RENATA KHODAIR SILVA

**Deteccção e caracterização moleculares dos paramixovírus aviários tipo 1
em materiais provenientes de aves silvestres utilizando testes para a
deteccção dos vírus da família viral Paramyxoviridae**

São Paulo

2016

RENATA KHODAIR SILVA

Deteccção e caracterização moleculares dos paramixovírus aviários tipo 1 em materiais provenientes de aves silvestres utilizando testes para a deteccção dos vírus da família viral Paramyxoviridae

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Helena Lage Ferreira

De acordo:

Orientador(a)

São Paulo

2016

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.3267
FMVZ

Silva, Renata Khodair

Detecção e caracterização moleculares dos paramixovírus aviários tipo 1 em materiais provenientes de aves silvestres utilizando testes para a detecção dos vírus da família viral Paramyxoviridae / Renata Khodair Silva. -- 2016.
73 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Helena Lage Ferreira.

1. Vírus. 2. Aves silvestres. 3. Molecular. 4. Detecção. 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 "Detecção e caracterização dos paramixovírus aviários em materiais provenientes de aves silvestres através de um RTPCR convencional", protocolado sob o nº 5201050214, utilizando 150 (cento e cinquenta) aves silvestres, entre aves aquáticas migratórias, aves de rapina e passeriformes, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Helena Lage Ferreira, foi aprovado *ad referendum* e 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.

São Paulo, 17 de dezembro de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Renata Khodair

Título: Detecção e caracterização moleculares dos paramixovírus aviários tipo 1 em materiais provenientes de aves silvestres utilizando testes para a detecção dos vírus da família viral Paramyxoviridae

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A minha família, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos me apoiando e me encorajando a nunca desistir dos meus objetivos e sonhos. Mostrando que sempre serei capaz de alcançá-los.

Sempre compreenderam os momentos de ausência, de fraqueza, de perdas e os mais felizes. Mesmo longe, estiveram presentes sempre.

Nada disso seria possível sem vocês. Esta conquista não é apenas minha, mas sim nossa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e irmãos pelo apoio recebido durante esta fase tão importante na minha vida.

À minha orientadora Profa Dra. Helena Lage Ferreira, pela confiança, pela atenção e dedicação a mim em todos os momentos que precisei e principalmente a paciência para me orientar e me passar todos os conhecimentos que tenho hoje. Muito, muito, muito obrigada!

Agradeço a todos do Laboratório Multiusuário de Saúde Animal e Segurança Alimentar pelos nossos momentos juntos. Em especial a Vanessa maravilhosa, sempre alegrando o laboratório e dando dicas valiosas. À Julia, a melhor técnica do mundo e a mais forte, que sempre disposta a nos ajudar dentro e fora do laboratório e pela sua amizade. Ao Guilherme, sempre me ajudando, tirando minhas dúvidas e curiosidades. Ao Raphael e a Laís, nós formamos o trio parada dura. Nossas rodas de discussão, apoios dentro e fora do laboratório, nossas tardes de trabalho e nossa amizade.

Aos que fizeram meus dias em Pirassununga especiais, divertidos e menos solitários: Erika, Eduardo, Emily, Matar, Cury, Bruna, Atanásio, entre outros.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação científica e principalmente ao Prof Dr. Ricardo Albuquerque, por ter apresentado a orientadora maravilhosa que tenho hoje e por me incentivar sempre.

À Universidade de São Paulo agradeço pela formação científica.

À CAPES, CNPq (Processo: 443250/2014-6), FAPESP (Processo: 2011/09019-0), FMVZ e FZEA

E a você que direta e indiretamente me ajudou e que não foi citado aqui, Um grande abraço, obrigada.

RESUMO

SILVA, R. K. **Detecção e caracterização moleculares dos paramixovírus aviários tipo 1 em materiais provenientes de aves silvestres utilizando testes para a detecção dos vírus da família viral Paramyxoviridae.** [Molecular detection and characterization of avian paramyxovirus type I in samples from wild birds by using molecular tests for detection of viruses from Paramyxoviridae family]. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As aves silvestres são importantes reservatórios de vírus que podem acometer as aves domésticas. O monitoramento da circulação viral em aves silvestres é de extrema importância para garantir a sanidade dos plantéis avícolas. O presente estudo teve como objetivo 1) comparar dois testes moleculares de RT-PCR para a detecção dos vírus da família Paramyxoviridae em aves silvestres e sinantrópicas; 2) caracterizar os vírus detectados nestas amostras. Dois testes de RT-PCR e testes específicos de RT-PCR em tempo real (RRT-PCR) para o vírus da doença de Newcastle (NDV) e o metapneumovírus aviário (aMPV) foram utilizados para comparar o limite de detecção entre as amostras. As amostras de aves silvestres foram testadas por dois testes de RT-PCR. Um pequeno fragmento da região do sítio de clivagem do gene F das amostras positivas foi sequenciado. Os testes de RT-PCR foram validados com sucesso, mas apresentaram diferenças entre os limites de detecção quando comparados aos testes específicos de RRT-PCR utilizando diferentes vírus. No total, 100 amostras de aves (suabes) foram testados pelo teste RT-PCR que apresentou um limite de detecção similar entre os diferentes agentes virais. O teste selecionado foi capaz de detectar duas amostras de aves silvestres que foram também detectadas pelo testes específico para NDV e relacionadas às amostras de NDV vacinais do genótipo II da classe II referentes aos vírus de NDV lentogênico (¹¹³RQGR ↓ L¹¹⁷). Nosso estudo demonstra a deficiência na biossegurança adotada pelos sistemas avícolas por permitir a saída dos vírus vacinais para as aves silvestres.

