos da doença foram descritos na ilha de Java, Indonésia (março de 1926) e em outras localizações como: Índia, Sri Lanka, Coreia e Japão (KRANEVELD, 1926¹, DOYLE, 1927² apud ALEXANDER, 1988, p. 2).

Nas aves silvestres, os primeiros casos de isolamento do vírus da doença de Newcastle ocorreram em biguás, *Phalacrocorax aristotelis* em 1949, na Escócia, e em *Phalacrocorax carbo*, em 1974. Em 1956, a doença havia sido sugerida nestas duas espécies por Macpherson, pois apresentavam os mesmos sinais clínicos e a mesma localização geográfica que as aves de produção, durante a epidemia de DNC em 1897-1898 ou em 1949-1951 (KUIKEN, 1999; LEIGHTON; HECKERT, 2007).

O VDN foi descrito em uma variedade de espécies, compreendendo 27 das 50 ordens de aves. Embora tenha sido provado que a maioria das cepas isoladas de aves aquáticas não era patogênica para galinhas, as aves silvestres foram consideradas reservatórios do VDN (ZHU et al., 2010).

O VDN foi identificado no Brasil, em 1953, nos Estados do Pará e Amapá pela importação de carcaças de aves contaminadas dos Estados Unidos (SANTOS, 1954).

Desde então, a doença foi descrita esporadicamente no país, com a última ocorrência em 2006 diagnosticados em criação de galinhas de fundo de quintal no Estado do Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Amazonas (SILVA et al., 2008).

Em aves do Zoológico Municipal e de propriedades particulares no Rio de Janeiro, no Brasil, foi estudada a presença de anticorpos para o VDN pela técnica da inibição da hemaglutinação (HI). Encontraram em 12 aves silvestres de 837 aves domésticas não vacinadas, títulos de anticorpos para esta doença (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2003). Nesta cidade, foi isolada a cepa mesogênica do vírus da Doença de Newcastle em patos domésticos com

¹ KRANEVELD, F.C. A poultry disease in Dutch East Indies. **Ned.-Indisch Bl. Diergeneesk.**, n.38, p.448-451, 1926.

² DOYLE, T.M. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. **Journal Comparative Pathology and Therapeutics**, n.40, p. 144-169, 1927.

sinais clínicos respiratórios, neurológicos e mortalidade de aproximadamente 100 aves (OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2005).

Pardais (*Passer domesticus*) capturados em granjas de frangos de corte e granjas de reprodução no Estado do Pernambuco apresentaram três (03) aves positivas (n=103) na prova de HI. Houve o isolamento viral de cepas provavelmente vacinais, demonstrando o contato dos pássaros com as aves de produção (SILVA et al., 2006).

Na costa brasileira e região Amazônica foram detectadas, pela técnica de PCR em tempo real, cepas lentogênicas de VDN em sete amostras de aves silvestres (0,7%), migratórias ou não, e domésticas de um total de 1.022 aves estudadas, ocorreu o isolamento viral, demonstrando a possibilidade desses animais se tornarem carreadores e reservatórios do vírus DNC de baixa patogenicidade (THOMAZELLI et al., 2012).

2.2.2 Características do vírus

O vírus pertence à ordem Monegavirales, família Paramyxoviridae, a qual é dividida em duas sub-famílias: a sub-família Pneumovirinae composta pelos gêneros *Pneumovirus* e *Metapneumovirus* e a sub-família Paramyxovirinae composta pelos gêneros *Morbillivirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Henipavirus* e *Avulavirus* (LEIGHTON; HECKERT, 2007; PAULILLO; JÚNIOR, 2009).

O gênero *Avulavirus* apresenta nove subtipos de *Paramyxovirus* aviários, sendo a Doença de Newcastle causada pelo *Paramyxovirus* tipo I (ALEXANDER, 1988; PAULILLO; JÚNIOR, 2009).

As partículas virais do *Paramyxovirus* tipo I são pleomórficas e com formatos arredondados de dimensões que variam entre 100 a 500 nm de diâmetro. Também podem se apresentar como formas filamentosas de aproximadamente 100 nm de comprimento (ALEXANDER, 1988).

O vírus consiste de RNA envelopado, o qual mostra assimetria no capsídeo helicoidal e possui um genoma não segmentado, de fita simples e polaridade negativa (ALEXANDER, 1988).

Dentro do envelope reside um nucleocapsídeo helicoidal central contendo o RNA genômico com 15.186 nucleotídeos, compreendendo seis genes. Estes codificam seis polipeptídeos: as proteínas do nucleocapsídeo (NP), fosfoproteínas (P), grande polimerase

RNA-dependente (L) que inicia a replicação intracelular do vírus (MILLAR; CHAMBERS; EMMERSON, 1988; LAMB, 2007), proteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) e proteína de fusão (F). Entre o envelope e o núcleo existe uma proteína da matriz (M) que compõe a arquitetura viral e é liberada durante a entrada do vírus na célula hospedeira (MILLAR; CHAMBERS; EMMERSON, 1988).

Os virions possuem um envelope lipídico onde estão inseridas projeções típicas, em forma de espículas (maiores e menores) que cobrem toda a sua superfície.

As espículas maiores apresentam aproximadamente 8 nm de comprimento e possuem uma glicoproteína HN com atividade hemaglutinante e neuraminidase (PAULILLO; JÚNIOR, 2009). As espículas menores possuem a glicoproteína F, que está associada à capacidade do envelope em se fundir às membranas celulares do hospedeiro, para que haja a introdução do material genético na célula e ocasionar a fusão das células infectadas, resultando no efeito citopático “in vitro”, com a formação de sincício (PAULILLO; JÚNIOR, 2009).

A virulência do VDN em galinhas é determinada pela composição de aminoácidos da proteína de fusão (F) presente na superfície do vírus. Assim como, pela presença de enzimas celulares do hospedeiro capazes de clivar esta proteína. Para que o processo de infecção viral ocorra é necessário que a proteína F0 seja clivada nas proteínas F1 e F2, pelas proteases do hospedeiro, que interagem com um grupo específico de aminoácidos no ponto de clivagem da proteína F (LEIGHTON; HECKERT, 2007).

A virulência deste patógeno será determinada pela composição de aminoácidos encontrados no ponto de clivagem da proteína F0. Quando houver poucos aminoácidos no ponto de clivagem, somente as enzimas encontradas nos tecidos do trato respiratório ou intestinal do hospedeiro serão capazes de agir nestes aminoácidos. As sequências de aminoácidos no ponto de clivagem foram descritas entre as posições 113 a 117 da proteína. (ALEXANDER, 2011).

2.2.3 Características da Doença

Vários fatores podem estar envolvidos na manutenção da infecção e a sua transmissão, como: a presença de aves de produção carreadoras, a introdução constante de aves susceptíveis, a presença de outras espécies de aves de produção, aves silvestres, condições de

ambiente favorável e a heterogeneidade do vírus da Doença de Newcastle (AWAN; OTTE; JAMES, 1994).

A patogenicidade do vírus varia de acordo com a cepa e a espécie do hospedeiro envolvida, sendo mais estudada em aves de produção. Em geral, o período entre a infecção e a presença dos sinais clínicos ocorre entre 2 a 6 dias, mas pode ser até de 15 a 21 dias (LEIGHTON; HECKERT, 2007).

O vírus é capaz de infectar experimentalmente ou naturalmente mais de 241 espécies de aves, representando 27 das 50 ordens de aves existentes (LEIGHTON; HECKERT, 2007; PAULILLO; JÚNIOR, 2009; ALEXANDER, 2011). Os sinais clínicos podem variar quanto à severidade da doença dependendo da cepa viral, na dependência da espécie aviária, do estado de imunidade do hospedeiro, a idade e as condições em que são encontradas e se há a presença ou não de outros agentes concomitantes (ALEXANDER, 2011). Ocorrem diferenças entre os sinais clínicos e a severidade da doença nas espécies hospedeiras, com diferentes cepas e isolados do VDN. Um sinal clínico característico em aves de postura é a formação de ovos sem casca ou com casca mole (ALEXANDER, 2011).

O vírus é transmitido entre as aves susceptíveis, podendo ser eliminado pelas fezes, secreções corpóreas e ovos (LEIGHTON; HECKERT, 2007).

As aves clinicamente doentes são consideradas as principais fontes de infecção, entretanto as aves infectadas, e as sobreviventes a infecções naturais podem albergar o agente e atuar como reservatórios (AWAN; OTTE; JAMES, 1994).

O vírus foi isolado de diversas aves aparentemente saudáveis, indicando que a eliminação deste agente pode ocorrer por longos períodos e as aves podem ser potencialmente transmissoras para outras aves (LEIGHTON; HECKERT, 2007).

A participação de vetores mecânicos como a mosca (*Musca domestica*) na transmissão da doença foi demonstrada pelo estudo que detectou o vírus vacinal da cepa LaSota em tecidos digestivos de moscas, pelo teste de hemaglutinação em até 72 horas após a exposição vacinal (BARIN et al., 2010).

Os vírus isolados da DNC foram divididos em cinco patotipos: a) velogênico viscerotrópico, caracterizado por cepas que promovem a forma da doença altamente virulenta, na qual as lesões hemorrágicas são características no trato intestinal e trato respiratório; b) velogência neurotrópica, que causa alta mortalidade, após ocorrer os sinais clínicos respiratórios e nervosos; c) mesogênica, cuja cepa causa sinais respiratórios e ocasionalmente sinais clínicos neurológicos, porém com baixa mortalidade; d) lentogênica que causam sinais

clínicos medianos ou ausentes no aparelho respiratório e entérica assintomática onde a cepa provoca infecções entéricas inaparentes (PAULILLO; JÚNIOR, 2009).

Os vírus altamente virulentos podem produzir infecções agudas em todas as aves susceptíveis, com quadros de mortalidade súbita. Além disso, podem ser encontrados os sinais típicos da doença como: depressão, prostração, diarreia, edema de cabeça e sinais nervosos. A mortalidade pode chegar a 100% e em geral é menor em aves mais velhas.

Embora os anticorpos séricos contra o vírus de NC não informem a qual cepa do vírus a ave foi exposta, estes são importantes porque indicam se as aves silvestres estiveram expostas a este agente.

Existe uma variedade de testes sorológicos, como a imunodifusão radial simples, hemólise radial simples, imunodifusão em gel de ágar, neutralização viral, soroaglutinação rápida em placa (SAR), inibição da hemaglutinação (HI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (LEIGHTON; HECKERT 2007; PAULILLO; JÚNIOR, 2009). Destes, os mais usados na avicultura comercial são a SAR, a HI e o ELISA (LEIGHTON; HECKERT, 2007).

Em aves comerciais foi demonstrada ocorrência tanto da resposta imunológica celular como a humoral contra o VDN, sendo que os anticorpos podem ser detectados no soro entre 6 a 10 dias após o contato com o vírus (LEIGHTON; HECKERT, 2007).

Um dos objetivos da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) é facilitar o comércio de animais e seus produtos entre os países membros. Dessa forma, foram estabelecidas algumas definições para se caracterizar a Doença de Newcastle, cuja notificação é obrigatória.

A doença de Newcastle é definida como uma infecção de aves causada pelo *Paramyxovirus* aviário sorotipo 1 (PMV-1) que deve ter os seguintes critérios de virulência (ALEXANDER, 2011):

- a. o vírus ter um índice de patogenicidade intracerebral (IPI) em aves (*Gallus gallus*), de um dia de idade, de 0,7 ou maior ou;
- b. ter sido demonstrado a presença de múltiplos aminoácidos básicos (no mínimo três resíduos de argininas ou lisinas entre os resíduos 113 e 116), na região carboxi terminal da proteína F2 e fenilalanina no resíduo 117 na região amino terminal da proteína F1 do vírus.

O vírus é sensível a solventes lipídicos e instável em pH muito alto ou baixo, além de mostrar instabilidade, especialmente, em temperaturas acima de 40°C, luz solar e luz ultravioleta (PAULILLO; JÚNIOR, 2009).

Pode apresentar estabilidade e permanecer infectante por semanas, quando em temperaturas baixas e na condição de estar protegido por matéria orgânica, sobrevivendo no lixo, água, solo, carcaças, ovos e penas (LEIGHTON; HECKERT, 2007).

A maioria dos países que mantém aves de produção emprega o uso de programas de vacinação, com o objetivo de manter suas aves protegidas. Entretanto, a doença de Newcastle endêmica representa o maior fator limitante para o aumento da produção avícola em muitos países, incluindo a União Europeia que apresenta a ocorrência de surtos esporádicos (ALEXANDER, 2011).

As vacinas vivas atenuadas e/ou mortas de VDN são de cepas lentogênicas (baixa virulência) do vírus de NC e têm sido usadas com grande sucesso. No entanto, tais cepas, especialmente a La Sota e Hitchner B1, podem provocar a doença clínica, caracterizada por sinais respiratórios quando administradas a plantéis infectados com outros agentes respiratórios, principalmente *Mycoplasma gallisepticum* (SILVA et al., 2008). Com o objetivo de se evitar essas reações, para primeira vacinação recomenda-se o uso das estirpes B1, Ulster, ou VG-GA (PAULILLO; JÚNIOR, 2009).

2.3 MYCOPLASMA GALLISEPTICUM e MYCOPLASMA SYNOVIAE

2.3.1 Histórico

Os micoplasmas pertencem à classe Mollicutes, ordem I Mycoplasmatales, família Mycoplasmataceae e gênero *Mycoplasma*, com aproximadamente 180 espécies que se distribuem entre o homem, mamíferos, aves, peixes, insetos e plantas (RIVERA-TAIPA; CEDILLO-RÁMIREZ; JUÁREZ, 2002; KLEVEN; FERGUSON-NOEL, 2008; TIMENESKY, 2009).

Dentre as 25 espécies de micoplasmas descritos em aves, 17 foram encontradas em aves silvestres (LUTTRELL; FISCHER, 2007). No entanto, apenas *Mycoplasma gallisepticum* (Mg), *Mycoplasma synoviae* (Ms), *Mycoplasma iowae* (Mi) e *Mycoplasma meleagridis* (Mm) apresentam importância econômica, pois afetam as aves de produção e se distribuem mundialmente (GIMENO, 2009; METTIFOGO; BUIM, 2009, NASCIMENTO et al., 2005).

Em 1898, Nocard e Roux, na França, isolaram os micro-organismos da pleuropneumonia contagiosa de bovinos. Durante décadas os micoplasmas foram isolados de animais e humanos, doentes ou não, e foram denominados de organismos pleuro pneumonia-like (TIMENESKY, 2009; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Em aves, a primeira descrição da doença ocorreu em perus, em 1905, na Inglaterra e recebeu a denominação de pneumoenterite epizoótica (LEY, 2008). Em 1935 um cocobacilo presente no exsudato nasal de galinhas foi identificado, sendo isolado de perus com quadro clínico de sinusite, denominada em 1938, de sinusite infecciosa dos perus (LEY, 2008; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

A doença foi denominada de Doença Respiratória Crônica pela evolução lenta e caráter crônico dos sinais clínicos (METTIFOGO; BUIM, 2009), sendo posteriormente definido o patógeno como *Mycoplasma gallisepticum* (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

No Brasil, a micoplasmose aviária foi relatada pela primeira vez em 1955, por Reis e Nóbrega, a partir de casos de aerossaculite em galinhas e sinusite infecciosa em perus (METTIFOGO; BUIM, 2009).

Mycoplasma synoviae foi descrito por Olson, em 1954, como o agente causador da Sinovite Infecciosa em perus. Nas décadas de 50 e 60, as granjas avícolas de frango de corte apresentaram as manifestações articulares. Em 1970, foi descrita a forma respiratória associada a outros agentes como *E. coli* e DNC (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Um surto de micoplasmose causada por uma cepa de Mg genotipicamente diferente das cepas encontradas nas aves de produção (LEY; BERKHOF; LEVISOHN, 1997), foi descrito em tentilhões (*Carpodacus mexicanus*), nos EUA e Canadá, que apresentaram sinais clínicos de conjuntivite (LUTTRELL; FISCHER, 2007). Esta doença reduziu a população desta espécie de ave em mais de 60%. Entre outras causas, em consequência à transmissão do patógeno por via direta, de ave para ave, e indireta, por meio dos comedouros instalados em áreas públicas (DHONDT; DHONDT; LEY, 2007). Além disso, as aves doentes apresentaram alterações de comportamento, o que influenciou na disseminação do patógeno, como por exemplo, o tempo de alimentação nos comedouros (HAWLEY; DAVIS; DHONDT, 2012). Dhondt et al. (2007) demonstraram que sementes contaminadas poderiam ser dispersadas quando os pássaros fossem remover as cascas antes do consumo, e estas poderiam espalhar Mg pela poeira, infectando novos hospedeiros pela exposição ao agente.

Nos estudos epidemiológicos de Mg em pássaros *Carpodacus mexicanus* foi enfatizado por States, Hochachka e Dhondt (2009) que a prevalência da doença dentro de uma população, poderia ser maior ou menor na dependência da abundância e das interações entre

hospedeiros primários e hospedeiros alternativos dentro da comunidade de aves. Esses pássaros quando doentes poderiam transmitir a bactéria pela mudança de comportamento com a diminuição de movimentação, manutenção mais prolongada nos comedouros externos encontrados em ambientes caseiros, parques e permanecendo em pequenos grupos (HAWLEY, DAVIS, DHONDT, 2007).

No Brasil, os estudos epidemiológicos referentes ao Mg e Ms relacionaram-se basicamente às aves de produção, uma vez que pela legislação brasileira, as aves reprodutoras têm que ser livres de Mg, Ms e Ms independente da espécie de aves da criação. As criações terciárias que produzem frangos de corte e poedeiras comerciais não são contempladas com essa exigência (SILVA et al., 2008).

2.3.2 Características do *Mycoplasma*

Os micoplasmas são seres procariontes, com ausência de parede celular, considerados os menores micro-organismos de vida livre capazes de auto replicação (RIVERA-TAPIA; CEDILLO-RAMÍREZ; JUÁREZ, 2002; LEY, 2008). Em razão desta ausência, são resistentes a antibióticos que agem na parede celular como, por exemplo, as penicilinas (NASCIMENTO et al., 2005). Possuem conformações estruturais pleomórficas, como pequenos bacilos ou cocobacilos Gram negativos, formando colônias com característica de “ovo frito” (LEY, 2008; METTIFOGO; BUIM, 2009; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

As dimensões variam entre 200 a 300 nm de diâmetro e podem possuir o formato de uma garrafa ou pera pela protrusão de membrana (MIYATA; OGAKI, 2006). Em sua membrana existem projeções similares a fimbrias que possuem a função de motilidade, quimiotaxia e aderência aos receptores das células do hospedeiro (TAJIMA; NUNOYA; YAGIHASHI, 1979; LEY 2008; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Em função do reduzido genoma, apresentam capacidade limitada de biossíntese dos componentes necessários ao seu metabolismo e crescimento (METTIFOGO; BUIM, 2009).

A membrana plasmática é trilaminar, sendo constituída por mais de dois terços de proteínas, 20 a 30% de lipídios e uma pequena quantidade de carboidratos. As proteínas de membrana de Mg podem ser divididas em duas classes: as integrais e as periféricas. O alto grau de variabilidade na expressão de antígenos de superfície entre as cepas de Mg foram

demonstrados com a utilização de anticorpos monoclonais no sistema *western blot* (METTIFOGO; BUIM, 2009).

As proteínas de aderência às células do hospedeiro podem variar entre as bactérias, sendo a pMGA (hemaglutinina), MGC1, MGC2 e PVpA as que mais sofreram alterações nas cepas de Mg, enquanto nas cepas de Ms foram as proteínas MSPA e MSPB. A principal proteína da membrana de Mg é a pMGA (p67). Essa proteína é formada por três epítomos variáveis que podem ser expressos ou não pelas diferentes cepas existentes (METTIFOGO; BUIM, 2009, NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Na superfície do Ms existe um grupo de proteínas, com pesos moleculares entre 45-50 KDa, dominantes na cepa WVU-1853. Estas proteínas não se expressavam de forma constante, foram classificadas como grupo MSPA e grupo MSPB e estavam relacionadas com a interação com hemácias. Foi demonstrado que a MSPA é uma hemaglutinina. Essas proteínas são codificadas por um único gene, denominado *vlhA*, que possui alto grau de identidade com o gene *pMGA 1.7* de Mg (KLEVEN; FERGUSON-NOEL, 2008).

O sistema imune do hospedeiro é estimulado pela ativação de macrófagos, monócitos, células T *helper* e células NK, levando à síntese do fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-6, interferon α , interferon β e interferon γ (NASCIMENTO et al., 2005). No entanto, o micoplasma possui a capacidade de variar os antígenos presentes na membrana e, desta forma, se evadir do sistema imunológico dos hospedeiros levando à colonização dos tecidos do organismo (METTIFOGO; BUIM 2009; NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

O micoplasma pode se manter em forma latente, dentro das células. Quando ocorre um estado de debilidade do organismo, ocasionado de forma espontânea ou por pressões ambientais, como a presença de antimicrobianos no tecido dos hospedeiros, este pode se manifestar (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

2.3.3 Características da doença

Os micoplasmas podem ser transmitidos por aerossóis, através da cópula, transmissão vertical pelo ovo, por contágio direto com outras aves ou indireto por meio de pessoas, ração, água e fômites. Dhondt et al. (2007) sugeriram que os comedouros para as aves de vida livre poderiam ser fonte de contaminação de Mg para os pássaros.

O período de incubação da doença pode variar entre seis (06) e 21 dias (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

O Mg é responsável pela doença crônica respiratória em galinhas e pela infecção por sinusite em perus (LEY, 2008). Nas aves de produção, causa a redução do ganho de peso, a diminuição da eficiência da conversão alimentar, o aumento da taxa de mortalidade e o aumento da condenação das carcaças (MACHADO et al., 2012). Em reprodutoras e aves de postura, a doença pode causar uma diminuição da produção de ovos e o aumento da mortalidade embrionária (NASCIMENTO et al., 2005; LEY, 2008).

Os sinais clínicos causados pela infecção por Mg são caracterizados pelo comprometimento do sistema respiratório, sendo que estes podem variar desde um edema facial, até as secreções em traqueia, estertores em sacos aéreos. As lesões anatomopatológicas exibem exsudatos aderidos à parede da traqueia, acúmulo de material caseoso em pulmões, congestão e hemorragia pulmonar. Pode ocorrer também salpingite, perihepatite e pericardite, resultando na condenação da carcaça em abatedouros (ISLAM, 2011).

A infecção crônica das vias aéreas inferiores na DRC (Doença Respiratória Crônica) ocasiona morbidade e mortalidade, principalmente, em aves que estão concomitantemente infectadas com outros vírus e bactérias (SILVA et al., 2008; ISLAM, 2011).

Nas infecções por Ms o sistema locomotor é acometido, com edema articular em membros pélvicos, resultando em formação calosa na região peitoral pelo apoio constante desta região. Ms pode ocasionar também aerossaculite, porém de forma assintomática. A queda na produção de ovos pode estar associada tanto a Mg como a Ms (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009; SILVA et al, 2008; ISLAM et al., 2011).

Mg e Ms podem ser diagnosticados por várias técnicas como a necropsia, o cultivo bacteriano, e testes sorológicos para se determinar a presença de anticorpos específicos ou PCR (TIMENETSKY, 2009).

A heterogeneidade antigênica pode comprometer os exames sorológicos, uma vez que as cepas utilizadas como antígenos podem não ser capazes de detectar os anticorpos induzidos por Mg atípicos que estejam circulando no campo. Dificulta também a eficácia de novas vacinas que possam induzir proteção contra diferentes isolados de campos (METTIFOGO; BUIM, 2009).

Geralmente, a concentração de anticorpos circulantes pode estar relacionada com a redução da gravidade das lesões, porém não de forma eficaz, sendo sugerido que a proteção pode ocorrer, principalmente, pela resposta local de IgG e IgA (YAGIHASHI; TAJIMA, 1986; ELLAKANY et al., 1998).

Os micoplasmas são sensíveis à maioria dos desinfetantes comuns (amônia quaternária, compostos iodados, fenólicos, álcool). Assim como, aos antimicrobianos que interferem na síntese dos aminoácidos, ácidos nucleicos e metabolismo dos lipídios, no entanto, mostram resistência a penicilina (LEY, 2008; KLEVEN, 2003; METTIFOGO; BUIM, 2009). Christensen et al. (1994) demonstraram que Mg, Ms e *M. iowae* sobreviveram nas penas de aves por dois (02) a quatro (04) dias e Mg foi capaz de permanecer no cabelo por três (03) dias, comprovando a resistência destas bactérias fora do hospedeiro.

As cepas vacinais podem induzir às lesões em aves expostas, o que tem acontecido principalmente com vacinas vivas. O uso de antibióticos potentes como tetraciclina, macrolídeos, quinolonas e tiamulina podem comprometer o diagnóstico etiológico de Mg e Ms pela redução da resposta imunológica e dificuldade de isolamento bacteriano e detecção por PCR (NASCIMENTO et al., 2005).

A instrução normativa nº 44 de 23/08/2001 do PNSA, determina as medidas de monitoramento da micoplasmose causada por Mg, Ms e Mm nas granjas de reprodução (linhagens puras, bisavós e avós), produção de aves e de ovos férteis, de galinhas e perus. Granjas que realizam o comércio ou a transferência nacional e internacional de seus produtos destinados à reprodução e produção de aves e ovos férteis. No caso do comércio internacional, os estabelecimentos avícolas devem estar certificados como livres de micoplasmose aviária (Mg, Ms e Mm). A referida instrução normativa ainda prevê a mesma conduta para os estabelecimentos avícolas de matrizes de perus, entretanto, para matrizes de galinhas, estabelece apenas ações de vigilância para *M. synoviae* (BRASIL, 2009).

2.4 EXAMES LABORATORIAIS

2.4.1 Exames sorológicos

Os métodos sorológicos são ferramentas laboratoriais de grande importância na medicina aviária, uma vez que possibilita o diagnóstico de doenças e a monitoria do plantel avícola. Esta deve fazer parte de um programa de monitoramento e prevenção na indústria avícola, pois os resultados poderão contribuir para que medidas de segurança sejam instaladas de forma a impedir que uma infecção se espalhe no plantel (SANTOS, 2009).

O monitoramento sorológico de lotes de aves gera informações sobre a prevalência da enfermidade pesquisada e permite avaliar a resposta imunológica das vacinas que são usadas

(BERMUDEZ; STEWART-BROWN, 2003). Existe uma variedade de reações sorológicas que podem ser utilizadas, de acordo com os objetivos da pesquisa diagnóstica pretendida.

O programa de monitoria é válido quando um número adequado de amostras é avaliado e quando as análises são realizadas durante um período de tempo. Desta forma, é possível correlacionar o título obtido com os problemas associados às criações avícolas (INOUE; CASTRO, 2009).

Diante das situações de desafio, a detecção de anticorpos no soro torna-se possível entre uma a três semanas após a exposição ao agente infeccioso. Assim, a coleta pareada de amostras obtidas tanto na fase aguda como na fase de convalescência, são essenciais para o diagnóstico de uma enfermidade. Os resultados de uma única coleta de soro apenas indicam que o lote foi exposto ao agente infeccioso em algum momento da sua vida (INOUE; CASTRO, 2009).

A utilização de reações para a triagem, seguidas de reações para a confirmação do agente são determinantes para o sucesso do diagnóstico.

A reação de triagem deve apresentar elevada sensibilidade, baixo custo, alta velocidade de processamento e possibilidade de automatização. Os casos positivos devem ser submetidos à confirmação com testes que apresentem maior especificidade diagnóstica, maiores custos, baixa velocidade de processamento e impossibilidade de automatização (RITHTZENHAIM; SOARES, 2007).

Os exames mais utilizados nos diagnósticos sorológicos em aves de produção e preconizados pelo MAPA consistem na soroaglutinação rápida em placa (SAR), inibição da hemaglutinação (HI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). A sensibilidade e especificidade apresentam variações entre estes ensaios (LUCIANO et al., 2011). A presença de reação falso positivo decorre da variação dos antígenos utilizados na preparação do teste e daqueles encontrados nas cepas de campo, afetando a sensibilidade do teste sorológico na dependência da prova utilizada (FEBERWEE et al., 2005, ASGHARZADE et al., 2012).

2.4.1.1 Soroaglutinação rápida em placa (SAR)

A soroaglutinação rápida em placa é qualitativa, sensível e de especificidade variável. É utilizada na triagem para a pesquisa de títulos contra Mg e Ms. Esta apresenta baixo custo e é de fácil execução, ou seja, pode ser realizada em qualquer local, sem a necessidade de um laboratório (CARDOSO, 2009; SANTOS, 2009).

A reação de aglutinação envolve a interação entre partículas insolúveis (bactéria) que contém os determinantes antigênicos em sua superfície e imunoglobulinas que apresentam, no mínimo, dois sítios de combinação ao antígeno. Quando ocorrem concentrações ideais destes reagentes existirá a formação de grumos ou reação de aglutinação positiva (RITCHTZENHAIM; SOARES, 2007).

É uma prova de eleição para a triagem de infecções por *Salmonella spp.* e *Mycoplasma spp.* (CARDOSO, 2009). No entanto, a dificuldade na produção de antígenos específicos pode resultar em reação falso positiva, sendo necessária uma prova comprobatória.

Para Mg e Ms, os títulos maiores ou iguais a 1:10 são considerados positivos, 1:5 são considerados suspeitos e abaixo de 1:5 são considerados negativos (LUCIANO et al., 2011).

2.4.1.2 Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)

As glicoproteínas (hemaglutininas) de superfície de alguns agentes infecciosos se ligam a receptores mucopolissacarídeos de membranas encontrados em eritrócitos, ocorrendo a hemaglutinação. No entanto, para que ocorra esse processo é necessário que além da especificidade estrutural, o pH, a composição iônica do meio e a temperatura estejam adequados (SANTOS, 2009).

Alguns agentes como o vírus de Newcastle, influenza aviária, bronquite infecciosa, síndrome da queda de postura, e bactérias como *M. gallisepticum*, *M. synoviae* e *Avibacterium paragallinarum* apresentam a capacidade de hemaglutinação. Esta prova tem a finalidade de titular a presença de anticorpos no soro que inibem a ação destes agentes hemaglutinantes (CARDOSO, 2009).

O teste de HI é uma prova sorológica menos sensível e mais específica do que a soroaglutinação rápida em placa e apesar de ser uma técnica amplamente utilizada, pode não detectar no teste, variantes antigênicos que diferem das cepas usadas como antígeno (FEBERWEE et al., 2005).

No caso de infecções por Mg pode-se considerar que títulos iguais ou maiores que 1:80 são positivos, entre 1:20 e 1:40 são considerados suspeitos e abaixo de 1:20 são negativos (LUCIANO et al., 2011).

2.4.1.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O teste ELISA foi desenvolvido nos anos 70, sendo utilizado inicialmente na medicina humana e posteriormente na medicina animal (SANTOS, 2009).

Esta reação utiliza um anticorpo marcado com uma enzima, que apresenta especificidade ao fragmento Fc de uma imunoglobulina. Este anticorpo é denominado de conjugado. A enzima presente no conjugado reage com seu substrato e cromógeno, produzindo cor. A intensidade de cor é medida em espectrofotômetro e quando esta é intensa indica que ocorreu uma reação entre o antígeno e o anticorpo (CARDOSO, 2009; SANTOS, 2009). Esta prova pode ser muito sensível ou muito específica, ou ambos na dependência de cada teste (CARDOSO, 2009). ELISA indireto é usado para a detecção de anticorpos presentes em um soro sanguíneo. Neste ensaio, antígenos específicos são adsorvidos em pH alcalino a uma fase sólida (microplaca de poliestireno, com 96 cavidades). O antígeno excedente é removido através de lavagens e é adicionado o soro no qual se quer detectar a presença de anticorpos. Novas lavagens são realizadas para a retirada do excesso de anticorpos e o conjugado é adicionado. Novamente a placa é lavada para a remoção do conjugado e o substrato cromógeno são acrescentados para que se determine a concentração de anticorpos específicos presentes no soro sanguíneo (RITCHTZENHAIN; SOARES, 2007; SANTOS, 2009).

Assim como, na reação de inibição da hemaglutinação, o antígeno utilizado para este teste deve ser criteriosamente selecionado para se detectar os anticorpos contra as cepas que estão no campo. Dessa forma, para que haja o controle e monitoramento das aves, é necessária a confirmação do agente por meio do isolamento bacteriano, PCR, histopatologia ou outras provas confirmatórias (CARDOSO, 2009).

Os testes de ELISA são mais específicos e sensíveis do que os testes de soroaglutinação em placa. Assim, existe uma menor probabilidade de resultados falsos positivos ou falsos negativos e detectam a resposta imunológica por um tempo maior do que a soroaglutinação em placa (KEMPF; GESBERT, 1998). Quando comparado ao teste de soroaglutinação rápida, o teste ELISA foi mais rápido e detectou precocemente a infecção por Mg no ovo (KEMPF; GESBERT 1998).

As provas SAR, HI e ELISA são recomendadas pelo PNSA como exames sorológicos para o controle dos programas de vacinação e prevenção de doenças nos plantéis avícolas. No

quadro 2 se encontram as informações sobre os agentes estudados e os exames laboratoriais recomendados, segundo o MAPA e com adaptação da autora.

Quadro 2 - Características e exames diagnósticos das doenças pesquisadas

Enfermidades Aviárias			
Diagnóstico	DNC	IA	Micoplasmose
Velocidade de transmissão	Rápida	Rápida	Lenta
Duração dos sintomas	2 semanas	Dias a semanas	Semanas a meses
Queda de produção	Alta	Variável	Média
Mortalidade	Variável	Variável	Moderada em aves jovens e baixa em aves adultas
Transmissão	Horizontal	Horizontal	Horizontal e vertical
Exames laboratoriais	HA, HI, ELISA, Isolamento do agente, RT-PCR, vírus neutralização, tempo médio de morte embrionária, índice de patogenicidade intracerebral, índice de patogenicidade intravenoso, imunodifusão em ágar gel. isolamento do agente	Imunodifusão em ágar gel; HI; ELISA; isolamento do agente	Soro aglutinação em placa; HI; ELISA; isolamento do agente

Fonte: Inoue (2009); Brasil (2009).

2.4.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O processo de amplificação de DNA foi descrito por Kary Mullis em 1983, e evoluiu quando foram descobertas e aprimoradas as técnicas com a utilização das polimerases de

organismos termófilos como *Thermus aquaticus* (taq polimerase) e *Thermus termophilus* (Tth).

A PCR ocorre basicamente em três etapas distintas: a desnaturação, a hibridização e a síntese ou polimerização do DNA, que são realizadas em diferentes temperaturas, de acordo com cada etapa. A repetição em ciclos faz com que sejam produzidas milhares de cópias de DNA.

Apesar de ser uma técnica que apresenta sensibilidade e especificidade reconhecidas, podem ocorrer variações de resultados entre os protocolos adotados pelos diversos laboratórios, e até mesmo com a utilização de um mesmo *kit* em diferentes laboratórios (HESS; NEUBAUER; HACKL, 2007).

O fragmento amplificado é aplicado em gel de agarose e submetido a um campo elétrico, uma vez que o DNA possui carga elétrica negativa. O fragmento migra para o pólo positivo do campo elétrico e ao se utilizar um marcador de peso molecular como o brometo de etídio, o fragmento poderá ser comparado pela visualização à luz ultravioleta (MORENO, 2009).

A região 16S do RNA ribossômico é caracterizada por ser conservada e estar presente em diversos micro-organismos. Tem sido amplamente utilizada para a determinação de grupos filogenéticos, como o *M. synoviae* que foi adicionado ao *GeneBank* em 1991 (LAUERMANN, 2004). A *Internet* tem sido usada para acessar a informação científica por comparação das sequências genéticas depositadas pelos diferentes laboratórios do mundo.

As bibliotecas genéticas (*GenBank*, EML, DDBL) acumulam uma grande quantidade de sequências genéticas para o desenvolvimento e validação de procedimentos diagnósticos, avaliação de cepas vacinais e presença ou ausência de agentes causadores de doenças no homem e animais (LAUERMAN, 2004).



3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

Identificar as espécies de aves em vida livre encontradas próximas às granjas de produção avícola e na Barragem Ponte Nova.

Avaliar clinicamente, detectar a presença de ectoparasitas em penas, determinar a condição corporal e idade das aves de vida livre próximas às granjas de produção avícola.

Detectar a presença do vírus da Influenza Aviária, do vírus da Doença de Newcastle, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em aves de vida livre próximas às granjas de produção avícola e na Barragem Ponte Nova.

Determinar os níveis de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em aves de subsistência próximas às granjas de produção avícola.

Detectar a presença do vírus da Influenza Aviária, do vírus da Doença de Newcastle, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em aves de subsistência, próximas às granjas de produção avícola.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Serão descritos os procedimentos realizados para a obtenção dos resultados.

4.1 ÁREA DE ESTUDO

As localidades de Mogi das Cruzes e Louveira foram escolhidas porque estão próximas à cidade de São Paulo e são regiões de produção avícolas bem desenvolvidas, sendo que a primeira se caracteriza pela produção de aves de postura e reprodução e a segunda pela produção de aves de corte.

A Barragem Ponte Nova (BPN) está situada entre os municípios de Biritiba Mirim e Salesópolis que faz divisa com Mogi das Cruzes. As localizações destas áreas de coletas de amostras se encontram nas figuras 1 e 2.

O desenvolvimento do projeto foi realizado em três áreas determinadas. As granjas de reprodução e postura localizadas na cidade de Mogi das Cruzes, no Estado de São Paulo foram denominadas de G1 e G2. A granja de frango de corte localizada no município de Louveira, no Estado de São Paulo foi denominada de G3. As criações de galinhas de subsistência localizadas na cidade de Mogi das Cruzes foram denominadas de GS1, GS2, GS3 e GS4. A figura 2 mostra a localização destas granjas. As seguintes atividades foram realizadas nestes locais:

1- Município de Mogi das Cruzes, Estado de São Paulo.

- a) coleta de amostras de aves de vida livre em granja de reprodução (G1);
- b) coleta de amostras de aves de vida livre em granjas de galinhas poedeiras (G2);
- c) coleta de amostras de aves de subsistência (GS1, GS2, GS3 e GS4).

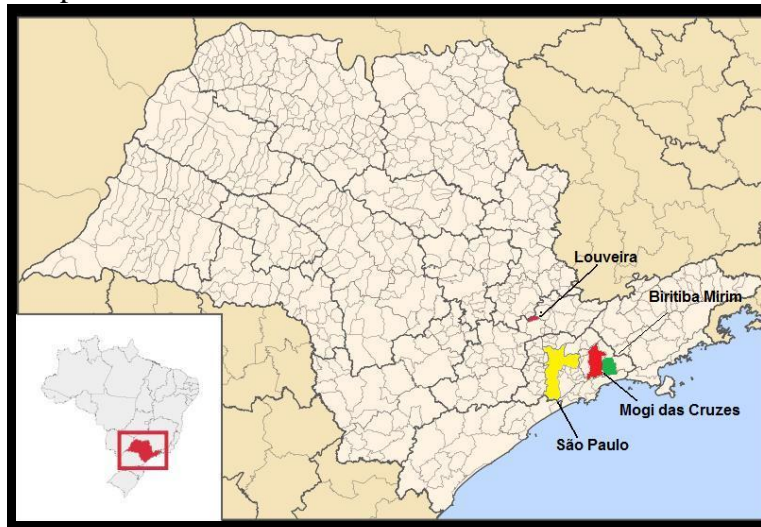
2- Município de Salesópolis, Estado de São Paulo.

- d) coleta de amostras de aves de vida livre na Barragem Ponte Nova (BPN).

3- Município de Louveira, Estado de São Paulo.

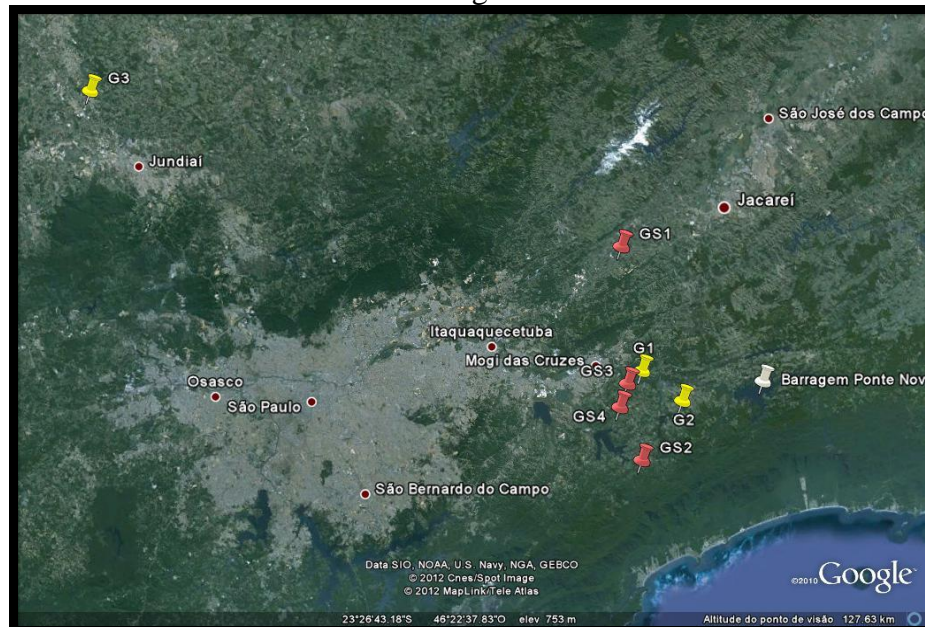
- e) coleta de amostras de aves de vida livre em granja de frangos de corte (G3).

Figura 1 - Mapa do Estado de São Paulo, destacando os Municípios onde foram realizadas as coletas a campo



Fonte: http://upload.wikimedia.org/Wikipédia/commons/6/61/SãoPaulo_Municip_Louveira.svg

Figura 2 - Mapa com a distribuição das áreas de coleta com G1, G2 e G3 representando as localizações das granjas em amarelo, e GS1, GS2, GS3 e GS4 representando as localizações das criações das aves de subsistência em vermelho e a Barragem Ponte Nova em branco.

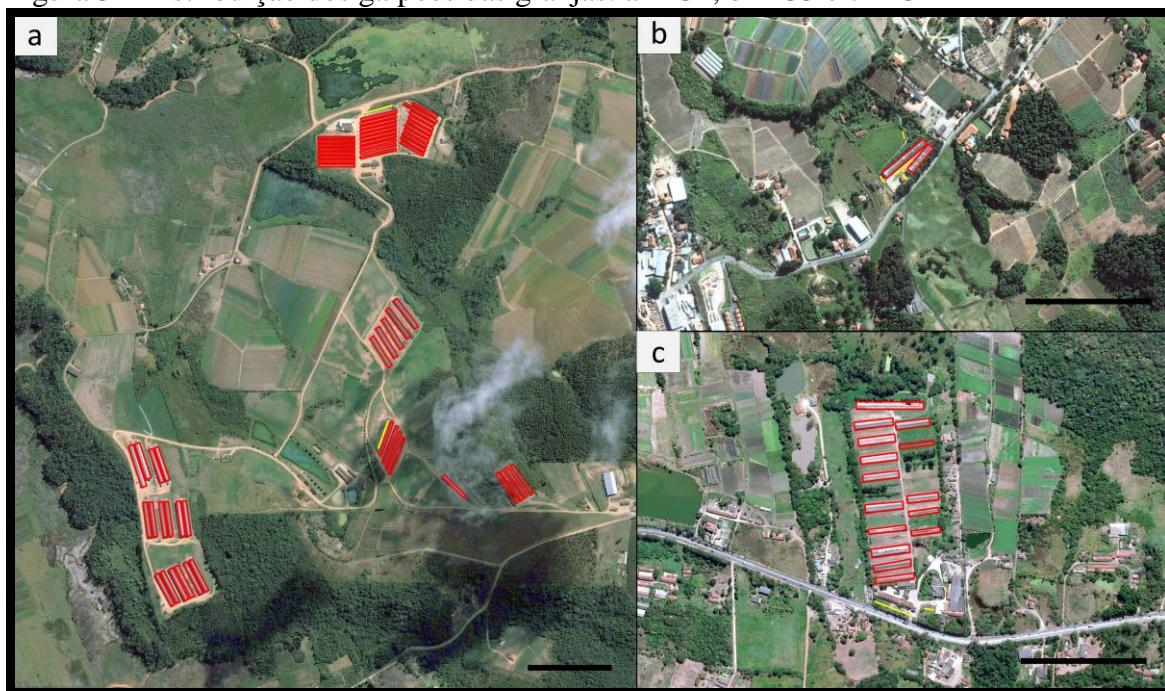


Fonte: <http://maps.google.com.br>

4.2 CARACTERÍSTICAS DAS GRANJAS E DA BARRAGEM PONTE NOVA

As três granjas e a BPN estão situadas dentro de um panorama de cidades com moderado impacto humano (entre 543 e 675 habitantes por m²) (IBGE, 2012b). A figura 3 apresenta a distribuição dos galpões nas granjas estudadas marcados em vermelho e a localização das redes marcados em amarelo. A temperatura média da região é de 26,2°C e a média de chuva é de 1.400 mm/ano (CEPAGRI, 2012).

Figura 3 - Distribuição dos galpões das granjas: a = G2, b = G3 e c = G1



Fonte: <http://maps.google.com.br>

4.2.1 Granja de reprodução (G1)

A granja de aves de reprodução (G1) em Mogi das Cruzes (-23° 33' 21,21" S, - 46° 7' 21,79" O) apresentava aproximadamente 70.000 aves, distribuídas em 15 galpões. As aves eram vacinadas periodicamente e os galpões eram fechados com dupla tela, sendo que a tela externa possuía diâmetro de meia (1/2) polegada, o que prevenia a entrada de roedores e aves

silvestres. A entrada de pessoas externas na propriedade era proibida e os carros e caminhões passavam obrigatoriamente pelo rodolúvio.

Está localizada a aproximadamente 100 metros de distância de áreas de agricultura e de fragmentos de Mata Atlântica. A coleta de aves silvestres foi realizada com as redes de neblina colocadas em frente à proteção de cerca viva de arbustos, localizada na frente da granja. A figura 4 mostra a rede de neblina instalada.

Figura 4 - Rede de neblina colocada em frente aos arbustos



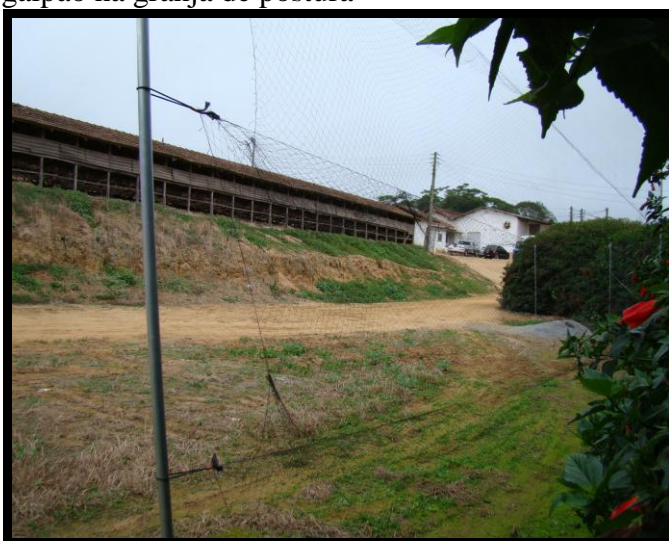
Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

4.2.2 Granja de Postura (G2)

A granja de postura em Mogi das Cruzes ($-23^{\circ} 36' 19,93''$ S, $-46^{\circ} 3' 44,08''$ O) apresentava aproximadamente 550.000 aves, distribuídas em quarenta galpões. A paisagem era composta por áreas de árvores de pinus e reflorestamento com eucaliptos, intermeadas por pequenas áreas de mata. Foi possível notar um grande número de aves silvestres circulando pelos galpões.

A granja apresentava programa vacinal para as aves, porém as instalações eram abertas, com alto fluxo de aves silvestres e animais domésticos no seu interior. Está localizada a aproximadamente 9,5 Km da Barragem Ponte Nova, considerada uma área de soltura de aves do DAEE (Departamento de Águas e Energia Elétrica). Nesta granja, foi possível colocar as redes próximas aos galpões de aves. A figura 5 mostra a localização da rede de neblina na granja de postura e a figura 6 mostra as aves silvestres ao redor dos galpões.

Figura 5 - Rede de neblina colocada próxima ao galpão na granja de postura



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

Figura 6 - Pássaros silvestres nos galpões



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

4.2.3 Granja de Corte (G3)

A granja de aves para corte está localizada na cidade de Louveira (-23, 05' 21,48" S, -46° 57' 38,56" O), no seu entorno existe uma área extremamente degradada e com poucos fragmentos de mata ao seu redor. Nesta granja eram produzidas aproximadamente 25.000 aves, distribuídas em dois galpões. A figura 7 mostra o galpão de frangos de corte. As aves recebiam vacinação periódica, porém na figura 8 observa-se que as aves silvestres entravam no interior das instalações.

As redes foram colocadas próximas aos galpões para a captura das aves.

Figura 7 - Galpão de aves para corte



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

Figura 8 - Pássaros sobre comedouros da granja



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

4.2.4 Barragem Ponte Nova

A Barragem Ponte Nova foi construída em 1971 e ocupa uma área de 2.760 hectares, pertencendo à bacia do Alto rio Tietê. Está localizada entre os municípios de Salesópolis e Biritiba Mirim ($-23^{\circ} 34' 57,79''$ S, $-45^{\circ} 55' 59,69''$ O). A figura 9 mostra uma vista panorâmica da Barragem Ponte Nova.

O local é o marco da nascente do rio Tietê e está sob a responsabilidade do Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo (DAEE).

A barragem foi construída com a finalidade de controlar as enchentes e possibilitar as condições de navegação pelo rio Tietê, assim como, a recuperação de várzeas e o abastecimento de água da região (SALESÓPOLIS, 2012).

A vegetação é composta por mosaicos de Mata Atlântica, floresta densa e sub montanhosa (MILANELO, 2006), com clima temperado úmido, sem estiagem. A vegetação das terras vizinhas é de mata tropical, apresentando faixas de reflorestamento com pinheiros e eucaliptos (GIAMAS et al., 2004).

Especialmente entre as cabeceiras e a cidade de São Paulo, a intensa urbanização reduziu as áreas com formações vegetais nativas, substituídas por pastagens e culturas agrícolas diversas, com deterioração da condição natural dos rios e da vegetação ciliar (MARCENIUK; HILSDORF; LANGEANI, 2011).

Figura 9 - Vista da Barragem Ponte Nova



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

4.3 CARACTERÍSTICAS DAS CRIAÇÕES DE SUBSISTÊNCIA

As criações de subsistência ou também chamadas de criações de “fundo de quintal”, foram escolhidas de forma aleatória entre os alunos da escola municipal “Fujitaro Nagao” de Mogi das Cruzes, que participaram de uma palestra sobre sanidade avícola e por contatos pessoais, uma vez que não havia informações disponíveis sobre a distribuição geográfica de pequenos criadores em Mogi das Cruzes.

As localizações não apresentaram relação entre elas, assim como o número de aves das propriedades. As propriedades apresentavam características distintas e foram denominadas de GS1, GS2, GS3 e GS4.

Os proprietários das criações receberam as informações sobre o projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes do início da pesquisa (Apêndice A).

A criação GS1 está situada a $-23^{\circ} 22' 19,06''$ S, $-46^{\circ} 8' 29,86''$ O, apresentava aproximadamente 40 aves de idades diversas, em um galpão com aproximadamente 100 m^2 . O galpão era construído com ripas de madeira e chão de terra com capim seco. Esta estrutura foi utilizada no passado pela família, com a finalidade de criação de aves para postura. A figura 10 mostra o procedimento de captura para a coleta de amostras no galpão de aves de subsistência da criação GS1.

As galinhas podiam circular livremente pelo local, pois havia baixa densidade de animais por m^2 . A alimentação baseava-se em ração comercial para aves de postura e não havia programa de vacinação. A ração e a água eram colocadas em pneus cortados que serviam de comedouros e bebedouros.

Figura 10- Galpão de aves de subsistência GS1



Fonte : Guimarães, M. B. (2012)

A criação GS2 situada a $-23^{\circ} 41' 13''$ S, $- 46^{\circ} 7' 57''$ O, apresentava aproximadamente 50 aves de idades diferentes, mantidas em recintos com telas de galinheiro com duas (02) polegadas e chão de terra, separados de acordo com as diferentes raças de galinhas. Havia ainda uma área extensa nos fundos do sítio, muito arborizada, onde permaneciam outras galinhas dividindo o espaço com dois (02) patos e dois (02) gansos. A figura 11 mostra a instalação da granja GS2.

Os recintos apresentavam dimensões que variavam entre 20 e 50 m². As aves eram vacinadas, anualmente, com vacinas contra a Doença de Newcastle e Bouda aviária, compradas em loja agrícola da região. Havia bebedouros e comedouros de plástico suspensos e outros mantidos no chão, que era de terra batida com areia. O proprietário realizava transações comerciais com esses animais, havendo frequentemente a entrada e saída de aves dos recintos.

Figura 11 - Galinheiro com diversas raças de aves na criação GS2



Fonte : Guimarães, M. B. (2012)

A criação GS3 está situada a - 23° 34' 24.8" S, - 46° 8' 48.68" O. As aves eram mantidas em uma área cercada da chácara que compreendia aproximadamente 3.000 m², com bastante arborização. Havia 15 aves soltas neste local, que recebiam dieta à base de milho, ração de postura e pastagem. Os comedouros e bebedouros eram de bacias plásticas. As aves recebiam vermifugação e vacinação anual contra boubá aviária. A figura 12 mostra a área aberta com a vegetação presente na granja GS3.

Figura 12 - Área aberta com arbustos e vegetação abundante na criação de aves GS3



Fonte : Guimarães, M. B. (2012)

As aves (n=11) da criação GS4, situada a $-23^{\circ} 36' 25,5''$ S, $-46^{\circ} 9' 41,40''$ O, eram mantidas em condição semiaberta. Estas passavam parte do dia soltas ao redor da casa e com outros animais domésticos como cães e gatos, alimentando-se de restos de comida pelo chão. Havia um galinheiro de aproximadamente 30 m^2 , onde as aves eram recolhidas à noite. O galinheiro era feito de madeira com tela de duas (02) polegadas. O comedouro e bebedouro eram de madeira. As aves tinham acesso à rua e à vizinhança e não recebiam nenhuma vacina. A figura 13 mostra a instalação da granja GS4.

Figura 13 - Galinheiro da criação de aves GS4



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

4.4 CAPTURA E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE AVES SILVESTRES

Todas as capturas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (Licença 20.171-3). Assim como, pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo 1.797/2009).

As aves silvestres de vida livre foram capturadas pelas redes-de-neblina montadas próximas aos aviários. As redes foram armadas antes do amanhecer do dia, por volta das 4:30 horas e permaneciam até uma hora da tarde. A figura 14 mostra uma ave (*Columbina talpacoti*) capturada pela rede de neblina. Foram utilizadas quatro redes de neblina com 12 metros de comprimento por três (03) metros de largura e colocadas em locais camuflados onde pudesse haver maior fluxo de aves silvestres.

Assim que retiradas das redes, as aves eram mantidas em sacos escuros de pano, que foram pendurados longe de barreiras físicas para que não se machucassem ao se debater.

Gradativamente, foram removidas dos sacos e foram identificadas, obtidos os dados biométricos, realizada a marcação, avaliação clínica e a coleta de material biológico.

As armadilhas eram monitoradas a cada 40 minutos, se evitando que o animal viesse a óbito por estresse térmico ou por predadores. As identificações das espécies foram baseadas em ornitólogos experientes e manuais de identificação segundo os autores Develey &

Endrigo, 2004, Sigrist, 2009, Souza, 2004 e Sick, 1997.

Dentre o período de fevereiro a dezembro de 2010, foram realizadas 13 saídas a campo para a captura das aves em vida livre, nas três granjas. Na granja de reprodução (G1) as coletas ocorreram entre os meses de fevereiro a maio (04 dias), na granja de postura (G2) no mês de junho (04 dias) e na granja de corte (G3) nos meses de julho, agosto e dezembro (05 dias). Na Barragem Ponte Nova (BPN) foram realizadas 12 saídas a campo, compreendendo os meses entre março de 2011 e janeiro de 2012.

Figura 14 - *Columbina talpacoti* capturada em rede-de-neblina



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

4.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA E COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As aves capturadas nas proximidades das granjas foram avaliadas clinicamente, quanto à idade, condição corporal e presença de ácaros. Durante a imobilização, foram contidas, identificadas, anilhadas e submetidas à avaliação de estado geral (presença de lesões externas, condição corporal, presença de secreções em orifícios naturais, ruídos respiratórios, condição abdominal e ectoparasitas).

A idade baseou-se no desenvolvimento e coloração do empenamento, no tamanho do indivíduo de acordo com os conhecimentos da espécie, peso, coloração e tamanho do bico. As aves foram classificadas em jovens, adultas e indeterminadas. A conformação de musculatura

peitoral foi denominada de: ruim, para animais que apresentavam diminuição da musculatura peitoral e saliência evidente da quilha; regular, para animais que apresentavam pouca evidência da quilha, porém sem perda de musculatura peitoral e boa, para animais que apresentavam bom desenvolvimento de musculatura peitoral.

Os dados da biometria foram obtidos e a ficha de campo preenchida. A ficha de campo se encontra no Apêndice B. Após estes registros, foram coletadas amostras de orofaringe, em duplicata e uma amostra de cloaca, com o auxílio de suabes estéreis. Na figura 15 se encontra o procedimento de contenção manual da ave, e a avaliação da presença de ectoparasitas. O anilhamento da ave é mostrado na figura 16 e a figura 17 mostra a biometria e a coleta de suabe de orofaringe da ave.

Um dos suabes de orofaringe foi colocado em meio Frey, mantido sob refrigeração até a chegada ao laboratório de Ornitopatologia-FMVZ/USP, onde foi conservado em estufa a 37°C por 24 horas. A composição deste meio está descrita na tabela 1.

O segundo suabe de orofaringe e cloaca foram mantidos em criotubo estéril, contendo 10 µL de solução de antibiótico e antifúngico (10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B, da marca Gibco®) em 1 mL de PBS 0,1M, pH 7,4. Os criotubos foram conservados em nitrogênio líquido até a chegada ao Laboratório de Ornitopatologia-FMVZ/USP, onde foram armazenados em freezer - 80° até o processamento da amostra.

Tabela 1 - Composição do meio Frey

Composição do Meio Frey	
Caldo Básico Difco® ou outro fabricante	21 g
Glicose	3g
Soro Suíno inativado	120 mL
Nicotinamida, adenina dinucleotídeo	0,1g
Hidrocloridrato de cisteína	0,1g
Extrato de levedura fresco a 25%	100 mL
Vermelho de fenol (solução a 1 %)	2,5 mL
Acetato de tálio (solução a 10%)	5 mL
Penicilina G potássica ou sódica	1.000.000 unidades
Água destilada, q.s.p.	1.000 mL

Fonte: Nascimento (2009)

Figura 15 - Contenção manual e identificação da espécie



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

Figura 16 - Observação de ectoparasitas e anilhamento



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

Figura 17 - Biometria e coleta de suabe de orofaringe



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

4.6 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE AVES DE SUBSISTÊNCIA

As aves foram contidas manualmente e foram coletados aproximadamente 2,5 mL de sangue das veias jugular ou ulnar, utilizando seringa de 3 mL e agulha 25 mm x 5,5 mm.

O sangue foi mantido em tubo de vidro, transportado em temperatura ambiente até o Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP. Posteriormente, foi mantido em estufa a 37°C por duas horas e em geladeira por no mínimo uma hora. A separação do soro foi realizada pela centrifugação das amostras a 2.000 x g, por 5 minutos a 4° C. Os soros foram armazenados em freezer a -20° C.

As amostras de soro foram mantidas em freezer a -20°C e encaminhadas, em conservação no gelo, para o laboratório AVIPA, em Campinas, no Estado de São Paulo. Neste laboratório foi realizado o teste ELISA indireto com o *kit* da marca Idexx® para as Doenças de Newcastle, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*.

As densidades ópticas dos controles positivos, negativos e das amostras foram calculadas e interpretadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Foram coletadas amostras de traqueia e cloaca para a realização das reações de RT-PCR e PCR para os agentes estudados. As amostras foram armazenadas conforme a descrição no item 4.5.

4.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA OS TESTES MOLECULARES

As amostras coletadas foram submetidas aos procedimentos de extração de DNA ou RNA na dependência do agente pesquisado e aos testes de PCR e RT-PCR, respectivamente, para a detecção de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* e Doença de Newcastle, Influenza Aviária.

4.7.1 Extração de DNA

O protocolo de extração de DNA de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* foi baseado em FAN; KLEVEN; JACKWOOD, 1995 e consistiu em:

1. Incubar os tubos com meio Frey e amostra por 24 horas a temperatura de 37°C;
2. Homogeneizar e coletar 500 µL da suspensão;
3. Centrifugar a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C e em seguida descartar o sobrenadante;
4. Adicionar 500 µL de tampão fosfato salino (PBS 0,1M, pH 7,4);
5. Centrifugar a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C e em seguida descartar o sobrenadante;
6. Ressuspender o *pellet* com 50 µL de PBS 0,1M, pH 7,4;
7. Ferver por 5 minutos;
8. Colocar no gelo por 5 minutos;
9. Centrifugar por 5 minutos a 2.000 x g, a 4°C;
10. Coletar o sobrenadante e armazenar a -20°C.

4.7.2 Primers utilizados na Amplificação de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*

Para a amplificação do material genético dos micoplasmas utilizou-se as sequências de nucleotídeos baseado nos trabalhos de Lauerman et al. (1993) e Nascimento (2005). Estes iniciadores amplificam produtos de 207pb e 481pb, respectivamente, de *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma gallisepticum*. A sequência de nucleotídeos do *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, o tamanho dos produtos e as referências bibliográficas se encontram na tabela 2.

4.7.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada de acordo com o desenvolvimento de Mettifogo (2001) em reação de *multiplex*, com um volume de 25 µL de *mix* de reação, que continha 0,75-1,5 µL de cada um dos *primers* Senso e Antisenso na concentração de 10 pMol, 2,5 µL

de tampão 10X, 8 μL de dNTP 1,25mM, 1,5 μL de MgCl_2 50mM e 1,75U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM) e 2,0 μL de DNA extraído.

A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: um ciclo térmico de 94°C por 5 minutos para desnaturar completamente o DNA, 35 ciclos de temperaturas de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos *primers* a 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos para a extensão, seguida de incubação final a 72°C, por 10 minutos. A reação foi mantida a 4°C ao infinito, até se armazenar os produtos amplificados a -20°C. O controle positivo para a pesquisa de Mg e Ms foi a vacina viva *Myco-galli* ®(Mg-70) do laboratório BioVet. O controle negativo da reação foi o PBS 0,1M, pH 7,4. As condições de reação se encontram na tabela 2.

4.7.4 Extração de RNA utilizando o método de TRIZOL/BRAZOL

As amostras passaram pelo processamento de congelamento e descongelamento a seguir:

- a) Congelamento em freezer a -80°C por 10 minutos.
- b) Descongelamento das amostras em banho Maria a 56°C por 1 minuto.
- c) Homogeneização das amostras em agitador de tubos (Vortex Genie®).

As etapas acima foram realizadas três vezes.

A extração de RNA das amostras para a detecção dos Vírus da Doença de Newcastle e Influenza Aviária foram realizadas com o reagente BRAZOL® (LGC Biotecnologia®, Brasil), segundo as instruções para a técnica de Trizol, com 250 μL de amostra (125 μL de amostra de orofaringe e 125 μL de amostra de cloaca), conforme descrição abaixo:

1. Adicionar 750 μL de Trizol (Brazol) para 250 μL de amostra (3:1) e homogeneizar;
2. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (15 a 30°C);
3. Adicionar 150 μL de clorofórmio, homogeneizar com as mãos e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos;
4. Centrifugar a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C e transferir o sobrenadante para novos microtubos;

5. Completar os microtubos com 500 μ L de isopropanolol;
6. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos;
7. Centrifugar a 12.000 x g por 10 minutos, a 4°C;
8. Remover o sobrenadante;
9. Adicionar 750 μ L de etanol a 75% e homogeneizar;
10. Centrifugar a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C;
11. Descartar o sobrenadante e deixar secar os tubos em papel absorvente, por 10 minutos;
12. Dissolver o RNA em 20 μ L de DPEC, incubar no termobloco a 56°C por 10 minutos e armazenar no freezer -20°C.

4.7.5 Primers utilizados na amplificação dos vírus RNA

A sequência de nucleotídeos do gene Matriz foi usada para a detecção do vírus da influenza aviária, descrita por Poddar (2002), que amplifica um produto de 311pb. Os iniciadores desenhados por Stäuber (1995) usando a sequência do gene F, foram empregados para amplificar um produto de 320pb do *Paramyxovirus* tipo I (vírus de Newcastle). A tabela 2 mostra a sequência dos iniciadores, o tamanho dos produtos e as referências bibliográficas.

4.7.6 Técnica da Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)

O RNA extraído foi submetido a uma reação de transcrição reversa (RT), para a obtenção do DNA complementar (cDNA). O cDNA foi utilizado, para a detecção de um fragmento específico do gene de cada vírus. Para a detecção dos agentes virais foi utilizado o *kit RT-PCR OneStep* (QIAGEN®), segundo instruções do fabricante. O uso deste *kit* permitiu a realização da transcrição reversa e a reação de PCR em uma única reação. As condições de reação se encontram na tabela 2 e os reagentes utilizados na tabela 3.

Para uma reação com um volume total de 50 μ L, foram utilizados 25 μ L de água ultra pura livre de RNase, 10 μ L de tampão *onestep 5X*, 2 μ L de dNTP *mix OneStep* (contendo

10 mM de cada dNTP), 3 μ L de cada um dos *primer* Sendo ou Antisenso, 2,0 μ L de *mix* de enzimas *OneStep* e 5 μ L de RNA.

A reação de amplificação para o VDN ocorreu com o ciclo de desnaturação a 50°C por 30 minutos e 94°C por 3 minutos, seguido pela hibridização dos *primers* com 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e extensão final realizada a 72°C por 10 minutos. O controle positivo foi a vacina viva *New-vacin* (cepa LaSota) da empresa Biovet®. O controle negativo foi a solução de PBS 0,1M, pH 7,4. As condições de amplificação do vírus da doença de Newcastle se encontram na tabela 2.

A reação de amplificação para o vírus da Influenza Aviária ocorreu com um ciclo de desnaturação a 50°C por 30 minutos, um ciclo a 94°C por 30 minutos, hibridização em 39 ciclos a 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e a extensão final em um ciclo a 72°C por 10 minutos mantidos a 4°C até o infinito. Os produtos amplificados foram armazenados a -20°C. O controle positivo foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Edson Durigon, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foi utilizado PBS 0,1M, pH 7,4 como controle negativo. As condições da reação encontram-se na tabela 2.

4.7.7 Eletroforese

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-Borato 0,045M, EDTA 1mM) e corados com *BlueGreen*® (LGC Biotecnologia® Ltda). O marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen™) foi usado, o resultado foi analisado por meio de um transiluminador e foto documentado por *Alpha Imager Mini Análises System* (Alpha Innotech®).

Tabela 2 – Sequência dos iniciadores, acesso ao *GenBank* e condições de reação (RT-PCR ou PCR) dos agentes estudados

Agente	Primers	Sequência (5'-3')	Nº acesso <i>GenBank</i>	Condições da PCR (°C/segundos)			Produto (bp)	Referência
				Desnaturação	Hibridização	Extensão		
<i>Paramyxovirus I</i>	NEW S	GGAGGATGTTGGCAGCATT	AJ629064.1	94/60	57/60	72/120	320	Stauber et al, 1995.
	NEW AS	GTCAACATATACACCTCATC						
Influenza Aviária	IA F	CCGAGATCGCACAGAGACTTGAAGAT	AF389121.1	94/60	57/60	72/120	311	Poddar, 2002.
	IA R	GGCAAGTGCACCAGCAGAATAACT						
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Mg F	CGTGGATATCTTTAGTTCCAGCTGC	FJ468422.1	94/30	55/30	72/30	481	Nascimento et al, 2005
	Mg R	GTAGCAAGTTATAATTTCCAGGCAT						
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Ms F	GAGAAGCAAAATAGTGATATCA	NR_044811.1	94/30	55/30	72/30	207	Lauerman et al., 1993
	Ms R	GAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA						

4.7.8 Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) para VNC, MG e MS

As amostras de soro coletadas das galinhas de “fundo de quintal” foram congeladas em freezer -20°C e encaminhadas, sob refrigeração ao laboratório AVIPA, em Campinas, no Estado de São Paulo. O *Kit* ELISA utilizado era da marca IDEXX®, com as partidas 09263-DH791, 06729-Mg201 e 0628-KG971 para NDV, Mg e Ms, respectivamente.

Os resultados do ELISA indireto se basearam nas informações de amostras positivas e negativas, para os três agentes pesquisados, recomendados pelo fabricante. Dessa forma, os soros que apresentaram títulos acima de 396 foram considerados positivos para o vírus da doença de Newcastle, enquanto os soros acima de 1.075 e 1.076 foram positivos, respectivamente, para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. O quadro 3 mostra estas informações. Os resultados obtidos em títulos foram transformados por um *software* do fabricante em um coeficiente de variação (C.V.).

Quadro 3 - Valores positivos para *Paramyxovírus* tipo 1, Mg e Ms preconizados pelo *Kit* IDDEX®

Agente	Diluição	Positivos	Títulos vacinais	
			Viva	Inativada
<i>Paramyxovirus tipo 1</i>	1:500	≥396	1000 a 4000	10000 a 32000
<i>M. gallisepticum</i>	1:500	≥1075		
<i>M. synoviae</i>	1:500	≥1076		

4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.8.1 Análise estatística com os dados obtidos das aves silvestres

A abundância aparente foi calculada como o número total de indivíduos capturados nas granjas, dividido pelo total de amostras coletadas por dia em cada local. A riqueza de espécies (S') se refere ao número total de espécies de aves registradas na granja.

O índice de diversidade Shannon (H') é um indicador bem reconhecido de

diversidade e equitabilidade de espécies para comunidades aviárias, e foi calculado de acordo com Tramer (1969).

O teste qui-quadrado foi utilizado na comparação das prevalências das espécies de aves em vida livre nas granjas G1, G2, G3 e BPN. Com a finalidade de se avaliar quais áreas estudadas diferiram entre si, foi utilizado o procedimento de Marascuilo. Para a avaliação da conformação corporal, presença de ácaros e presença de jovens foi utilizado o teste qui-quadrado.

4.8.2 Análise estatística com os dados obtidos das aves de subsistência

Os dados de sorologia foram submetidos a análise de variância (ANOVA) , e quando significativo foram submetidos ao teste de Tukey. Os valores foram transformados em logaritmo natural (ln) para a homogeneização dos dados e foi considerado o nível de significância de 5%. Para isso foi utilizado o programa Minitab versão 15.



5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados foram organizados em tabelas e gráficos.

5.1 PREVALÊNCIA DAS ESPÉCIES DE AVES SILVESTRES CAPTURADAS

A maior concentração de aves capturadas nas redes ocorreu entre seis (06) e sete (07) horas da manhã, com o nascer do sol, quando as aves saíam para se alimentar.

Na granja de reprodução foram coletadas 36 aves, na granja de postura 91 aves, na granja de corte 39 aves e na BPN foram coletas 97 aves.

No total das três granjas, foram capturadas 166 aves pertencentes a 20 espécies diferentes. Na BPN foram capturadas 97 aves pertencentes a 31 espécies. Todas as aves encontravam-se clinicamente saudáveis.

Houve uma média de 10,52 aves capturadas por dia. O número de aves amostradas por dia foi diferente entre os quatro locais. Todas as aves capturadas não estão ameaçadas de extinção pela União Internacional para a Conservação da Natureza, com a exceção do beija-flor (*Ramphodon naevius*) que está na lista de animais quase ameaçados de extinção (IUCN, 2012). A tabela 3 apresenta o tipo de produção, o nível de biosseguridade da granja, a estação do ano em que a coleta foi realizada e o tamanho do plantel da produção.

Tabela 3 - Diferenças de produção, biosseguridade, estação do ano e plantel das granjas

	Granja 1	Granja 2	Granja 3
Produção	Reprodução	Postura	Corte
Nível de Biosseguridade	Alta	Baixa	Baixa
Estação do Ano	Outono	Primavera/Verão	Inverno
Tamanho do plantel aproximado	70.000	550.000	25.000

Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Nas três granjas foram capturadas e identificadas 20 espécies diferentes do total de 166 aves. As espécies mais prevalentes foram o pardal (*Passer domesticus*) 55/166 (33,13%), o canário da terra (*Sicalis flaveola*) 37/166 (22,28%) e a rolinha-roxa (*Columbina talpacoti*) 25/166 (15%). Na área da Barragem Ponte Nova foram capturadas 97 aves e identificadas 31 espécies com maior prevalência do tico-tico (*Zonotrichia capensis*) 30/97 (30,92%), o sabiá-poca (*Turdus amaurochalinus*) 10/97 (10,3%) e o coleirinho (*Sporophila caerulences*) 6/97(6,18%) das aves.

Na granja G1 (reprodutoras) foram capturadas 36 aves de oito (08) famílias e 10 espécies, sendo estas: Trochilidae (*Ramphodon naevius*, n=1), Columbidae (*Columbina talpacoti*, n=4), Emberizidae (*Zonotrichia capensis*, n=3), Parulidae (*Basileuterus culicivorus*, n=1), Passeridae (*Passer domesticus*, n=20), Thraupidae (*Tachyphonus coronatus*, n=1 e *Thraupis sayaca*, n=1), Turdidae (*Turdus amaurochalinus*, n=2) e Tyrannidae (*Pitangus sulphuratus*, n=1 e *Todirostrum cinereum*, n=2).

Dentre as 91 aves capturadas na granja G2 (postura) existiram nove (09) famílias e 14 espécies, sendo estas: Trochilidae (*Chlorostilbon aureoventris*, n=1), Columbidae (*Columbina talpacoti*, n=19), Emberizidae (*Zonotrichia capensis*, n=4), Furnariidae (*Furnarius rufus*, n=4), Icteridae (*Chrysomus ruficapillus*, n=8 e *Molothrus bonariensis*, n=7), Passeridae (*Passer domesticus*, n=4), Thraupidae (*Sicalis flaveola*, n=37), Turdidae (*Turdus amaurochalinus*, n=1, *Turdus flavipes*, n=1 e *Turdus rufiventris*, n=1), Tyrannidae (*Elaenia flavogaster*, n=2, *Fluvicola nengeta*, n=1 e *Pitangus sulphuratus*, n=1).

Na granja G3 (frango de corte) foram capturadas 39 aves de sete (07) famílias e sete (07) espécies, sendo estas: Columbidae (*Columbina talpacoti*, n=2), Emberizidae (*Zonotrichia capensis*, n=1), Furnariidae (*Furnarius rufus*, n=2), Icteridae (*Chrysomus ruficapillus* n=1), Passeridae (*Passer domesticus*, n=31), Troglodytidae (*Troglodytes aedon*, n=1) e Turdidae (*Turdus amaurochalinus*, n=1).

Na área da Barragem Ponte Nova foram capturadas 97 aves de 13 famílias e 31 espécies, sendo estas: Coerebidae (*Coereba flaveola*, n=2), Fringilidae (*Sporagra Magellanica*, n=1 e *Euphonia violácea*, n=1), Columbidae (*Columbina talpacoti*, n=3 e *Patagioenas plúmbea*, n=1), Conopophagidae (*Conopophaga lineata*, n=3), Emberizidae (*Zonotrichia capensis*, n=30, *Sporophila falcirostris*, n=1, *Sporophila angolensis*, n=1, *Sporophila caerulences*, n=6 e *Volantinia jacarina*, n=2), Furnariidae (*Furnarius rufus*,

n=3, *Synallaxis frontalis*, n=1, *Synallaxis ruficapilla*, n=1 e *Phacellodomus erythrophthalmus*, n=1), Parulidae (*Geothlypis aequinoctialis*, n=2), Pipridae (*Neopelma chrysolophum*, n=1), Thraupidae (*Sicalis flaveola*, n=2, *Tachyphonus coronatus*, n=3 e *Twyopsis sordida*, n=2), Troglotydae (*Troglodytes musculus*, n=1), Turdidae (*Turdus amaurochalinus*, n=10 e *Turdus rufiventris*, n=2), Tyrannidae (*Pitangus sulphuratus*, n=2, *Mionectes rufiventris*, n=2, *Camptostoma obsoletum*, n=3, *Platyrinchus mystaceus*, n=3, *Myiarchus swansoni*, n=1, *Myiozetetes similis*, n=2, *Myiophobus fasciatus*, n=1) e Vireonidae (*Vireo olivaceus*, n=3). Estes resultados se encontram na tabela 4.

Entre as famílias identificadas nos quatro locais de captura foram encontradas: Passeridae 55/263 (20,91%), Emberezidae 48/263 (18,25%), Thraupidae 46/263 (17,49%), Columbidae 29/293 (11,02%), Tyrannidae 21/263 (7,98%), Turdidae 18/263 (6,84%), Icteridae 16/263 (6,08%), Furnariidae 12/263 (4,56%), Conopophagidae 3/263 (1,14%), Parulidae 3/263 (1,14%), Vireonidae 3/263 (1,14%) Coerebidae 2/263 (0,76%), Trochilidae 2/263 (0,76%), Fringilidae 2/263 (0,76%), Troglotydae 2/263 (0,76%), Pipridae 1/263 (0,38%). A figura 18 mostra a porcentagem das diferentes famílias de aves capturadas durante o período de estudo.

Tabela 4 - A riqueza de espécies capturadas, a abundância aparente e o índice de diversidade Shannon de aves capturadas nas granjas e na BPN

	(Continua)				
	G1	G2	G3	BPN	Total
Coerebidae					
<i>Coereba flaveola</i>	-	-	-	2 [2%]	2 [0,76%]
Trochilidae					
<i>Chlorostilbon aureoventris</i>	-	1 [1%]	-	-	1 [0,38%]
<i>Ramphodon naevius</i>	1 [3%]	-	-	-	1 [0,38%]
Fringilidae					
<i>Sporagra magellanica</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
<i>Euphonia violácea</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
Columbidae					
<i>Columbina talpacoti</i>	4 [11%]	19 [21%]	2 [5%]	3 [3%]	28 [10,64%]
<i>Patagioenas plúmbea</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
Conopophagidae					
<i>Conopophaga lineata</i>	-	-	-	3 [3%]	3 [1,14%]
Emberizidae					
<i>Zonotrichia capensis</i>	3 [8%]	4 [4%]	1 [3%]	30 [31%]	38 [14,44%]
<i>Sporophila falcirostris</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
<i>Sporophila angolensis</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
<i>Sporophila caerulescens</i>	-	-	-	6 [6%]	6 [2,5%]
<i>Volatinia jacarina</i>	-	-	-	2 [2%]	2 [0,76%]
Furnariidae					
<i>Furnarius rufus</i>	-	4 [4%]	2 [5%]	3 [3%]	9 [3,42%]
<i>Synallaxis frontalis</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
<i>Synallaxis ruficapilla</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
<i>Phacellodomus erythrophthalmus</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
Icteridae					
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	-	8 [9%]	1 [3%]	-	9 [5%]

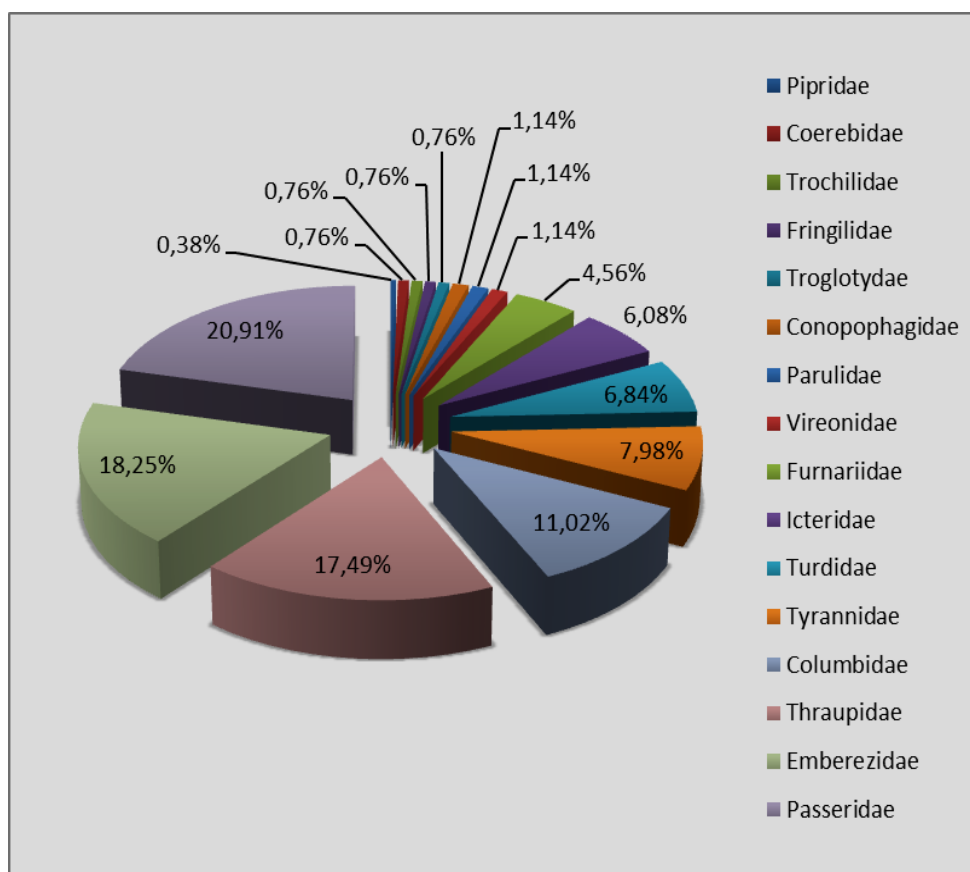
	G1	G2	G3	BPN	Total
<i>Molothrus bonariensis</i>	-	7 [8%]	-	-	7 [2,5%]
Parulidae					
<i>Basileuterus culicivorus</i>	1 [3%]	-	-	-	1 [0,38%]
<i>Geothlypis aequinoctialis</i>	-	-	-	2 [2%]	2 [0,76%]
Passeridae					
<i>Passer domesticus</i>	20 [56%]	4 [4%]	31 [79%]	-	55 [20,91%]
Pipridae					
<i>Neopelma chrysolophum</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
Thraupidae					
<i>Sicalis flaveola</i>	-	37 [41%]	-	2 [2%]	39 [14,82%]
<i>Tachyphonus coronatus</i>	1 [3%]	-	-	3 [3%]	4 [1,52%]
<i>Thraupis sayaca</i>	1 [3%]	-	-	-	1 [0,38%]
<i>Thlypopsis sordida</i>	-	-	-	2 [2%]	2 [0,76%]
Troglotyidae					
<i>Troglodytes aedon</i>	-	-	1 [3%]	-	1 [0,38%]
<i>Troglodytes musculus</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
Turdidae					
<i>Turdus amaurochalinus</i>	2 [6%]	1 [1%]	1 [3%]	10 [10%]	14 [5,32%]
<i>Turdus flavipes</i>	-	1 [1%]	-	-	1 [0,38%]
<i>Turdus rufiventris</i>	-	1 [1%]	-	2 [2%]	3 [1,14%]
Tyrannidae					
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	2 [2%]	-	-	2 [0,76%]
<i>Fluvicola nengeta</i>	-	1 [1%]	-	-	1 [0,38%]
<i>Pitangus sulphuratus</i>	1 [3%]	1 [1%]	-	2 [2%]	4 [1,52%]
<i>Todirostrum cinereum</i>	2 [6%]	-	-	-	2 [0,76%]
<i>Mionectes rufiventris</i>	-	-	-	2 [2%]	2 [0,76%]
<i>Camptostoma obsoletum</i>	-	-	-	3 [3%]	3 [1,14%]
<i>Platyrinchus mystaceus</i>	-	-	-	3 [3%]	3 [1,14%]
<i>Myiarchus swansoni</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
<i>Myiozetetes similis</i>	-	-	-	2 [2%]	2 [0,76%]
<i>Myiophobus fasciatus</i>	-	-	-	1 [1%]	1 [0,38%]
Vireonidae					
<i>Vireo olivaceus</i>	-	-	-	3 [3%]	3 [1,14%]

(Continua)

					(Conclusão)
Total de indivíduos (N)	36	91	39	97	263
Esforço amostral (dias)	4	4	5	12	23
Abundância aparente (N / esforço amostral)	9,0	22,75	7,8	8,1	11,43
Riqueza de espécies (S)	10	14	7	31	43
Riqueza de espécies / Total de indivíduos (S / N)	0,278	0,153	0,179	0,319	0,163
Índice de diversidade Shannon (H')	1,60	1,90	0,86	2,81	2,78

Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

Figura 18 - Famílias de aves capturadas nas granjas e BPN



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

5.2.1 Comparação das frequências de espécies mais prevalentes entre as granjas e BPN

A comparação da ocorrência das duas espécies mais prevalentes (*Zonotrichia capensis* e *Passer domesticus*) segundo a localidade foi realizada por meio do teste qui-quadrado considerando o nível de significância de 0,05. Foi observada uma diferença significativa nas duas espécies capturadas ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$). As tabelas 5 e 6 mostram a porcentagem destas espécies em relação às demais espécies capturadas neste estudo.

Com a finalidade de se avaliar as diferenças entre as populações das áreas estudadas, foi utilizado o procedimento de Marascuilo. Para a espécie *Zonotrichia capensis*, a 0,05 de significância, existiu diferença estatística nos dados obtidos na área da BPN em relação aos demais locais de captura. Para a espécie *Passer domesticus* foi demonstrada diferença significativa ($p < 0,05$) no número de aves capturadas na granja G1 em relação à granja G3 e a área da BPN, assim como no número de aves da granja G3 em relação a granja G2 e a área da BPN.

Tabela 5 - Presença de *Zonotrichia capensis* em relação às demais espécies capturadas nos locais estudados

Espécie	Ocorrência de <i>Zonotrichia capensis</i>			
	G1	G2	G3	BPN
<i>Z. capensis</i>	3 (8,3%)	4 (4,4%)	1 (2,6%)	30 (30,9%)
Demais espécies	33 (91,7%)	87 (95,6%)	38 (97,4%)	67 (69,1%)
Total	36 (100%)	91 (100%)	39 (100%)	97 (100%)

Fonte: Guimarães, M.B. (2012)

Tabela 6 - Presença de *Passer domesticus* em relação às demais espécies capturadas nos locais estudados

Espécie	Ocorrência de <i>Passer domesticus</i>			
	G1	G2	G3	BPN
<i>P. domesticus</i>	20 (55,6%)	4 (4,4%)	31 (79,5%)	0 (0%)
Demais espécies	16 (44,4%)	87 (95,6%)	8 (20,5%)	97 (100%)
Total	36 (100%)	91 (100%)	39 (100%)	97 (100%)

Fonte: Guimarães, M.B. (2012)

5.3 AVALIAÇÃO DAS AVES SILVESTRES

As aves silvestres não apresentaram alterações clínicas. Foram avaliadas quanto à idade, condição corpórea e presença de ectoparasitas. Nas três espécies mais prevalentes, ou seja, *Passer domesticus* (33%), *Sicalis flaveola* (22%) e *Columbina talpacoti* (15%) estas condições foram comparadas. O teste qui-quadrado foi utilizado com um nível de significância de 0,05. No total de indivíduos, houve diferença estatisticamente significativa de *P.domesticus* e *S. flaveola*. Na granja G1 foi encontrada uma ave, *P.domesticus*, com condição corporal regular 5% (1/20). Na granja G2, esta condição ocorreu em 21% (3/14) de *C. talpacoti*, em 25% (1/4) de *P. domesticus* e em 15% (4/26) de *S. flaveola*, enquanto na granja G3 ocorreu em 50% (1/2) de *C. talpacoti* e em 60% (18/30) de *P. domesticus*. A porcentagem de condição corporal regular a ruim foi estatisticamente significativa em *P.domesticus* quando comparado as outras espécies *S. flaveola* e *C. talpacoti*. A detecção de ácaros ocorreu em 35% (7/20) de *P.domesticus* e sem ocorrência nas outras espécies em G1. Na granja G2 foram encontradas em 15% (2/13) em *C. talpacoti*, 38% (10/26) em *S. flaveola* e não houve ocorrência em *P. domesticus*. Na granja G3 foram detectados ácaros em 60%(18/30) em *S. flaveola*, sem ocorrência nas outras duas espécies. A porcentagem de ácaros analisada estatisticamente para *P. domesticus* não foi significativa.

Dezoito aves apresentaram ácaros de penas e condição corporal de regular a ruim: uma ave (6%) foi capturada na granja G1, cinco (27%) na granja G2 e doze (67%) na granja G3. Dessas aves, 13/18 (72%) eram *P. domesticus*, 4/18 (22%) eram *S. flaveola* e 1/18 (6%) de *C. talpacoti*. Com relação a idade, 70% (7/10) dos jovens eram *P.domesticus* e 33% (1/3) eram *C. talpacoti* capturados na granja G1, 38% (5/13) eram *S. flaveola* capturados na granja G2 e 32% (10/31) eram *P.domesticus* capturados na granja G3.

Os dados de idade, da conformação de musculatura peitoral e da presença de ácaros de cada ave capturada nas granjas G1, G2 e G3 em ordem de captura, se encontram nas tabelas 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

Tabela 7 - Condição corporal, idade e presença de ácaros em aves capturadas na granja G1

Aves capturadas na granja G1 (n= 36 aves)			
Espécie	Idade	Condição Corporal	Ácaros
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Ramphodom naevius</i>	Adulto	Regular	Não
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Indet	Boa	Não
<i>Thraupis sayaca</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Basileuterus culicivorus</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Sim
<i>Todirostrum cinereum</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Todirostrum cinereum</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Tachyphonus coronatus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Zonotrichia capensis</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Zonotrichia capensis</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Zonotrichia capensis</i>	Adulto	Boa	Sim

Fonte: Guimarães, M.B. (2012)

Tabela 8 - Condição corporal, idade e presença de ácaros em aves capturadas na granja G2 (Continua)

Aves capturadas na granja G2 (n= 91 aves)			
Espécie	Idade	Condição corporal	Ácaros
<i>Chlorostilbon aureoventris</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Elaenia flavogaster</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Elaenia flavogaster</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Molothrus bonariensis</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Platycichla flavipes</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Furnarium rufus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Furnarium rufus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Pitangus sulphuratus</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Zonotrichia capensis</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Jovem	Regular	Sim
<i>Zonotrichia capensis</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Regular	Sim
<i>Zonotrichia capensis</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Molothrus bonariensis</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Jovem	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	N/A	N/A
<i>Molothrus bonariensis</i>	Indeterminado	N/A	N/A
<i>Molothrus bonariensis</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Molothrus bonariensis</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Molothrus bonariensis</i>	Jovem	N/A	N/A
<i>Molothrus boanriensis</i>	Jovem	Boa	Sim
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Furnarius rufus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Jovem	Regular	Sim

			(Conclusão)
Espécie	Idade	Condição corporal	Ácaros
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	N/A	N/A
<i>Sicalis flaveola</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Regular	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Regular	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Columbiana talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Sicalis flaveola</i>	Jovem	Regular	Sim
<i>Columbina talpacoti</i>	Indeterminado	Regular	Sim
<i>Columbina talpacoti</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Zonotrichia capensis</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Sicalis flaveola</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Indeterminado	Boa	Sim
<i>Columbina talpacoti</i>	Indeterminado	N/A	Na
<i>Turdus rufiventris</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Adulto	Regular	Não
<i>Furnarius rufus</i>	Adulto	N/A	Na
<i>Fluvicola nengeta</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Jovem	Regular	Não
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Indeterminado	Regular	Não
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Chrysomus ruficapillus</i>	Jovem	Boa	Não

N/A = não avaliado

Fonte: Guimarães, M.B. (2012)

Tabela 9- Condição corporal, idade e presença de ácaros em aves capturadas na granja G3

Aves capturadas na granja G3 (n=39 aves)			
Espécie	Idade	Condição corporal	Ácaros
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Turdus amaurochalinus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Regular	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Não
<i>Agelaius ruficapillus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	N/A	N/A
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Não
<i>Furnarius rufus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Troglodytes aedon</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Regular	Não
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Boa	Não
<i>Zonotrichia capensis</i>	Adulto	Regular	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Regular	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Ruim	Não
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Furnarius rufus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Ruim	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Boa	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Jovem	Regular	Sim
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Sim
<i>Columbina talpacoti</i>	Adulto	Boa	Não
<i>Passer domesticus</i>	Adulto	Regular	Sim

N/A= não avaliado

Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

Tabela 10 - Número total de indivíduos, porcentagem de aves em condição corporal regular ou ruim, porcentagem de jovens, e porcentagem de aves com ácaros em penas nas três espécies dominantes nas granjas estudadas.

	Granja 1	Granja 2	Granja 3	P
Total de indivíduos (N)				
<i>C. talpacoti</i>	4	19	2	0,054
<i>P. domesticus</i>	20	4	31	< 0,001
<i>S. flaveola</i>	-	37	-	< 0,001
Porcentagem de condição corpórea regular ou ruim				
<i>C. talpacoti</i>	0% (0/4)	21% (3/14)	50% (1/2)	nt
<i>P. domesticus</i>	5% (1/20)	25% (1/4)	60% (18/30)	< 0,001
<i>S. flaveola</i>	-	15% (4/26)	-	nt
Porcentagem de jovens				
<i>C. talpacoti</i>	33% (1/3)	0% (0/14)	0% (0/2)	nt
<i>P. domesticus</i>	70% (7/10)	0% (0/2)	32% (10/31)	nt
<i>S. flaveola</i>	-	38% (5/13)	-	nt
Porcentagem de ácaros em penas				
<i>C. talpacoti</i>	0% (0/4)	15% (2/13)	0% (0/2)	nt
<i>P. domesticus</i>	35% (7/20)	0% (0/4)	60% (18/30)	0,077
<i>S. flaveola</i>	-	38%(10/26)	-	nt

nt= não testado

Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

5.4 PCR e RT-PCR EM AMOSTRAS DE AVES SILVESTRES

As aves silvestres apresentaram resultados negativos em 263/263 (100%) das aves coletadas para os quatro agentes pesquisados, nas granjas G1, G2, G3, G4 e BPN.

5.5 PESQUISA DE TÍTULO DE ANTICORPOS EM AVES DE SUBSISTÊNCIA

A criação GS1 apresentou 97,29% de títulos positivos para o vírus da doença de Newcastle (VDN), 97,29% para Mg e 100% para Ms. A criação GS2 apresentou 97,14% de títulos positivos para VDN, 51,42% para Mg e 100% para Ms. A criação GS3 apresentou títulos positivos em 72,72% para VDN, 63,63% para Mg e 72,72% para Ms. A criação GS4, apresentou títulos positivos para VDN em 90,90% das amostras e em 100% das amostras de soro tanto para Mg como para Ms.

Com relação aos diferentes agentes estudados, os títulos de anticorpos variaram entre as aves analisadas. Na pesquisa de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle, houve maior variabilidade entre as aves das criações GS2 e GS4, além de apresentarem títulos mais altos. As aves das criações GS1 e GS3 apresentaram títulos menores e com menor variabilidade.

Na pesquisa de anticorpos contra *Mycoplasma gallisepticum* houve maior variabilidade nos títulos dos soros das aves da criação GS4, além desses títulos serem mais altos. As propriedades GS1, GS2 e GS3 apresentaram títulos menores.

Nas amostras de soro das aves da criação GS4 também ocorreu maior variabilidade e títulos de anticorpos mais altos contra *Mycoplasma synoviae*. As propriedades GS1, GS2 e GS3 apresentaram títulos menores. As tabelas 11, 12, 13 e 14, mostram os títulos de anticorpos para os agentes acima citados nas criações de subsistência GS1, GS2, GS3 e GS4.

Tabela 11 - Títulos de IgG sérica encontrados na reação de ELISA nas aves da criação GS1

CRIAÇÃO GS1			
AVE	ELISA NC	ELISA Mg	ELISA Ms
1	438	1.669	2.648
2	2.291	4.940	5.526
3	246	7.925	16.582
4	1.372	3.637	6.244
5	2.436	3.324	19.379
6	1.848	10.265	9.333
7	2.706	11.164	10.783
8	626	952	1.848
9	497	6.320	6.119
10	1.097	6.584	4.707
11	1.170	4.103	11.292
12	1.404	2.047	4.221
13	1.892	4.813	20.804
14	705	3.113	3.993
15	929	4.403	2.835
16	1.665	4.747	4.999
17	1.609	6.606	9.387
18	1.762	14.204	11.307
19	911	4.082	11.555
20	2.003	3.406	7.032
21	2.025	7.521	12.488
22	848	5.703	3.730
23	1.277	3.344	3.234
24	1.684	15.153	7.700
25	2.368	16.062	13.598
26	1.341	5.464	6.682
27	1.320	5.071	12.592
28	2.057	6.917	5.478
29	716	10.265	6.857
30	4.747	15.342	22.584
31	1.740	3.448	17.676
32	1.806	7.722	15.129
33	869	3.324	7.510
34	1.170	9.190	9.168
35	1.067	4.082	7.133
36	1.577	17.204	15.372
37	684	5.790	5.636

Fonte : Guimarães, M. B. (2012)

Tabela 12 - Títulos de IgG sérica encontrados na reação de ELISA nas aves da criação de subsistência GS2

CRIAÇÃO GS2			
AVE	ELISA NC	ELISA Mg	ELISA Ms
38	983	839	2.371
39	14.326	3.850	5.749
40	11.509	3.468	9.592
41	848	1.789	2.800
42	407	317	1.218
43	675	730	1.973
44	675	1.104	1.757
45	626	730	1.826
46	869	1.988	12.566
47	890	1.104	1.949
48	427	198	1.601
49	2.381	1.949	5.427
50	828	583	1.413
51	497	334	1.592
52	869	492	1.961
53	341	403	2.557
54	983	990	1.592
55	1.213	934	3.564
56	418	386	2.602
57	655	673	2.383
58	828	637	4.234
59	1.599	1.239	4.962
60	2.706	15.459	26.230
61	878	7.029	12.606
62	1.555	13.193	18.805
63	3.275	952	2.975
64	1.097	6.295	3.422
65	23.137	1.473	6.257
66	1.013	2.291	2.729
67	950	9.373	16.365
68	5.210	2.802	12.592
69	1.684	3.871	6.807
70	1.076	934	2.040
71	3.556	1.230	5.269
72	1.894	3.800	8.997

Fonte : Guimarães, M. B. (2012)

Tabela 13 - Títulos de IgG sérica encontrados na reação de ELISA nas aves da criação de subsistência GS3

CRIAÇÃO GS3			
AVE	ELISA NC	ELISA Mg	ELISA Ms
73	1.543	386	592
74	388	1.104	1.130
75	182	748	842
76	1.097	1.337	1.425
77	644	1.277	1.142
78	1.097	5.354	6.769
79	574	1.413	2.233
80	514	1.337	1.425
81	427	619	561
82	341	1.048	1.130
83	777	1.769	1.757

Fonte : Guimarães, M. B. (2012)

Tabela 14 - Títulos de IgG sérica encontrados na reação de ELISA nas aves da criação de subsistência GS4

CRIAÇÃO GS4			
AVE	ELISA NC	ELISA Mg	ELISA Ms
84	2.323	15.983	13.624
85	858	17.924	11.241
86	1.055	13.546	13.266
87	941	2.474	10.823
88	1.298	2.413	5.478
89	3.288	4.382	16.718
90	6.657	13.474	28.790
91	2.156	14.771	20.391
92	3.080	29.887	28.931
93	313	1.220	16.879
94	786	1.277	13.584

Fonte: Guimarães, M. B. (2012)

Para a análise estatística, os valores de anticorpos foram transformados em logaritmo natural (ln) e foi demonstrado que as aves da criação GS3 tiveram uma média de anticorpos contra VDN significativamente menor que a dos demais grupos de aves estudadas (P=0,018). Os resultados da análise de variância e teste de Tukey (P<0,05) estão demonstrados nas tabelas 15.

Tabela 15 - Títulos de anticorpos séricos através de ELISA para Newcastle, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* (ln)

GRUPOS	ELISA NC		ELISA Mg		ELISA Ms	
	Média	CV (%)	Média	CV (%)	Média	CV (%)
GS 1	7,2 a	8,03	8,6 a	7,73	9,0 b	6,92
GS 2	7,2 a	13,9	7,3 b	14,98	8,3 c	10,09
GS 3	6,4 b	9,62	7,1 b	9,39	7,2 d	9,53
GS 4	7,3 a	11,61	8,8 a	13,19	9,6 a	4,90
Valor de P	0,018		0,000		0,000	

Letras diferentes nas colunas diferem entre si ao nível de significância 5%.

Com relação aos dados encontrados na reação de ELISA para Mg e Ms, ocorreu diferença estatística significativa entre as aves das diferentes criações estudadas ($P < 0,05$).

Com relação a Mg, a média de detecção de anticorpos foi significativamente menor nas aves das criações GS2 e GS3 quando esta foi comparada as aves da criação GS1 e GS4.

Com relação a Ms, verificou-se que houve diferença significativa ($P = 0,000$) entre todas as aves das criações estudadas, sendo as aves da GS4 as que apresentaram maior média (9,6) e aquelas da GS3 as que apresentaram a menor média (7,2).

As figuras 19, 20 e 21 mostram os gráficos em boxplot, com as concentrações de anticorpos em logaritmo natural contra o vírus da DNC, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. As figuras 22, 23 e 24 mostram as médias das concentrações de anticorpos(ln) para DNC, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* entre as criações estudadas

Figura 19- Comparação das concentrações séricas de IgG, em logaritmo natural (ln) contra a doença de Newcastle nas criações de aves de subsistência

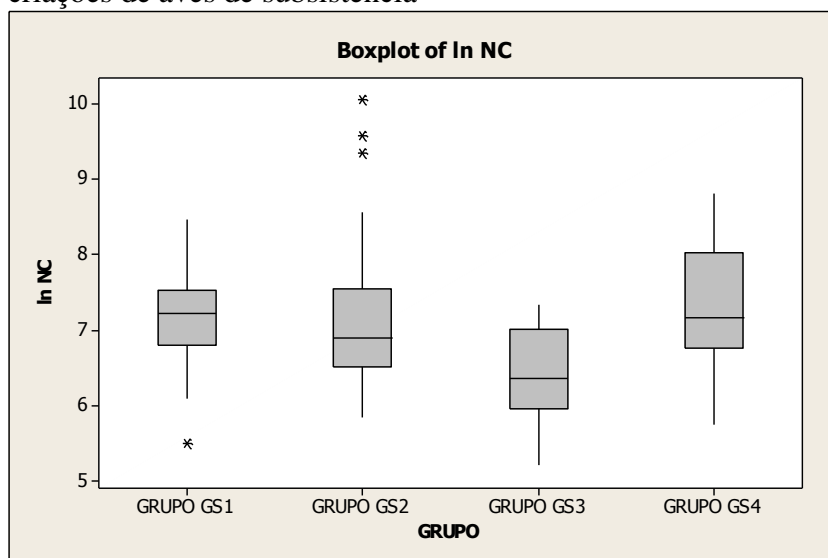


Figura 20 - Comparação das concentrações séricas de IgG, em logaritmo natural (ln) contra *Mycoplasma gallisepticum* nas criações de aves de subsistência

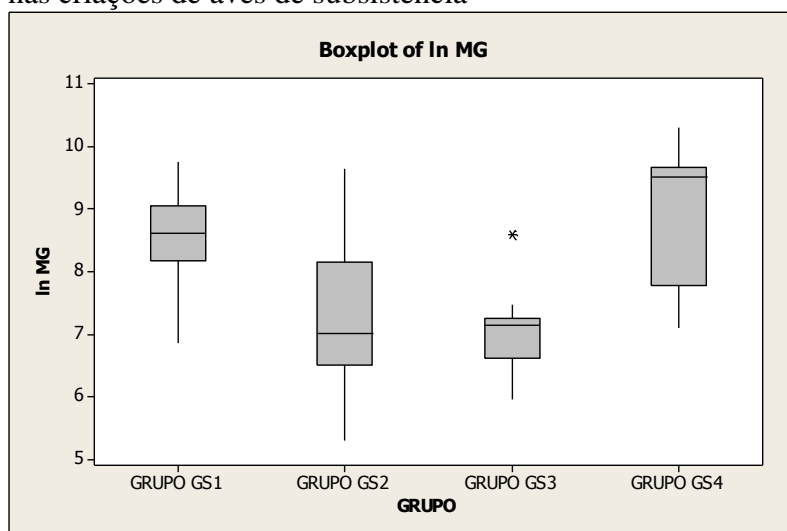


Figura 21 - Comparação das concentrações séricas de IgG, em logaritmo natural (ln), contra *Mycoplasma synoviae* nas criações de aves de subsistência

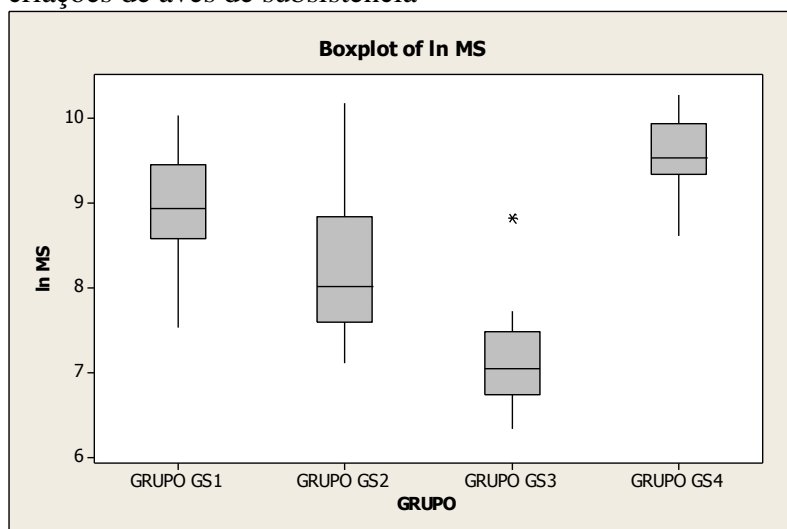


Figura 22 - Média das concentrações de anticorpos para DNC (ln) nas aves das diferentes criações de aves de subsistência estudadas

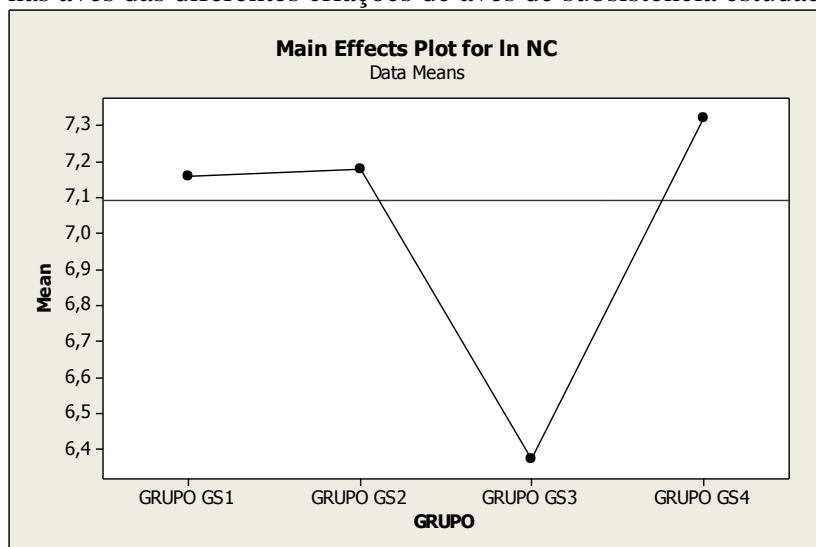


Figura 23 - Média das concentrações de anticorpos para Mg (ln) nas aves das diferentes criações de aves de subsistência estudadas

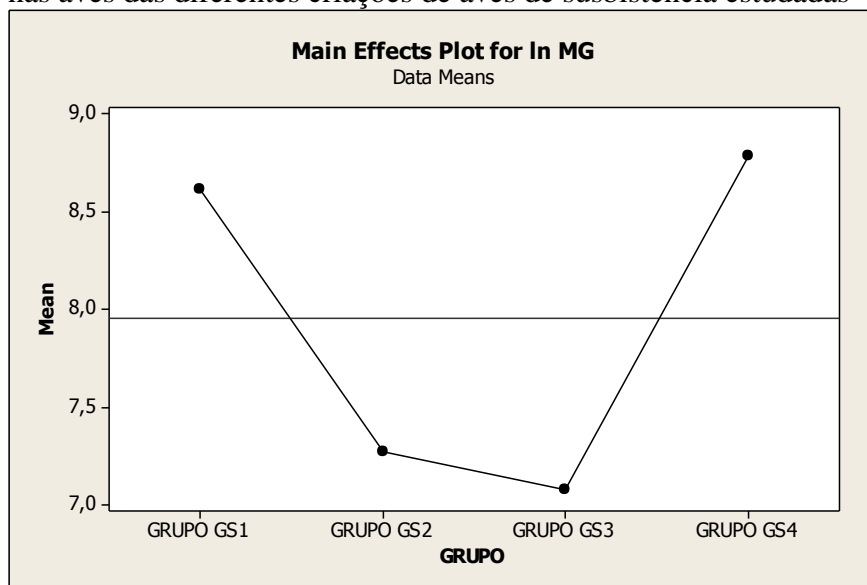
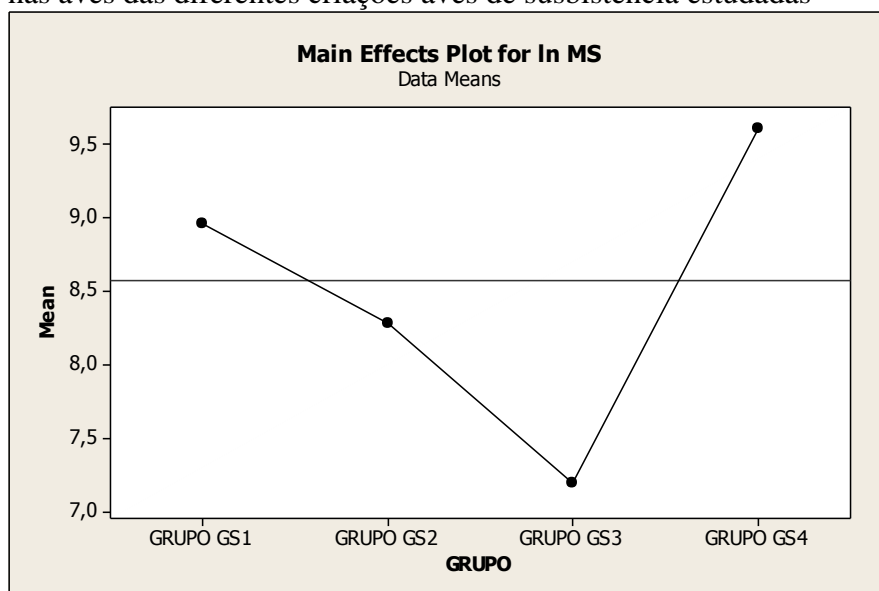


Figura 24 - Média das concentrações de anticorpos para Ms (ln), nas aves das diferentes criações aves de subsistência estudadas



5.6 PCR e RT-PCR EM AMOSTRAS DE AVES DE SUBSISTÊNCIA

As amostras das aves da criação GS1 (n=37) apresentaram resultados negativos tanto para a detecção do vírus de Newcastle como para o vírus da Influenza A, pela técnica de RT-PCR. No entanto, 24 amostras foram positivas para *Mycoplasma gallisepticum* 24/37 (64,86%) e 25 para *Mycoplasma synoviae* 25/37 (67,56%) pela técnica da PCR. Mg e Ms foram detectados simultaneamente em 18 aves. Não houve detecção do VDN e do vírus da Influenza A nas amostras coletadas na criação GS2 (n=35). As amostras das aves apresentaram resultados positivos 3/35 (8,57%) na detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e de 32/35 (91,42%) de *Mycoplasma synoviae* pela técnica da PCR. Mg e Ms foram detectados simultaneamente em uma ave.

Todas as amostras coletadas das aves da criação GS3 (n=11) foram negativas para os agentes estudados por métodos moleculares e o mesmo ocorreu nas amostras coletadas das aves da criação GS4 (n=11).

Para a comparação da proporção de positividade entre os locais de estudo, foi realizada apenas a estatística descritiva. As tabelas 16 e 17 comparam os resultados da PCR para Mg e Ms e a figura 25 mostra os resultados positivos em eletroforese.

Tabela 16 – Comparação dos resultados da PCR para Mg nas criações de subsistência

Local	Resultados de PCR para <i>Mycoplasma gallisepticum</i>			
	GS1	GS2	GS3	GS4
Positivos	24 (64,86%)	3 (8,57%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativos	13 (35,14%)	32 (91,42%)	11 (100%)	11 (0%)
Total	37 (100%)	35 (100%)	11 (100%)	11 (100%)

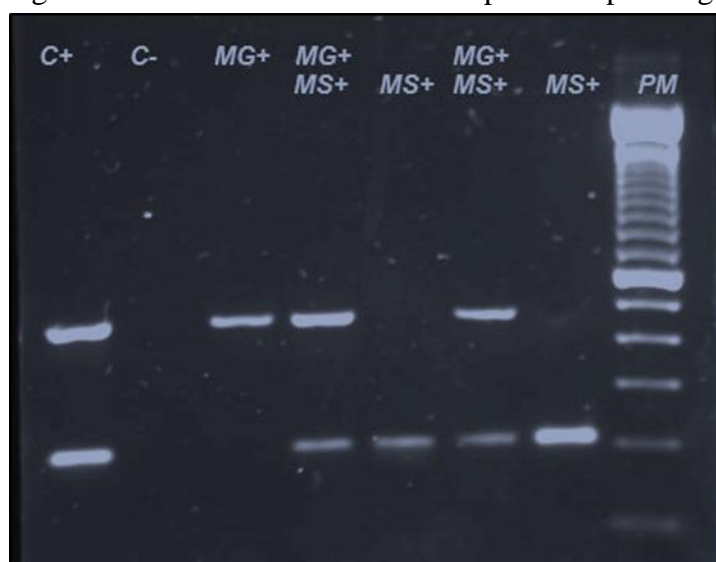
Fonte – Guimarães, M. B. (2012)

Tabela 17 - Comparação dos resultados da PCR para Ms nas criações de subsistência

Local	Resultados de PCR para <i>Mycoplasma synoviae</i>			
	GS1	GS2	GS3	GS4
Positivos	25 (67,6%)	32 (91,4%)	0 (0%)	0 (0%)
Negativos	12 (32,4%)	3 (8,6%)	11 (100%)	11 (100%)
Total	37 (100%)	35 (100%)	11 (100%)	11 (100%)

Fonte : Guimarães, M. B. (2012)

Figura 25- Eletroforese das amostras positivas para Mg e Ms



Fonte: Guimarães, M. B. (2012)



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As três espécies dominantes nas granjas estudadas foram: o pardal (*Passer domesticus*), o canário da terra (*Sicalis flaveola*) e a rolinha roxa (*Columbina talpacoti*), correspondendo a 70% de todas as aves capturadas nas granjas.

Este estudo observou que os índices de diversidade e equitabilidade foram consideravelmente baixos. Este resultado era esperado, uma vez que as granjas estavam localizadas em paisagens de moderado a alto impacto humano, próximas aos centros urbanos onde a diversidade e heterogeneidade são relativamente pequenas quando comparadas as áreas naturais de Mata Atlântica (DANTAS; ROCHA, 2005). Nestes locais, *P. domesticus* apresenta uma alta capacidade de adaptação e quando presentes expulsam outras espécies de aves (SICK, 1997). Neste estudo foi capturado um número maior de *P. domesticus* nas granjas G1 e G3, ou seja, locais com maior degradação do ambiente, do que na Barragem Ponte Nova, uma área com maior preservação ambiental. Estes resultados corroboram os de Macgregor-Fors et al. (2010) e Marzluff (2001).

As áreas avícolas são habitats favoráveis para as aves sinantrópicas, como os pardais (*Passer domesticus*) e por isso são residentes comuns encontrados nas granjas (GOODMAN; HANSON, 1988).

Scherer et al. (2011) relataram a presença de *S. flaveola* e *C. talpacoti* como as aves mais frequentes em duas granjas de corte. Os resultados encontrados na granja G3 (frangos de corte) discordam deste estudo, uma vez que a espécie predominante foi de *P. domesticus* (n=31). Fontana; Burger; Magnusson (2011) usando *playbacks* de voz encontraram *P. domesticus* e pombos *Columba livia* como as aves mais prevalentes em áreas urbanas. Dessa forma, estas espécies são exemplos clássicos de espécies invasoras urbanas e conhecidas pela dominância nas comunidades aviárias tanto em regiões urbanas quanto rurais por todo o mundo (MARZLUFF, 2001).

A relação entre a composição e pobre diversidade das comunidades de aves em áreas de granja está associada à perda da qualidade do habitat em áreas urbanas e/ou agrícolas. Os fatores que podem contribuir para isso incluem a ocupação irregular com alta densidade de casas e a pobre diversidade de árvores plantadas na ornamentação de ruas (TOLEDO; DONATELLI; BATISTA, 2011).

A perda de habitat tem efeito na população das comunidades de animais silvestres e ao longo tempo podem trazer consequências diretas às populações, impossibilitando a manutenção e sustentação das espécies (POSS; BIEK; RODRIGO, 2002).

Embora as granjas G1 e G2 se situam na mesma região e dividindo as características de clima e paisagem, neste estudo foram encontrados diferentes padrões na composição da avifauna. A granja de reprodução (G1) apresentava segurança estrita, incluindo a prevenção da entrada de aves de vida livre dentro das instalações e estava mais isolada de fragmentos de vegetação. Esta área tinha abundância aparente moderada de espécies, mas pobre diversidade de aves capturadas, com a predominância de *P. domesticus*.

A granja de postura (G2) caracterizada pela baixa biosseguridade, estava envolta por árvores de eucaliptos e pinus e apresentava diferenças na composição da avifauna com a co-dominância de *S. flaveola* e *C. talpacoti*, sugerindo um padrão de pacificidade entre essas espécies, enquanto foi observada uma menor prevalência aparente para *P. domesticus*. O comportamento gregário e o territorialismo agressivo do canário da terra (*S. flaveola*) em relação ao pardal (*P. domesticus*) (SICK, 1997) pode ter contribuído para existir a dominância desta espécie. A maior prevalência aparente de *S. flaveola* pode ser consequência da disponibilidade de alimento encontrada tanto nos comedouros dos galpões com ausência de telas, quanto no chão pelo transporte de ração feita por caminhões, pois as aves não tiveram que buscar outras áreas para se alimentar. A disponibilidade de alimento é um dos fatores que determina a permanência de espécies de aves em um ambiente (TOLEDO; DONATELLI; BATISTA, 2011).

Outro fator a ser considerado é a proximidade entre a granja e a área da BPN, aumentando a possibilidade de contato entre as aves silvestres e as aves de produção. *Sicalis flaveola*, encontrada na granja G2, é um dos pássaros mais populares entre as aves traficadas ilegalmente no Brasil, e mantido em cativeiro pela comunidade rural (RENCTAS, 2002). Quando apreendida por autoridades locais, são frequentemente soltas para a natureza (MARCONDES-MACHADO, 1988), assim como ocorre na Barragem Ponte Nova que é uma área de soltura do Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo. (LONGO et al., 2008).

A dominância de *P. domesticus* nas granjas G1 e G3, provavelmente está associada a sua grande capacidade de colonizar e reproduzir em áreas urbanas e rurais, além do seu comportamento agressivo que influencia a diminuição de espécies nativas, resultando na pobre diversidade e equitabilidade de comunidades aviárias (SICK, 1997; SZABÓ et al., 2002; MACGREGOR-FORS et al., 2010).

A diversidade de espécies foi maior na Barragem Ponte Nova, apresentando 31/97 (32%) espécies distintas, corroborando com o estudo de Toledo et al. (2011) que encontraram maior número de espécies em espaços verdes do que em áreas construídas. A área da Barragem é composta pela floresta ombrófila densa, caracterizada por formação de submontanha. O relevo montanhoso e dos planaltos com solos medianamente profundos é ocupado por uma formação florestal que apresenta fanerófitos com altura aproximadamente uniforme.

A submata é integrada por plântulas de regeneração natural, poucos nanofanerófitos e caméfitos, além da presença de palmeiras de pequeno porte e lianas herbáceas em maior quantidade. A formação florestal está fragmentada pela alteração da paisagem ocasionada pela barragem (MILANELO, 2006).

Segundo Burns et al. (2012), a determinação das espécies silvestres mais comuns em granjas avícolas permite a investigação de patógenos destas espécies em áreas distantes das granjas. Neste estudo, observou-se que a avifauna encontrada nas granjas e na BPN apresentaram composições distintas em sua maioria. No entanto, 8/31(26%) das espécies capturadas eram comuns entre granjas e BPN, o que poderia contribuir para a disseminação de agentes infecciosos adquiridos nas granjas e carreados para as áreas de maior preservação ou vice-versa.

O tico-tico (*Z. capensis*), espécie mais prevalente na BPN com 30/97 (30,93%) das aves foi encontrado nas três granjas em ocorrências menores: 3/36 (8,33%) na G1, 4/91 (4,39%) na G2 e 1/39 (2,56%) na G3. A abundância de tico-tico (*Z. capensis*) em relação às demais espécies na BPN indica que pode existir dominância desta espécie sobre as outras, resultando na perda da equitabilidade entre as espécies desta área. *Z. capensis* tem predileção por habitats caracterizados pelo desmatamento, áreas rurais e nas cidades, onde observa-se em maior predominância nos locais com ajardinamento (SICK, 1997, VILLEGAS; GARITANO-ZAVALA, 2010).

Os tico-ticos e pardais possuem comportamentos diversos: os primeiros vivem em casais isolados, cada macho atacando furiosamente o vizinho se este invade seu território que é de aproximadamente 30 metros de diâmetro. Faz seu ninho em locais baixos, em densos arbustos, cercas vivas e no meio da vegetação quase rasteira, sobre barrancos ou até no solo sob o capim. Este comportamento pode explicar a sua predominância na BPN. No entanto, o pardal, ao contrário, embora também viva em casais, gosta de associar-se a colônias para nidificar, instalando-se no alto das casas e aparecendo em bandos quando procura alimento. O número de pardais prevalece sobre o número de tico-ticos nas granjas

G1 e G3, provavelmente porque os pardais se adaptam melhor a ambientes modificados pelo homem.

De fato, o tico-tico é pouco atingido pelas atividades do pardal, sendo ele quem afugenta o pardal dos comedouros, mas não competem pelo mesmo ninho, pois possuem comportamentos diferentes. Assim, com o crescimento urbano, o hábitat natural do tico-tico vai desaparecendo, e este procura áreas de população humana menos densa (SICK, 1997).

O pardal não foi encontrado na BPN, reforçando os estudos que demonstraram ser uma espécie bem adaptada ao meio urbano e à convivência com o homem. Sobrevivem e se reproduzem utilizando diversas fontes de alimentos e abrigos, além de serem capazes de tolerar os distúrbios humanos. Consequentemente, se tornam maiores as probabilidades de sucesso quando invadem ambientes modificados (DELARIVA; AGOSTINHO, 1999).

Nas três espécies mais prevalentes nas granjas, a proporção de aves jovens foi maior na G1(61,5%) do que a G2(17%) e G3 (30%). Uma possível explicação para este resultado é o fato das coletas em G1 terem ocorrido entre os meses de fevereiro a maio, no outono, logo após a época da estação reprodutiva no verão, quando os filhotes já empenados saem dos ninhos e buscam alimentos sozinhos (PIRATELLI; SIQUEIRA; MARCONDES-MACHADO, 2000). Apesar de todas as aves estarem clinicamente saudáveis, a proporção de aves em condição corporal ruim ou regular foi maior na granja G3(59%), do que na granja G1(4%) e na granja G2 (18%). Este fato pode estar relacionado com a amostragem da granja 3 que ocorreu no inverno, reduzindo a disponibilidade de alimento, porém podem haver outros fatores de habitat que não foram investigados neste estudo.

A presença de ácaros foi mais frequente em *P. domesticus* (46%) e *S. flaveola* (38%), mas não em *C. talpacoti* (11%). As frequências de ácaros de penas foram relativamente similares nessas três espécies entre as granjas estudadas. Como existiu uma proximidade entre as aves de vida livre e as aves de produção, é possível que possa ocorrer a troca de ácaros de penas, comprometendo os programas de controle para as aves de produção. A exposição de parasitas potencialmente problemáticos como o ácaro de penas *Ornithonyssus sylviarum* (Mesostigmata: Macronissidae) às aves de produção, podem levar a redução dos índices reprodutivos na avicultura comercial. Esta espécie de parasita foi descrita em recém-nascidos de *P. domesticus* causando doença crônica e anemia (SZABÓ et al., 2002). Os ácaros de penas não foram identificados neste estudo, mas como nas granjas 1 e 3 ocorreu a presença de *P. domesticus* jovem, com ácaros, talvez *Ornithonyssus sylviarum* pudesse ter sido identificado nestas aves.

Além disso, as comunidades de aves de vida livre com diversidade de espécies ou não, podem atuar como potenciais carreadoras e transmissoras de doenças (GONDIM et al., 2010; LAWSON et al., 2010; FONTANA; BURGER; MAGNUSSON, 2011; SCHERER et al., 2011) para aves de produção e para outras espécies silvestres ameaçadas de extinção encontradas em fragmentos florestais (SOOS et al., 2008).

Neste estudo foram usados os ensaios moleculares para a detecção do vírus da IA, do vírus da DNC e de Mg e Ms. Estes métodos apresentam maior sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção dos agentes infecciosos, principalmente *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*, que são de difícil isolamento e requerem meios reagentes especiais (NASCIMENTO, et al. 2005; PANG et al., 2002; PODDAR, 2002; METTIFOGO; BUIM, 2009).

O vírus da influenza aviária não foi detectado nas 263 aves capturadas nas proximidades das granjas e na área da BPN, nos testes de RT-PCR, porém, a habilidade dessas aves em carrear e transmitir os patógenos depende dentre outros fatores da susceptibilidade do hospedeiro, dos sinais clínicos, da taxa de eliminação e das características da interface entre as aves silvestres, domésticas e de produção (BROWN et al., 2009; WOODFORD, 2009).

As aves de vida livre presentes nas instalações aviárias foram mais encontradas em cima de comedouros, bebedouros e sobre outras aves, defecando e eliminando as secreções respiratórias nos alimentos, água e nas próprias aves, facilitando a transmissão dos patógenos (BROWN et al., 2009; BURNS et al., 2012). Este comportamento também foi observado neste estudo, principalmente na granja G2, que tinha alta densidade de aves de produção com fartura de alimento disponível e baixa biossegurança.

Infecções naturais com o vírus da influenza aviária foram descritas em mais de 100 espécies de aves, pertencentes a 13 ordens. Os Anseriformes e Charadriiformes são as ordens consideradas mais importantes como reservatórios do vírus da IA, porém este vírus foi descrito em mais de 27 espécies da ordem Passeriformes (STALLKNECHT et al., 2007; GRONESOVA et al., 2008). Nas localidades estudadas não existia a presença de espécies de aves da ordem Anseriformes e Charadriiformes e isto pode ter contribuído para a ausência de detecção do vírus da influenza aviária no ensaio molecular. Apesar de haver lacunas nas informações relacionadas às rotas migratórias no Brasil (ALVES, 2007), não existem relatos sobre a migração de aves consideradas reservatórios do vírus da Influenza aviária em Mogi das Cruzes e Louveira, contribuindo com a obtenção de resultados negativos nas aves capturadas neste estudo.

Uma vez infectadas, as espécies aviárias podem apresentar diferenças quanto às manifestações clínicas, lesões macroscópicas e variações nas taxas de mortalidade. Diferenças nestes parâmetros foram observadas no estudo comparativo entre as espécies *Taenopygia guttata*, *Carpodacus mexicanus*, *Passer domesticus*, *Sternus vulgaris* e *Melospitacus undulatus* após a inoculação intranasal de subtipo H5N1 do vírus da Influenza (PERKINS; SWAYNE, 2003). Também foram encontradas diferenças nas manifestações clínicas, nas espécies *Turdus pallidus* e *Acrocephalus arundinaceus* pertencentes à ordem Passeriformes em estudo realizado por Fujimoto et al. (2010). Entre as espécies da mesma ordem, foi demonstrado que o mesmo subtipo viral apresentava diferentes perfis de virulência (PERKINS; SWAYNE, 2003). Dessa forma, é possível que as espécies capturadas neste estudo possam ter menor suscetibilidade ao vírus da influenza aviária e por isto não tenha sido detectado.

As características do vírus podem ter colaborado para a ausência de resultados positivos, uma vez que estes se mostram relativamente instáveis no ambiente. Fatores físicos como calor, pH extremo, condições hipertônicas e ressecamento podem inativar o vírus (SWAYNE; HALVORSON, 2008), portanto como no Brasil, as temperaturas são relativamente altas e podem permitir o ressecamento do solo, estas condições podem ter favorecido a destruição do vírus no ambiente e impedido a sua disseminação para as aves.

A espécie *P. domesticus* é particularmente problemática, pois sua distribuição cosmopolita faz com que sejam reservatórios com distribuição mundial e fontes de infecção de patógenos para humanos, aves silvestres e domésticas (MORISHITA et al., 1999).

Com relação à suscetibilidade da espécie *P. domesticus* ao vírus da influenza aviária existem resultados contraditórios na literatura. Estudo experimental mostrou que a inoculação, por via intranasal, do vírus da Influenza subtipo H5N1 (A/chicken/Hong Kong/220/97) causou depressão transitória, sem mortalidade e ausência de lesões macroscópicas em *P. domesticus* (PERKINS; SWAYNE, 2003). Por outro lado, a inoculação experimental de quatro cepas diferentes do vírus IAAP H5N1 isoladas de patos, codornas e dois outros hospedeiros desconhecidos, levaram à morte 66% a 100% de *P. domesticus*, na dependência da cepa viral inoculada, sugerindo que esta espécie poderia agir como hospedeiro intermediário e ser transmissora para aves e mamíferos, porém, não servindo como um reservatório de eliminação prolongada (BOON et al., 2007). Os resultados destes estudos mostraram a importância da vigilância epidemiológica desta espécie de ave, uma vez que podem existir diferentes manifestações clínicas de acordo com

a cepa viral, assim como, pelo comportamento desta ave que transita entre centros urbanos e granjas avícolas.

Tanto pela diversidade de espécies, quanto pela ocupação de habitats junto às aves migratórias, a ordem Passeriformes foi estudada na investigação de agentes infecciosos importante para a saúde pública (GONDIM et al., 2010; FULLER et al., 2010).

No Brasil, o vírus da IA foi isolado pela primeira vez de fezes de irerês (*Dendrocygna viduata*) e aves exóticas, no Estado do Rio de Janeiro (SALCEDO, 1980). Estudo com aves silvestres, capturadas no Estado de São Paulo, foi realizado com o objetivo de isolar o vírus da influenza aviária, sendo este isolado em 27% (10/37) das amostras das espécies *Elaenia mesoleuca*, *Sporophila lineola*, *Vireo olivaceus*, *Columbina talpacoti* e *Paroaria dominicana* (KAWAMOTO et al., 2005). As espécies *Columbina talpacoti* e *Vireo olivaceus* foram capturadas neste estudo, mas não apresentavam a presença do vírus da influenza aviária, embora tenha sido analisada amostras de mesma origem analisada por Kawamoto et al. (2005). *Vireo olivaceus* migram do hemisfério Norte para o Sul, vivem em áreas urbanas e rurais do Estado de São Paulo e podem participar no transporte desse agente e na manutenção do ciclo interespecies, percorrendo longas distâncias em diversas regiões do país (KAWAMOTO et al., 2005).

Neste estudo, as 263 amostras de aves capturadas nas proximidades das granjas e na área preservada apresentaram resultados negativos para o vírus da Doença de Newcastle, nos testes de RT-PCR.

O vírus de Newcastle foi identificado pela primeira vez no Brasil em 1953, nos Estados do Pará e Amapá, onde foi introduzido através da importação de carcaças contaminadas dos EUA (SANTOS, 1954).

O pardal também faz parte da epidemiologia de outras doenças de importância econômica como a Doença de Newcastle. Em amostras de *P. domesticus* capturados ao redor de granjas foram isoladas quatro cepas virulentas de NDV e uma não virulenta, ou seja, 2,72% (4/147) (Zhu et al., 2010). Estas cepas sparrow/Guangxi/YL3/05, sparrow/Guangxi/YL9/06, sparrow/Guangxi/LZ9/07 e sparrow/Guangxi/YL3 foram comparadas filogeneticamente aos surtos ocorridos em galinhas e foi constatado que o pardal poderia ser um dos carreadores de cepas virulentas de NDV, uma vez que o mesmo genótipo que circulava em galinhas foi encontrado também em pardais (Zhu et al., 2010).

Thomazelli et al. (2012) investigaram aves silvestres e domésticas da costa brasileira e região Amazônica, quanto a presença de VDN e detectaram a cepa lentôgenica do vírus em 7/1022 (0,7%) pelas técnicas de PCR em tempo real e isolamento viral. Concluíram que as

aves daquela região poderiam agir como carreadoras e reservatórios do VDN de baixa patogenicidade. Embora o vírus de Newcastle exista no Brasil desde a década de 50, a sua incidência é baixa em aves silvestres, conforme aponta o estudo de Thomazelli et al. (2012) e os resultados deste estudo onde este vírus não foi detectado.

A ausência de detecção do vírus de Newcastle neste estudo pode ser consequência da temperatura ambiente no Brasil, pois Sinha, Hanson e Brandy (1957) relataram que a elevada temperatura ambiental pode alterar a chance de sobrevivência e de infectividade do vírus no hospedeiro.

Estudo sorológico para a doença de Newcastle, no Brasil, encontrou uma baixa prevalência (12/8837 - 1,43%) deste vírus em aves silvestres de zoológicos do Estado do Rio de Janeiro (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2003). No Estado de Pernambuco, pardais capturados próximos às granjas apresentaram baixos títulos de anticorpos para a DNC (3/103 - 2,91%), como consequência do consumo de vacinas adicionadas na água de bebida de aves de produção, indicando a estreita proximidade e a potencial troca de patógenos entre essas aves silvestres e os plantéis avícolas (SILVA et al., 2006).

Todas as amostras das 263 aves capturadas nas proximidades das granjas e na área da BPN apresentaram resultados negativos para *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* nos testes de PCR.

No Brasil, o primeiro relato de Mg causando doença respiratória crônica em aves de produção ocorreu no Estado de São Paulo, e foi descrito por Garust e Nobrega em 1956. É considerado frequente em aves de produção (BUIM et al., 2009), porém não existem descrições de surtos em aves silvestres de vida livre.

Em psitacídeos mantidos em centros de triagem, que vieram a óbito, 61,4% (86/140) das amostras foram positivas para Mg pela técnica da PCR, demonstrando a circulação desses patógenos em aves de vida livre e em cativeiro. As causas sugeridas para esta alta prevalência foram a coabitação com diversas espécies durante o confinamento e a manutenção no mesmo recinto de psitacídeos de diferentes origens (GOMES et al., 2010).

A ausência de detecção de Mg e Ms em aves silvestres deste estudo, pode estar relacionada à ausência de eliminação e/ou infecção nas aves das granjas estudadas no período de coleta. Os relatos descritos em pássaros de vida livre são esporádicos, com a exceção do surto de conjuntivite em pássaros *Carpodacus mexicanus* nos EUA, nos anos 90 (LUTTRELL; FISCHER, 2007) que comprometeu grande parte da população desta espécie. A permanência da bactéria no ambiente pode ser resultado de aves reincidentes que

transmitem a doença a aves jovens que ainda não entraram em contato com o agente (DHONDT et al., 2012).

O monitoramento de patógenos em aves silvestres é um dos pontos fundamentais para a prevenção e controle de doenças da produção avícola.

Em países como o Canadá e EUA, existem equipes governamentais de vigilância animal que se associam a pesquisadores e observadores de aves, ampliando os estudos da avifauna em diversos biomas e em áreas de produção avícola (STATES; HOCHACHKA; DHONDT, 2009; BURNS et al., 2011).

Sydenstricker et al. (2005) demonstraram respostas individuais em aves da espécie *Carpodacus mexicanus* após a reinoculação com Mg, onde alguns pássaros apresentaram rápida recuperação da doença, enquanto outras aves desenvolveram quadros de conjuntivite persistente por mais de 60 dias após a reinfecção.

Neste estudo, pode-se sugerir que as aves capturadas eram resistentes ao Mg e por isso a ausência de detecção deste patógeno.

Além disso, a diversidade de espécies, as idades das aves nos pontos coletados, a estação do ano, o clima, o número de aves amostrado e a quantidade de material coletado também possam ter colaborado para a ausência de positividade (VAN DER GOOT et al., 2007) ao Mg e Ms, nas aves capturadas.

O VDN, Mg e o Ms não foram detectados nas aves de vida livre nos locais pesquisados, o que sugere que não são endêmicos nas populações de aves silvestres e, portanto, talvez não tenham ainda sido disseminados dentro da vida silvestre (SOOS et al., 2008).

Apesar dos agentes estudados não terem sido detectados nas aves de vida livre, é importante ressaltar que o monitoramento de patógenos em aves silvestres é fundamental, uma vez que para a prevenção e o controle de doenças que podem afetar a produção avícola. As aves de subsistência GS1, GS2, GS3 e GS4, estavam localizadas em diferentes regiões de Mogi das Cruzes.

Neste estudo, as características das criações mantiveram um padrão uniforme, com número pequeno e diversificado de aves por propriedade (< 60). A finalidade das criações era essencialmente, para o consumo de ovos e venda de aves em mercados. Não havia quarentena para as aves recém-adquiridas, a desinfecção era inadequada ou inexistente e os tratamentos das aves baseavam-se em experiências pessoais, corroborando com os estudos em criações nos países da América do Sul como Chile, Equador, Argentina e Paraguai

(HAMILTON-WEST et al., 2012; HERNANDEZ-DIVERS et al., 2006; HERRERO et al., 2009; XAVIER; PASCAL; CRESPO, 2011).

Os exames sorológicos para as aves comerciais referendados pela OIE e MAPA, como SAR, HI e ELISA, são testes de eleição para a monitoria de doenças nos plantéis avícolas comerciais (BRASIL, 2006; XAVIER; PASCOAL; CRESPO, 2011), porém para as aves de “fundo de quintal” não existem protocolos para o controle sanitário.

Neste estudo, todas as criações de aves de subsistência apresentaram títulos positivos para VDN, Mg e Ms

No Paraguai, as evidências mostraram que galinhas de “fundo de quintal” estavam expostas ao *Mycoplasma gallisepticum* após análises pelo teste de ELISA indireto, pois ocorreu a soroprevalência de 26% dentre as 1291 aves amostradas (HERRERO et al., 2009).

Por outro lado, Xavier et al. (2011) demonstraram alta soroprevalência (76,2%) nesse mesmo sistema de criação, pela prova de soroaglutinação rápida em placa para Mg e Ms. Assim como, Buchala et al. (2006b), no Brasil, pela mesma técnica, encontrou positividade em 123/406 (30,3%) para Mg e 165/406 (40,6%) para Ms, em galinhas de “fundo de quintal” próximas às granjas.

Dependendo da espécie aviária envolvida ou mesmo em indivíduos da mesma espécie, existe uma variedade de resposta imunológica frente a um mesmo patógeno. Isso foi notado no estudo com *Mycoplasma gallisepticum*. As cepas de baixa virulência Mg K5054 similares às cepas isoladas de tentilhões *Carpodacus mexicanus* com conjuntivite, desenvolveram imunidade em perus quando inoculados experimentalmente, e posteriormente desafiados com uma cepa virulenta R de Mg (FERGUSON; LEITING; KLEVEN, 2003).

Sales et al. (2007), em Feira de Santana, no Estado da Bahia, compararam a técnica de ELISA indireto para a pesquisa de anticorpos contra o VDN e relataram que as galinhas de “fundo de quintal” apresentavam coeficientes de variação (C.V.) mais altos (146,41%) quando comparados com os pintos de um dia (97,07%) e frangos de corte em idade de abate (99,07%). Isto indica que os altos valores de C.V. encontrados neste estudo, são compatíveis aos valores esperados em galinhas de fundo de quintal.

Neste estudo, ocorreu uma baixa prevalência de aves com títulos acima de 5.000 para VDN, sendo 4/37 (10,81%) nas aves da criação GS2 e 1/11 (9,09%) nas aves de criação GS4, representando 5/94 (5,31%) do total de aves. Desta forma, os indivíduos (5/48) amostrados em GS2 e GS4 poderiam ter recebido doses inadequadas de vacina no processo

de vacinação ou poderiam ter entrado em contato com o vírus da VDN de baixa patogenicidade, uma vez que as aves não possuíam sintomatologia clínica (SOOS, et al. 2008; THOMAZELLI et al., 2012), mas possuíam títulos altos de IgG para este vírus.

As aves de “fundo de quintal”, pela própria característica de manejo, estão expostas a inúmeros agentes infecciosos. Dessa forma, a detecção de títulos positivos de anticorpos para um agente indica que a ave entrou em contato com este agente, e que ocorreu ativação da resposta imunológica em algum momento de sua vida e não necessariamente a um estado de infecção ou que estivessem eliminando-os no momento da coleta (CARDOSO, 2009; SOOS et al., 2008). Associado a isso, a ausência de anticorpos maternos nestas aves, podem torná-las mais susceptíveis aos agentes infecciosos (BENČINA et al., 2005).

Neste estudo, foram observadas diferenças estatísticas em relação às médias de títulos de anticorpos pesquisados para o vírus da doença de Newcastle, Mg e Ms.

A criação GS3 apresentou menor média de títulos de anticorpos contra VDN quando comparada com as outras criações. Na avaliação da média de títulos de anticorpos contra Mg, as médias das criações GS2 e GS3 foram significativamente menores quando comparadas com as criações GS1 e GS4, e na avaliação da média de anticorpos contra Ms, a criação GS3 apresentou a menor média e GS4 apresentou maior média estatisticamente significativas em logaritmo natural (ln).

Este resultado pode ser compatível com o manejo de criação GS3, pois apesar das aves serem de fundo de quintal, os animais viviam em uma área gramada ampla e com vegetação abundante, além de apresentarem baixa densidade de aves por m², diminuindo a possibilidade de contato e disseminação de patógenos entre os animais.

Luciano et al. (2011), compararam as técnicas sorológicas SAR, HI e ELISA, observaram que a concordância estatística nos resultados para *Mycoplasma synoviae* foi reduzida. Recomendaram que esses métodos de diagnóstico deveriam ser empregados como uma ferramenta de triagem no monitoramento de programas de saúde aviária. Enfatizaram que os resultados positivos deveriam ser confirmados pelo isolamento, usando métodos microbiológicos tradicionais ou ensaios biomoleculares.

Os resultados falso-positivos nos testes sorológicos tornaram-se mais evidentes quando comparados aos métodos de diagnóstico pela PCR empregados na pesquisa com *Mycoplasma gallisepticum* (ASGHARZADE et al., 2012).

A reação em cadeia pela polimerase representa uma alternativa rápida, sensível e específica quando comparada aos métodos de cultura tradicionais, as quais requerem tempo e técnicas especializadas. O desenvolvimento de métodos moleculares revelam novas

oportunidades para os estudos epidemiológicos e a identificação de reservatórios de infecção (NASCIMENTO et al., 2005; ISLAM et al., 2011).

Os exames da PCR para a detecção das doenças de Newcastle e Influenza aviária apresentaram resultados negativos nas quatro criações (GS1, GS2, GS3 e GS4), o que era esperado porque o Brasil, atualmente, é considerado livre de IAAP e mantém o controle sobre a Doença de Newcastle, pelo PNSA.

Os surtos mais recentes de VDN ocorreram em aves de “fundo de quintal” e foram notificados no Rio de Janeiro e Goiás em 2000 e 2001, respectivamente. Ocorreu também um surto em 2006, no Rio Grande do Sul, Amazonas e Mato Grosso, porém não foram considerados importantes para a OIE em relação ao comércio internacional de aves (SILVA et al., 2008).

Os resultados para a detecção de *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* pela técnica da PCR foram negativos para as criações GS3 e GS4, porém na criação GS1 apresentou prevalência de 24/37 (64,86%) para a detecção de Mg e 25/37 (67,56%) para a detecção de Ms e nas aves da granja GS2 apresentou detecção em 3/35 (8,57%) para Mg e 32/35 (91,42%) para Ms.

A característica da criação GS1 era baseada na criação familiar de aves de postura. Aliada às condições precárias das instalações do galpão, que era feito de madeira, a cama era reutilizada e os comedouros e bebedouros eram feitos de borracha de pneu. Além dessas condições impróprias, ocorria a introdução de aves domésticas sem quarentena prévia. Dessa forma, essas condições podem ter permitido que Mg e Ms fossem mantidos no ambiente e se perpetuassem em um novo hospedeiro. A criação GS2 com as características citadas acima, podem ter introduzido e mantido Mg e Ms nas aves, através da compra e venda de animais.

Estes resultados demonstraram que a ocorrência de Mg e Ms nas aves estudadas, com predomínio de *M. synoviae*, se destaca entre as criações de subsistência e concordam como os resultados encontrados por Buim, et al. (2009) cuja ocorrência em aves reprodutoras, postura, corte e abate, foi de 21/1046 (2%) para Mg e 339/1046 (32,4%) para Ms.

O sinergismo entre Ms e o vírus da bronquite infecciosa, o VDN, Influenza A, *E. coli* e Mg foram demonstrados em aves domésticas, dificultando o tratamento e o controle das aves acometidas (SILVA et al., 2008, ISLAM et al., 2011). Além disso, Ms pode apresentar diferenças genotípicas pelas mutações espontâneas que podem acontecer quando a linhagem de aves permanece no mesmo plantel por longos períodos (BUIM et al., 2010).

Cepas ou variantes de patógenos desconhecidos podem surgir com a presença de novos hospedeiros ou quando há reposição de aves (BUIM et al., 2010). Nas criações de aves de subsistência estudadas, principalmente na GS2, ocorria a reposição de aves, possibilitando a instalação de patógenos. O surgimento da cepa de Mg de origem desconhecida em pássaros silvestres *Carpodacus mexicanus* com conjuntivite comprometeu grande parte da população desta espécie em vida livre (LUTTRELL; FISCHER, 2007).

Invariavelmente, os estudos apontam para as galinhas de “fundo de quintal” como reservatórios de agentes infecciosos, sendo consideradas disseminadoras para as aves silvestres, que por sua vez, tem livre acesso às granjas de produção e podem transmitir os agentes infecciosos das aves de subsistência para as aves comerciais e vice-versa (SALES et al., 2007; BUCHALA et al., 2006a; XAVIER; PASCAL; CRESPO, 2011; HAMILTON-WEST et al., 2012; SMITH et al., 2012).

No estudo de Soos et al. (2008), as aves de “fundo de quintal” significativamente apresentaram sinais clínicos de doença, estavam infestadas com ectoparasitas e eram soro positivas para diversos patógenos quando comparadas com as aves de produção. Estes resultados indicavam que as aves de subsistência eram uma ameaça significativa e imediata para a introdução de doença para a avifauna silvestre residente.

Os resultados encontrados neste estudo com as aves de subsistência confirmam a importância da instalação de um programa de controle sanitário neste tipo de criação de aves, pois existiram altas concentrações de anticorpos tanto para Mg como para Ms. Assim como, a detecção destes patógenos por PCR.

Segundo Oliveira-Júnior et al. (2005), a prevenção de doenças de interesse do PNSA em aves de “fundo de quintal” deveria ser contemplada através da vacinação e melhoria das condições zootécnicas nessas criações. Em aves de produção, o isolamento sanitário das aves de vida livre e a vigilância constante a patógenos poderiam contribuir para a redução do problema.

Devido a possível interação entre as aves silvestres e domésticas, foi criada a Instrução normativa nº59 de 2 de dezembro de 2009 que obriga a colocação de telas de uma polegada (2,54 cm) nos aviários de criações comerciais de frangos de corte e galinhas de postura com a finalidade de evitar a entrada de pássaros e roedores no interior das instalações avícolas. No entanto, os problemas inerentes a essa normativa incluem o custo elevado com a compra e instalação das telas, a difícil manutenção da limpeza no local, a necessidade de quantidade maior de mão-de-obra para a higienização do aviário, a

degradação periódica do material com o uso de desinfetantes corrosivos e principalmente o aumento da temperatura dentro dos aviários.

As parcerias entre órgãos governamentais e entidades de organização sem fins lucrativos e empresas privadas, deveriam ser estabelecidos com o objetivo de identificar a diversidade de espécies de aves que circundam as granjas, bem como monitorar nestas aves e nas aves domésticas de “fundo de quintal”, os principais patógenos de interesse à saúde pública e à avicultura comercial.



7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Foram identificadas 43 espécies de aves silvestres nas três granjas e Barragem Ponte Nova. Existe predominância de espécies nas áreas coletadas sendo *Passer domesticus* mais prevalente nas granjas e *Zonotrichia capensis* na Barragem Ponte Nova.

As aves de vida livre capturadas estavam clinicamente saudáveis, apresentavam idades que variavam entre jovens e adultos e apresentaram variedade quanto à presença de ácaros de penas e condição corporal.

Não foram detectados os vírus da Influenza aviária, *Paramyxovirus* tipo 1 (vírus da Doença de Newcastle) pela técnica da RT-PCR e *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* pela técnica da PCR nas aves silvestres.

Não foram detectados os vírus da Influenza aviária e *Paramyxovirus* tipo 1 (vírus da Doença de Newcastle) pela técnica da RT-PCR nas aves de subsistência.

Foram detectados *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em aves de subsistência pela técnica da PCR.

Foram detectados títulos de anticorpos positivos contra o *Paramyxovirus* tipo 1 (vírus da Doença de Newcastle), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* nas aves de subsistência.

REFERÊNCIAS

ABEF. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE FRANGO. **Exportação Brasileira de Carne de Frango (TON)**. 2008. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoExterno/Historico.php>>. Acesso em: 05 de outubro de 2012.

ALEXANDER, D. J. Classification. In:_____. **Newcastle disease**. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 1988, p. 11-22.

ALEXANDER, D. J., BROWN, I. H. Recent zoonosis caused by Influenza A viruses. **Revue Scientifique et Technique** , v.19, n. 1, p. 197-225, 2000.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease–The Gordon Memorial Lecture British. **Poultry Science**, v.42, p. 5-22, 2001.

ALEXANDER, D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza. **Vaccine**, v.25, n.30, p. 5637-5644, 2007.

ALEXANDER, D. J.; SENNE, D. A. Newcastle Disease, other avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of Poultry**. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p. 75-115.

ALEXANDER, D. J. Influenza Aviária In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**, São Paulo: Editora Manole, 2009, p. 258-275.

ALEXANDER D. J. Review article - Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. **Avian Pathology**, v.40, n. 6, p. 547-558, 2011.

ALVES, M. A. S. Sistemas de migrações de aves em ambientes terrestres no Brasil: exemplos, lacunas e propostas para o avanço do conhecimento. **Revista de Ornitologia**, v.15, n.2, p.231-238, 2007.

ASGHARZADE,S.; ZAERI, S.; HASANZADE, M.; AHMADI, M.; TALEBI, A. R. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in experimentally infected broiler chickens using Culture, SPA, ELISA, PCR methods.2012. **Comparative Clinic Pathology**, DOI 10.1007/s00580-012-1524-4.

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

BACK, A. Micoplasmose. In:_____. BACK, A. **Manual de Doenças de Aves**, Cascavel: Editora Coluna do Saber, 2002. p. 49-58.

BARIN, A.; ARABKHAZAEI, F.; RAHBARI, S.; MADANI, S. A. The housefly, *Musca domestica*, as a possible mechanical vector of Newcastle disease virus in the laboratory and field. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, n.1, p. 88-90, 2010.

BECKER, W.B. The isolation and classification of tern virus: Influenza virus A/tern/South Africa/1961. **The Journal of Hygiene**, v.64, n.3, p. 309-320, 1996.

BENČINA, D.; NARAT, M.; BIDOVEC, A.; ZORMAN´ROJS, O. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. **Avian Pathology**, v.34, n.6, p.463-472, 2005.

BENCKE, G. A; MAURICIO, G. N. Abordagem Metodológica. In: BENCKE, G.A.; MAURICIO, G. N.; DEVELEY, P. F.; GOERCK, J. M. **Áreas importantes para a Conservação das Aves no Brasil. Parte I – Estados do Domínio da Mata Atlântica**. São Paulo: SAVE Brasil, 2006, p. 63 -76.

BERMUDEZ, A.J.; STEWART-BROWN, B. Disease prevention and diagnosis. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W. **Diseases of Poultry**. 11th ed. Ames: Iowa University Press, 2003, p. 17-55.

BERTRAN , K.; BUSQUETS, N.; ABAD, F. X.; FUENTE, J.G. de la; SOLANES, D. ; CORDÓN, I.; COSTA, T.; DOLZ, R. ; MAJÓ, N. Influenza (H5N1) and low (H7N2) pathogenic avian influenza virus infection in falcons via nasopharyngeal route and ingestion of experimentally infected prey . **PLoS One**, v.7, n.3, p. 1-10, 2012.

BOON, A. C. M.; SANDBULTE, M. R.; SEILER, P.; WEBBY, R. J.; SONGSERM, T.; GUAN, Y.; WEBSTER, R. G. Role of Terrestrial Wild Birds in Ecology of Influenza A Virus (H5N1). **Emerging Infectious Diseases**, v.13 n. 11, p.1720-1724, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. **MANUAL DE LEGISLAÇÃO: PROGRAMAS NACIONAIS DE SAÚDE ANIMAL NO BRASIL**. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Brasília, 2009, p. 171 - 241.

BROWN, J.D.; STALLKNECHT, D.E.; BERGHAUS, R.D.; SWAYNE,D.E. Infectious and lethal doses of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for house sparrow (*Passer domesticus*) and rock pigeons (*Columbia livia*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, n.4, p. 437-445, 2009.

BUCHALA, F.G.; ISHIZUKA, M. M.; MATHIAS, L.A.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; KANASHIRO, A.M.I. Ocorrência de reação sorológica contra *Salmonella pullorum* em aves de “fundo de quintal” do estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n. 1, p. 1-5, 2006a.

BUCHALA, F.G.; ISHIZUKA, M.M.; MATHIAS, L.A.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; KANASHIRO, A.M.I.

Detecção de resposta sorológica contra *Mycoplasma* em aves de criatórios de “ fundo de quintal” próximos a explorações comerciais do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n. 2, p. 143-148, 2006b.

BUIM, M.R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A.J.P. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n. 7, p. 552-556, 2009.

BUIM, M.R.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R.C.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; FERREIRA, A.J.P. Intraspecific variation in 16rRNA gene of *Mycoplasma synoviae* determined by DNA sequencing. **Comparative, Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, n.33, p.15-23, 2010.

BURNS, T. E.; RIBBLE, C.; STEPHEN, C.; KELTON, D.; TOEWS, L.; OSTERHOLD, J.; WHEELER, H. Use of observed wild bird activity on poultry farms and a literature review to target species as high priority for avian influenza testing in 2 regions of Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 2, p. 158-166, 2011.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z. Monitoria sorológica da micoplasmose em plantéis de aves reprodutoras no Brasil através do teste de soroaglutinação rápida. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n. 1, p. 23-26, 2006.

CARDOSO, B. Prevenção, diagnóstico e controle. Sorologia e interpretação. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**, Barueri: Editora Manole, 2009, cap.41.1, p.428-437.

CBRO. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Listas das Aves do Brasil**. 10ª edição, 2011. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 23 de outubro de 2012.

CEPAGRI. Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas aplicadas à agricultura. **Clima dos Municípios Paulistas**, 2012. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/>>. Acesso em: 12 de maio de 2012.

CHRISTENSEN, N.H.; CHRISTINE, A.YAVARI; MACBAIN, A.J.; BRADBURY, J.M. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. **Avian Pathology**, n. 23, p. 127-143, 1994.

COX, N.J.; SUBBARAO, K. Influenza. **Lancet** , v. 354, n. 9186, p. 1277–82, 1999.

DANTAS, T.B., ROCHA, P.L.B.: Corredores ecológicos – uma tentativa para reverter ou minimizar a fragmentação florestal e seus processos associados: o caso do corredor Central da Mata Atlântica. In: FRANKE, C.R. ; ROCHA, P.L.B.; KLEIN, W.; GOMES, S.L. **Mata Atlântica e Biodiversidade**, Salvador: Edufba, cap. 4, 2005, p. 165-190.

DEEM, S.L.; KARESH, W.B.; WEISMAN, W. Putting theory into practice: wildlife health in conservation. **Conservation Biology**, n.15, p. 1224-1233, 2001.

DELARIVA, R.L.; AGOSTINHO, A.A. Introdução de espécies: uma síntese comentada. **Acta Scientiarum**, v.21, n.2, p.255-262, 1999.

DEVELEY, P.; ENDRIGO, E. **Guia de campo aves da grande São Paulo**. São Paulo: Editora Aves e Fotos, 2004. 295 p.

DHONDT, A.A.; DHONDT, K.V.; HAWLEY, D.M.; JENNELLE, C.S. Experimental evidence for transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches by fomites. **Avian Pathology**, v. 36, n. 3, p. 205-208, 2007.

DHONDT, K.V.; DHONDT, A.A.; LEY, D.H. Effects of route inoculation on *Mycoplasma gallisepticum* infection in captive house finches. **Avian Pathology**, v. 36, n. 6, p. 475-479, 2007.

DHONDT, A.A.; STATES, S.L.; DHONDT, K.V.; SCHAT, K.A. Understanding the origin of seasonal epidemics of mycoplasmal conjunctivitis. **Journal of Animal Ecology**, n. 81, p. 996-1003, 2012.

ELLAKANY, H.; FABIAN, K.; NÉMETH, I.; STIPKOVITS, L. Antibody response detected by immunoblot in respiratory tract washing of chickens after infection with *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Pathology**, n. 27, p. 547-545, 1998.

EPSTEIN, P.R. Biodiversity, Climate Change, and Emerging Infectious Diseases. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. **Conservation Medicine Ecological Health in Practice**. New York: Oxford University Press, Inc., 2002, p. 27-39.

FAN, H.H.; KLEVEN, S.H.; JACKWOOD, M.W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, n. 39, p. 729-735, 1995.

FAO. Food and Agriculture Organization. How can animal health systems support small-scale poultry producers and traders? Reflections on experience with HPAI. **Animal Production and Health Working Paper**. Roma: FAO, n. 10, 2012, 40 p.

FEBERWEE, A.; MEKKES, D.R.; WIT, J.J.; HARTMAN, E.G.; PIJERS, A. Comparison of Culture, PCR, and Different Serologic Tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Infections. **Avian Diseases**, v.49, n.2, p.260-268, 2005.

FERGUSON, M.; LEITING, V. A.; KLEVEN, S. H. Safety and efficacy of the avirulent *Mycoplasma gallisepticum* strain K5054 as a live vaccine in poultry. **Avian Diseases**, n.48, p. 91-99, 2003.

- FONTANA, C.S.; BURGER, M.I.; MAGNUSSON, W.E. Bird diversity in a subtropical South-American city: effects of noise levels, arborisation and human population density. **Urban Ecosystems**, n.4, p.341-60, 2011.
- FULLER, T.L.; SAATCHI, S.S.; CURD, E.E.; TOFFELMIER, E.; THOMASSEN, H.A.; BUERMANN, W.; DESANTE, D.F.; NOTT, M.P.; SARACCO, J.F.; RALPH, C.J.; ALEXANDER, J.D.; POLLINGER, J.P.; SMITH, T.B. Mapping the risk of avian influenza in wild birds in the US. **BMC Infectious Diseases**, v.10, n. 187, p. 1-13, 2010.
- FUJIMOTO, Y.; ITO, H.; SHINYA, K.; YAMAGUCHI, T.; USUI, T.; MURASE, T.; OZAKI, H.; ONO, E.; TAKAKUWA, H.; OTSUKI, K.; ITO, K. Susceptibility of two species of wild terrestrial birds to infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H5N1 subtype. **Avian Pathology**, v. 39, n. 2, p. 95-98, 2010.
- GIAMAS, M.T.D.; CAMPOS, E. C.; CAMARA, J. J. C.; VERMULUM, H.; BARBIERI, G. A ictiofauna da represa de Ponte Nova, Salesópolis (SP) - bacia do alto Tietê. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n.1, p. 25-34, 2004.
- GIMENO, E. Doenças Aviárias da América Latina. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**, São Paulo: Editora Manole, 2009, p. 2-5.
- GOERCKE, J.M. A sociedade civil e a Conservação no Brasil. In: BENCKE, G.A.; MAURICIO, G.N.; DEVELEY, P.F.; GOERCK, J.M. **Áreas importantes para a Conservação das Aves no Brasil. Parte I – Estados do Domínio da Mata Atlântica**. São Paulo: SAVE Brasil, 2006, p. 1 -8.
- GOODMAN, B. B.; HANSON, R.P. Isolation of Avian Paramyxovirus -2 from domestic and wild birds in Costa Rica. **Avian Diseases**, n.32, p.713-717, 1988.
- GOMES, A.M.; COSTA, L.L.; VILELA, D.A.R.; MARQUES, M.V.R., CARVALHAES, A.G.; MARIN, S.Y.; COSTA, M.P.; HORTA, R.S.; RESENDE, J.S.; MARTINS, N.R.S. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in dead captive psittacines in Belo Horizonte, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 75-78, 2010.
- GONDIM, L.A.Q.; ABE-SANDES, K.; UZÊDA, R.S.; SILVA, M.S.A.; SANTOS, S.L.; MOTA, R.A.; VILELA, S.M.O.; GONDIM, L.F.P. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1, p. 121-124, 2010.
- GRONESOVA, P.; FICOVA, M.; MIZAKOVA, A.; KABAT, P.; TRNKA, A.; BETAKOVA, T. Prevalence of avian influenza viroses, *Borrelia garinii*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in waterfowl and terrestrial birds in Slovakia. **Avian Pathology**, v. 37, n. 5, p. 537-543, 2008.
- HAAHEIM, L.R. Basic Influenza Virology and Immunology. In: VAN-TAM, J.; SELLWOOD, C. **Introduction to Pandemic Influenza**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010, p. 14-27.

HAMILTON-WEST, C. ; ROJAS, H.; PINTO, J.; OROZCO, J.;HERVÉ-CLAUDE, L.P.; URCELAY, S. Characterization of backyard poultry production systems and disease risk in the central zone of Chile. **Research in Veterinary Science**, n. 93, p. 121-124, 2012.

HAWLEY, D. M.; DAVIS, A. K.; DHONDT, A. A. Transmission-relevant behaviours shift with pathogen infection in wild house finches (*Carpodacus mexicanus*). **Canadian Journal of Zoology**, n. 85, p. 752-757, 2007.

HERNANDEZ-DIVERS, S. M.; VILLEGAS, P. ; PRIETO, F.; UNDA, J,C.; STEDMAN, N.; RITCHIE, B.; CAROLL, R.; HERNANDEZ-DIVERS, S.J. A Survey of Selected Avian Pathogens of Backyard Poultry in Northwestern Ecuador. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 20, n. 3, p. 147-158, 2006.

HERRERO, M.; SUZUKI, K.; ORIGLIA, J.; NUÑEZ, M.; FACCIOLI, M.; SILVA, M.; CABALLERO, J.; VALIENTE, O.; ÁLVAREZ, F. Probability Mapping for *Mycoplasma gallisepticum* risk in backyard chickens in Paraguay. **International Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 6, p. 565-569, 2009.

HESS, M.; NEUBAUER, C.; HACKL, R. Interlaboratory comparison of ability to detect nucleic acid of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, v. 36, n. 2, p.127-133, 2007.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Renováveis. Disponível em: <www.ibama.gov.br> Acesso em 15 de setembro de 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária.2012a **Produção de Ovos de Galinha**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/a-bate-leite-couro-ovos_201201_publ_completa.pdf>. Acesso em 10 de setembro de 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.2012b **Cidades**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmum=353060>>. Acesso em 30 de setembro de 2012.

INOUE, A.Y.; de CASTRO, A.G.M. Fisiologia do sistema respiratório. In: JÚNIOR, A.B.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; ZUANAZE, M.A.F. **Doenças das Aves**, Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2 edição, 2009, p. 281-302.

ISLAM, A.; ASLAM, A.; CHAUDHRY, Z.I.; AHMED, M.U.D.; REHMAN, H.UR. Pathologic of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected Broilers and its Diagnosis through PCR. **International Journal of Agriculture & Biology**, n. 13, p. 835-837, 2011.

IUCN, 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Acesso em 16 de outubro de 2012.

KAWAMOTO, A.H.N.; MANCINI, D.A.P.; PEREIRA, L.E.; CIANCIARULLO, A.M.; CRUZ, A.S.; DIAS, A.L.F.; MENDONÇA, R.M.Z.; PINTO, J.R.; DURIGON, E.L. Investigation of Influenza in Migrating Birds, the primordial reservoir and transmitters of Influenza in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 36, p. 88-93, 2005.

KEMPF, I; GESBERT, F. Comparison of serological tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in eggs and chicks hatched from experimentally infected hens. **Veterinary Microbiology**, n. 60, p. 207-213, 1998.

KENT, J.; SILVANOSE, C.D.; MCKEOWN, S.; MANVELL, R. An Outbreak of low Pathogenic Avian influenza in a Mixed-species Aviculture Unit in Dubai in 2005. **Veterinary Clinics Exotic Animal**, n. 9, p. 523-531, 2006.

KLEVEN, S. H. Micoplasmosis. In : SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**, Iowa: Iowa State University Press, 11° ed., 2003, p. 719-721.

KLEVEN, S. H. Mycoplasmosis. In: SAIF, Y. M; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K., SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**, Iowa: Blackwell Publishing, 12° ed., 2008, p 805-834.

KLEVEN, S. H.; FERGUSON-NOEL, N. *Mycoplasma synoviae* infection. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**, Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p. 845-856.

KUIKEN, T. Review of Newcastle Disease in Cormorants. **The International Journal Waterbird Biology**, v.22, n.3, 1999.

LAUERMAN. L. H.; HOERR, F. J.; SHARPTON, A. R.; SHAH, S. M. VAN SANTEM, V. L. Development and Application of a Polymerase Chain Reaction Assay for *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, v. 37, n. 3, p. 829-834, 1993.

LAUERMAN, L.H. Advanced in PCR Technology. **Animal Health Research Reviews**, vol. 5, n. 2, p. 247-248, 2004.

LAWSON, B.; HOWARD, T.; KIRKWOOD, J. K.; MACGREGOR, S. K.; PERKINS, M.; ROBINSON, R. A.; WARD, L. R.; CUNNINGHAM, A. Epidemiology of Salmonellosis in Garden Birds in England and Wales, 1993 to 2003. **EcoHealth**, v. 7, n. 3, p. 294-306, 2010.

LEBARBENCHON, C.; CHANG, CHUNG-MING; GRANDHOMME, V.; DIETRICH, M.; KAYSER, Y.; ELGUERO, E.; RENAUD, F.; THOMAS, F.; VAN DER WERF, S.; GAUTHER-CLERC, M. Avian Influenza Circulation in the Camargue (South of France) during the 2006-2007 season. **Avian Diseases**, v. 54, suplemento 1, p. 446-449, 2010.

- LEIGHTON, F. A.; HECKERT, R. A. Newcastle Disease and Related Avian Paramyxoviruses. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious Diseases of Wild Birds**. Iowa: Blackwell Publishing, 2007, p. 3-16.
- LEY, D.H.; BERKHOFF, J.E.; LEVISOHN, S. Molecular epidemiological investigations of *Mycoplasma gallisepticum* conjunctivitis in songbirds by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. **Emerging Infectious Diseases**, n.3, p.375-380, 1997.
- LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In : SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**, Iowa: Iowa State University Press, 2003, p. 722-744.
- LEY, D.H. *Mycoplasma gallisepticum* Infection, In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**, Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p. 807-834.
- LIERZ, M.; HAGEN, N.; LUESCHOW, D.; HAFEZ, H.M. Use of polymerase chain reactions to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma iowae*, *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma synoviae* in birds of prey. **Avian Pathology**, v. 37, n. 5, p. 471- 476, 2008.
- LIPATOV, A.S.; GOVORKOVA, E.A.; WEBBY, R.J.; OZAKI, H.; PEIRIS, M.; GUAN, Y. Influenza: emergence and control. **Journal Virology**, v. 78, n. 17, p. 8951–8959, 2004.
- LONGO, L. G.; FITORRA, L. S.; PETRI, B. S. S.; ALVES, M.. MILANELO, L. Área de Soltura e Monitoramento Barragem Ponte Nova (Salesópolis/SP). Centro de Recuperação de Animais Silvestres Parque Ecológico do Tietê DAEE (CRAS-PET). In: IBAMA. **Áreas de Soltura e Monitoramento do Estado de São Paulo - Relatório de Atividades**, 2008. p. 24-27.
- LUCIANO, R. L.; CARDOSO, A. L. S. P.; STOPPA, G. F. Z.; KANASHIRO, A. M. I.; de CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N. C. Comparative study of serological tests for *mycoplasma synoviae* diagnosis in commercial poultry breeders. **Veterinary Medicine International**, 2011, art. ID 304349, 5 p. DOI: 10.4061/2011/304349. Volume 2011.
- LUTTRELL, M. P.; STALLKNECHT, D. E.; FISCHER, J. R.; SEWELL, C. T.;KLEVEN, S. H. Natural *Mycoplasma gallisepticum* infection in a captive flock of house finches. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n.2, p.289-296, 1998.
- LUTRELL, P.; FISCHER, J. R. Mycoplasmosis In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious Diseases of Wild Birds**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p. 317-331.
- MACGREGOR-FORS, I.; MORALES-PÉREZ, L.; QUESADA, J.; SCHONDUBE, J. E. Relationship between the presence of House Sparrow (*Passer domesticus*) and Neotropical bird community structure and diversity. **Biological Invasions**, n. 12, p. 87-96, 2010.

MACHADO, L.; S.; NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; ALMEIDA, D. O.; SILVA, R. C. F.; SANTOS, L. M. M. *Mycoplasma gallisepticum* como fator de risco no peso de lotes de frangos de corte com condenação por aerossaculite na Inspeção Sanitária Federal. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 32, n. 7, p. 645-648, 2012.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Plano de contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle**, 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/page/mapa/programas/area_aniani/pnsa/plano%20de%20contingencia%20vers%20c3o%201.2-%20abril-2007.pdf> Acesso em 07 de setembro de 2012.

MAPA. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, 2011. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>>. Acesso em 05 de outubro de 2011.

MARCENIUK, A. P.; HILSDORF, A. W. S.; LANGEANI, F. A icitiofauna de cabeceiras do rio Tietê, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, vol. 11, n. 3, p.217- 236, 2011.

MARCONDES-MACHADO, L. O. Experiência de repovoamento com *Sicalis flaveola brasiliensis* (Gmelin, 1789) (Passeriformes, Emberizidae) em área destinada a pecuária leiteira. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 5, n. 2, p. 193-200, 1988.

MARZLUFF, J. M. Worldwide increase in urbanization and its effects on birds. In: MARZLUFF, J. M.; BOWMAN, R.; DONNELLY, R. **Avian Ecology and Conservation in an urbanizing world**, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 19-47.

MCCUNE, S.; ARRIOLA, C.; GILMAN, R. H.; ROMERO, M. A.; AYVAR, V.; CAMA, V. A.; MONTGOMERY, J. M.; GONZALES, A. E.; BAYER, A. M. Interspecies interactions and potential Influenza A virus risk in small swine farms in Peru. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 58, p. 1-10, 2012.

METTIFOGO, E.; BUIM, M. R.; TIMENETSKY, J.; FERREIRA, A. J. P.; BUZINHANI, M.; SAKATA, S. T. Multiplex polymerase chain reaction to detection of *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum* and *M. gallisepticum* F vaccine strain. In: **9º CONGRESSO ARGENTINO DE MICROBIOLOGIA**, 2001, Buenos Aires. Anais do 9º CONGRESSO ARGENTINO DE MICROBIOLOGIA, 2001, p. 178.

METTIFOGO, E.; BUIM, M. R. Doenças de origem bacteriana - *Mycoplasma gallisepticum*. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**, Barueri: Editora Manole, 2009, p. 86-100.

MILANELO, L. ASM Barragem Ponte Nova – Salesópolis, SP. In: **Relatório de Atividades das ASM- Áreas de soltura e monitoramento de animais silvestres**. Organizado pelo Departamento de Comunicação do IBAMA— SP, São Paulo, 2006, 56 p., ISBN 978-85-7300-285-0.

MILLAR, N. S.; CHAMBERS, P.; EMMERSON, P. T. Nucleotide sequence of the fusion and haemagglutination neuraminidase glycoprotein genes of Newcastle disease virus, strain

Ulster: molecular basis of variations of pathogenicity between strains. **Journal of General Virology**, n. 69, p. 613-620, 1988.

MINHARRO, S.; LINHARES, G.F.C.; ANDRADE, M.A.; ROCHA.P.T.; SANTANA, A.P. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no estado de Goiás, **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 2, 2001.

MIYATA, M.; OGAKI, H. Cytoskeleton of mollicutes. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 11, n. 3-5, p. 256-64, 2006.

MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; CARON, L. F. Influenza aviária. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**, Campinas: Facta- Fundação APINCO de Ciência e tecnologia Avícolas, 2º edição, 2009, p. 611-627.

MORENO, A. A. Prevenção, diagnóstico e controle. Técnicas moleculares de diagnóstico. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. Barueri: Editora Manole, 2009. p. 413-427.

MORISHITA, T.Y.; AYE, P.P.; LEY, E.C.; HARR, B.S. Survey of Pathogens and Blood Parasites in Free-Living Passerines. **Avian Diseases**, n. 43, p. 549-552, 1999.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, n. 403, p.853-858, 2000.

NASCIMENTO, E. R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M.. **Doenças das Aves**, Campinas: FACTA, 2000. p.217-224.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; NASCIMENTO, M.G.F.; BARRETO, M.L. Avian Mycoplasmosis Update. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.7, n.1, p.1-9, 2005.

NASCIMENTO, E.R.; NASCIMENTO, M. G.; VASCONCELOS, M.P.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; CAMPOS, C. A. M.; PEREIRA, V.L.A. Aprimoramento da PCR para *Mycoplasma gallisepticum* pelo encurtamento do “amplicon” e ajustes no processamento da amostra. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 297-301, 2005.

NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A. Micoplasmose. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, N. E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**, Campinas: FACTA, 2º edição, 2009, p. 485- 500.

NESTOROWICZ, A. T.; KAMAOKA, Y.; BEAN, W. J.; WEBSTER, R. G. Molecular Analysis of the Hemagglutinin genes of Australian H7N7 Influenza Viruses: role of passerine birds in maintenance or transmission?, **Virology**, n. 160, p. 411-418, 1987.

NODA, T.; SAGARA, H.; YEN, A.; TAKADA, A.; KIDA H.; CHENG, R.H.; KAWAOKA, Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in Influenza A virus particles. **Nature**, n. 439, p. 490-492, 2006.

OIE. World Organization for Animal Health, 2012a. Disponível em <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2012/>>. Acessado em 15 de setembro de 2012.

OIE. World Organization for Animal Health, 2012b. Avian influenza. Disponível em <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2012/>>. Acessado em 16 de outubro de 2012.

OLIVEIRA-JUNIOR, J.G.; PORTZ, C.; LOUREIRO, B.O.; SCHIAVO, P.A.; FEDULLO, L.P.L.; MAZUR, C.; ANDRADE, C. M. Serology for the Newcastle disease virus in non vaccinated birds in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Ciência Rural**, v. 2, n. 33, p. 381-383, 2003.

OLIVEIRA-JUNIOR, J.G.; SCHIAVO, P.A.; JÚNIOR, L.D.; ORSI, M.A.; MAZUR, C.; ANDRADE, C.M. Isolamento e caracterização biológica da amostra JAP99 do vírus da doença de Newcastle isolada de patos domésticos (*Neta sp*) no Rio de Janeiro. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 948-951, 2005.

PAULILLO, A. C.; JÚNIOR, L. D. Doença de Newcastle. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**, Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2º edição, 2009, p. 587-608.

PERKINS, L.E.L.; SWAYNE, D.E. Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 Avian Influenza Virus in four passerine species and budgerigars. **Veterinary Pathology**, n. 40, p. 14-24, 2003.

PIRATELLI, A. J.; SIQUEIRA, M.A.C., MARCONDES-MACHADO, L.O. Reprodução e muda de penas em aves de sub-bosque na região leste de Mato Grosso do Sul. **Ararajuba**, v. 8, n. 2, p. 99-107, 2000.

PODDAR, S.K. Influenza virus types and subtypes detection by single step tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. **Journal Virology Methods**, v. 99, n. 1-2, p. 63-70, 2002.

POSS, M.; BIEK, R.; RODRIGO, A. Viruses as Evolutionary Tools to Monitor Population Dynamics. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; TABOR, G. M.; HOUSE, C.; PEARL, M. C. **Conservation Medicine Ecological Health in Practice**, New York: Oxford University Press, Inc., 2002, p. 118-129.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 62, p. 1094-1156, 1998.

RENTAS. Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres, **1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre**, Brasília, 2002.

RITCHTZENHAIN, L. J.; SOARES, R. M. Técnicas Sorológicas e de Biologia Molecular In: CUBAS, Z.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens. Medicina Veterinária**, São Paulo: Editora Roca, 2007, p. 967- 979.

RIVERA-TAPIA, J.A.; CEDILLO-RAMÍREZ, M. L.; JUÁREZ, C.G. Some biological features of Mollicutes. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 44, n. 2, p. 53-57, 2002.

SALCEDO J. R. C. **Ocorrência de Influenza em aves selvagens e pássaros ornamentais no Rio de Janeiro**. 1980. 61f. Dissertação (Mestrado) - FIOCRUZ, Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 1980.

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.

SALESÓPOLIS, 2012. Disponível em <http://www.salesopolis.sp.gov.br/site/index.php?option=com_content&view=article&id=50:aspectosgeograficos&catid=7:historico&Itemid=54>, Acessado em 02 de outubro de 2012.

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

SANTOS, C. H. C. Diagnóstico microbiológico e sorológico. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**, Campinas: FACTA, 2º edição, 2009, p. 79-102.

SCHERER, A.L.; SCHERER, J.F.; PETRY, M.V.; SNADER, M. Occurrence and interaction of wild birds at poultry houses in southern Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 1, p. 74-79, 2011.

SELLWOOD, C. Brief History and Epidemiological Features of Pandemic Influenza. In: VAN-TAM, J.; SELLWOOD, C. **Introduction to Pandemic Influenza**, Cambridge: Cambridge University Press, 2010, p. 41-56.

SENNE, D.A.; SUAREZ, D.L.; PEDERSEN, J.C.; PANIGRAHY, B. Molecular and biological characteristics of H5 and H7 avian influenza viruses in live-bird markets of the northeastern United States 1994-2001. **Avian Diseases**, n. 47, suplemento 3, p. 898-904, 2003.

SENNE, D.A. Avian influenza in North and South America, 2002-2005. **Avian Diseases**, n. 51, suplemento 1, p. 167-173, 2007.

SHINYA, K.; EBINA, M.; YAMADA, S.; ONO, M.; KASAI, N.; KAWAOKA, Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. **Nature**, v. 440, p. 435-436, 2006.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997, 862 p.

SIGRIST, T. **Aves do Brasil. Uma visão artística. Conservação e manejo**, São Paulo: Fosfofertil e Ministério da Cultura, 2006, p. 104.

SIGRIST, T. **Guia de Campo Avifauna Brasileira**, Vinhedo: Editora Avis Brasilis, 2009, 2º edição, v. 1, 480 p. e v. 2, 600p.

SILVA, J.S.A.; MOT, R. A.; VILELA, S.M.O.; DORETTO, J.L.; PINHEIRO, J.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. **Brazilian Journal of Poultry Science** v. 8,n. 2, p. 125-129, 2006.

SILVA, R.C.F.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; BARRETO, M.L.; NASCIMENTO, M.G.F. *Mycoplasma synoviae* infection on Newcastle Disease Vaccination of Chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 39, p. 384-389, 2008.

SIMS, L.D. Lessons learned from Asian H5N1 outbreak control. **Avian Diseases**, v. 51, suplemento 1, p. 174-181, 2007.

SMITH,E.I.; REIF, J.S. ; HILL, A.E.; SLOTA, K.E.; MILLER,R.S.; BJORK, K.E.; PABILONIA, K.L. Epidemiologic Characterization of Colorado Backyard Bird Flocks, **Avian Diseases**, v. 56, p.263-271, 2012.

SINHA, S.K.; HANSON, R.P.; BRANDLY, C.A. Effect of Environmental Temperature Upon Facility of Aerosol Transmission of Infection and Severity of Newcastle Disease Among Chickens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 100, p. 162-168, 1957.

SOOS, C.; PADILLA, L.; IGLESIAS, A.; GOTTDENKER, N.; BÉDON, M.C.; RIOS, A.; PARKER, P.G. Comparison of pathogens in broiler and backyard chickens on the Galápagos islands: implications for transmission to wildlife. **The Auk**, v.125, n.2, p. 445-455, 2008.

SOS MATA ATLÂNTICA, 2012. Disponível em:
<<http://www.sosmatatlantica.org.br/index.php?section=info&action=mata>> Acesso em 18 de abril de 2012>.

SOUZA, D. **Todas as aves do Brasil - Guia de campo para identificação**. Feira de Santana: Editora Dall, 2º edição, 2004, 356 p.

STALLKNECHT, D. E.; NAGY, E.; HUNTER, D. B.; SLEMONS, R. D. Avian Influenza.. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious Diseases of Wild Birds**. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2007, p. 108-130.

STATES, S. L.; HOCHACHKA, W. M.; DHONDT, A. A. Spatial variation in a host community: implications for disease dynamics. Short Communication. **EcoHealth**, n. 6, p. 540-545, 2009.

STÄUBER, N.; BRECHTBUHHL, K.; BRUEKNER, L. ; HOFMANN, M.A. Detection of Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified cDNA. **Vaccine**, n. 13, p. 360-364, 1995.

SWAYNE, D. E.; HALVORSON, D. A. Influenza. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**, Iowa: Blackwell Publishing Professional, 12 ed., 2008. p. 153-184.

SYDENSTRICKER, K,V.; DHONDT, A.A.; LEY, D.H.; KOLIAS, G.V. Re-exposure of captive house finches that recovered from *Mycoplasma gallisepticum* infection. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n.2, p. 326-333, 2005.

SZABÓ, K. ; SZALMÁS, A.; LIKER, A.; BARTA, Z. Effects of haematophagous mites on nestling house sparrows (*Passer domesticus*). **Acta Parasitologica** n. 47, p. 318-322, 2002.

TAJIMA, M.; NUNOYA,T.;YAGIHASHI,T. An ultrastructural study on the interaction of *Mycoplasma gallisepticum* with the chicken trachea epithelium. **American Journal Veterinary Research** n. 40, p. 1009-14, 1979.

THOMAZELI, L.M.; ARAÚJO, J. de ; FERREIRA, C de S.; HURTADO, R.; OLIVEIRA, D.B.; OMETTO, T.; GOLONO, M.; SANFILIPPO, L.; DEMETRIO, C.; FIGUEIREDO, M.L.; DURIGON, E.L. Molecular Surveillance of the Newcastle Disease Virus in Domestic and Wild Birds on the Northeastern Coast and Amazon Biome of Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 1, p. 01-07, 2012.

TIMENETSKY, J. Micoplasmose - Conceitos gerais. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**, Barueri: Editora Manole, 2009, p. 82-85.

TOLEDO, M. C. B.; DONATELLI, R. J.; BATISTA, G. T. Relation between green spaces and bird community structure in an urban area in Southeast Brazil. **Urban Ecology**, v. 15, n. 1, p. 111-131, 2011.

TRAMER, E.J. Bird species diversity: components of shannon's formula. **Ecology**, v. 50, n. 5, p. 927-929, 1969.

VAN DEN BERG, T. The role of legal and illegal trade of live birds and avian products in the spread of avian influenza. **Revue scientifique et technique**, v. 28, n. 1, p. 93 -111, 2009.

VAN DER GOOT, J.A.; VAN BOVEN, M.; KOCH, G.; DE JONG, M.C.M. Variable effect of vaccination against highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus on disease and transmission in pheasant and teals. **Vaccine**, v. 25, p. 8318-8325, 2007.

VILLEGAS, M.; GARITANO-ZAVALA, A. Bird community responses to different urban conditions in La Paz, Bolivia. **Urban Ecosystems**, n. 13, p. 375-391, 2010.

VERHAGEN, J.H.; MUNSTER, V.J.; MAJOUR, F.; LEXMOND, P.; VUONG, O.; STUMPBEL, J.B.G.; RIMMELZWANN, G.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; SCHUTTEN, M.; SLATERUS, R.; FOUNCHIER, R.A.M. Avian Influenza A Virus in Wild Birds Highly Urbanized Areas. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. 1- 4, 2012.

WEBBY, R.J.; WEBSTER, R.G. Are We Ready for Pandemic Influenza? **Science**, v. 302, p. 1519-1522, 2003.

WEGE, D.; GOERCKE, J. M. Áreas importantes para a Conservação de Aves. In: BENCKE, G. A.; MAURICIO, G. N.; DEVELEY, P. F.; GOERCK, J. M. **Áreas importantes para a Conservação das Aves no Brasil**. Parte I – Estados do Domínio da Mata Atlântica. São Paulo: SAVE Brasil, 2006, p.17-24.

WOODFORD, M.H. Veterinary aspects of ecological monitoring: the natural history of emerging infectious diseases of humans, domestic animals and wildlife. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, p. 1023-1033, 2009.

XAVIER, J.; PASCAL, D.; CRESPO, E. *et al.* Seroprevalence of Salmonella and Mycoplasma infection in backyard chickens in the state of Entre Rios in Argentina. **Poultry Science**, v. 90, n. 4, p. 746-751, 2011.

YAGIHASHI, T. TAJIMA, M. Antibody response in sera and respiratory secretions from chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, n. 30, p. 543-50, 1986.

ZANETTI, F.; BERINSTEIN, A.; PEREDA A.; TABOGA O.; CARRILO, E. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. **Avian Diseases**, n.49, p. 546 -550, 2005.

ZHU, W.; DONG, J.; XIE, Z.; LIU, Q.; KHAN, M.I. Phylogenetic and pathogenic analysis of Newcastle disease virus isolated from house sparrow (*Passer domesticus*) living around poultry farm in southern China, **Virus Genes**, n. 40, p. 231-235, 2010.

APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu _____, concordo em participar como entrevistado no “Questionário de Aves de Criação Doméstica” sobre as minhas aves. Esta pesquisa é realizada em minha criação e tem por objetivo auxiliar na avaliação de sanidade das aves. Autorizo a coleta de suabe cloacal, suabe de traquéia e coleta de sangue para efetuar a pesquisa de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, Doença de Newcastle e Influenza Aviária.

Fica declarado que os dados coletados poderão ser divulgados em publicações científicas.

Sei também que não receberei e não precisarei efetuar qualquer pagamento sobre os exames realizados.

Casos positivos nas coletas poderão ser comunicados ao Escritório de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo.

Em casos de dúvida posso esclarecê-las com Marta Brito Guimarães, cujo endereço se localiza no Campus Universitário, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, tel: 11- 30917669.

Entrevistado: _____

Assinatura: _____

Data: _____

APÊNDICE B - Ficha de campo utilizada para as aves silvestres

Número da ave:

**FICHA DE CAMPO
CAPTURA DE AVES DE VIDA LIVRE**

Dados de campo

Data da captura: ____/____/____

Tipo de granja: Frangos de corte Galinhas poedeiras Matriz

Nome/Localização: _____

GPS: _____

Dados da ave

Nome comum: _____

Nome científico: _____

Captura Recaptura

Anilha: Capri Cemave/Ibama

Tamanho e numeração: _____

Idade: Jovem Adulto Indeterminado

Sexo: Macho Fêmea Indeterminado

Peso: _____

Comprimento *total*: _____ Comprimento *asa (d)*: _____

Comprimento *bico*: _____ Comprimento *tarso*: _____

Observações clínicas: _____