Palavras-chave: Vírus. Aves silvestres. Molecular. Detecção.

ABSTRACT

SILVA, R. K. **Molecular detection and characterization of avian paramyxovirus type I in samples from wild birds by using molecular tests for detection of viruses from Paramyxoviridae family.** [Detecção e caracterização moleculares dos paramixovírus aviários tipo 1 em materiais provenientes de aves silvestres utilizando testes para a detecção dos vírus da família viral Paramyxoviridae]. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Wild birds are important reservoirs of viruses can affect poultry. Surveillance of circulating viruses in wild birds is of the most importance tool to ensure the poultry health. The present study aimed to 1) compare two molecular tests for detection of family Paramyxoviridae viruses in wild and feral birds; 2) characterize the detected viruses in those samples. Two RT-PCR techniques and specific real time RT-PCR (RRT-PCR) assays for detection of Newcastle disease virus (NDV) and avian metapneumovirus (aMPV) were used to compare the limit of detection among them. Wild bird samples were tested by using two RT-PCR tests. A small fragment of cleavage site region in F gene from positive samples was sequenced. The RT-PCR were successfully validated, however they had differences in the limit of detection when compared to specific RRT-PCR assays using different viruses. In total, 100 wild bird samples (swabs) were tested by the selected RT-PCR with similar limit of detection between tested viruses. Two samples were positive by this test and they were also detected by the specific RRT-PCR for NDV. These samples were closed related to vaccinal NDV strains belonging to genotype II class II. Deduced amino acid sequences of cleavage site region from detected samples were characterized as lentogenic NDV strains (¹¹³RQGR ↓ L¹¹⁷). Our study demonstrates the poor biosafety used by poultry industry allowing the vaccinal escape to wild bird species.

Keywords: Virus. Wild birds. Molecular. Detection.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 - Representação do RNA genômico do gênero Avulavírus e Metapneumovírus.....	21
Figura 2 - Ilustração esquemática do vírus da Doença de Newcastle	22
Figura 3 - Ilustração esquemática do ciclo replicativo da família Paramyxoviridae.....	15
Figura 4 - Focos de NDV relatados no mundo entre 1 de janeiro de 2005 a 20 de dezembro de 2015.....	24
Figura 5 - Genotipos de NDV pertencentes à classe II.....	28
Figura 6 - Cenário mundial da produção, importação e exportação de carne de frango.....	40

Comparação de testes moleculares para a detecção de vírus pertencentes à família paramyxoviridae em aves silvestres brasileiras

Figura 7 - RT-PCR convencional para detecção da família Paramyxoviridae.....	52
Figura 8 - Análise filogenética das amostras.....	57

LISTA DE QUADROS

Introdução

- Quadro 1 – Características gerais dos diferentes protótipos dos paramixovírus aviário pertencentes ao gênero Avulavírus..... 19
- Quadro 2 - Patotipos de NDV e suas características clínicas e patogenicidade..... 31

Comparação de testes moleculares para a detecção de vírus pertencentes à família paramyxoviridae em aves silvestres brasileiras

- Quadro 3 - Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação do material genético dos testes moleculares 50
- Quadro 4 - Limite de detecção entre os testes moleculares para a detecção da família Paramixoviridae..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS

APMV	Paramixovírus aviário
pb	Pares de base
cELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática competitivo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EUA	Estados Unidos da América
F	Fusão
F0	Precursor da proteína de fusão
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo
G	Glicoproteína de ligação
HA	Teste de Hemaglutinação
HI	Inibição da Hemaglutinação
HN	Hemaglutinina-neuraminidase
K	Lisina
L	Proteína polimerase grande
LANAGRO	Laboratório nacional agropecuário
LOD	Limite de detecção
M	Proteína de matriz
M2	Proteína de matriz
MAb	Anticorpos monoclonais
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mRNA	RNA mensageiro
NP	Nucleoproteína
nm	Nanômetros
NDV	Vírus da doença de Newcastle
NP	Nucleoproteína
nt	Nucleotídeos
IN	Instrução normativa
IPIC	Índice de patogenicidade intracerebral

OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
P	Fosfoproteína
PCR	Reação de polimerase em cadeia
R	Arginina
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAg	RNA genômico
RNP	Ribonucleoproteína
RRT-PCR	<i>Real time</i> RT-PCR
RT-PCR	Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase
SH	Proteína pequena hidrofóbica
SPF	Livres de patógenos específicos
vNDV	Vírus da Doença de Newcastle velogênico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	FAMÍLIA PARAMIXOVIRIDAE	14
1.2	GÊNERO <i>AVULAVIRUS</i>	14
1.3	DOENÇA DE NEWCASTLE	17
1.4	O VÍRUS	21
1.5	DIVERSIDADE GÊNICA DO NDV	24
1.6	EPIDEMIOLOGIA DO NDV	29
1.7	PATOGENICIDADE DO NDV	30
1.8	IMUNIDADE	31
1.9	SINAIS CLÍNICOS	33
1.10	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	33
1.10.1	Testes moleculares	33
1.10.2	Caracterização da Patogenicidade	34
1.10.3	Testes sorológicos	35
1.11	CONTROLE E PROFILAXIA	36
1.11.1	Biossegurança	37
1.11.2	Vacinação	38
1.12	A AVICULTURA NO BRASIL	39
1.13	IMPACTO ECONÔMICO E SOCIAL	40
2	OBJETIVOS	42
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
3	COMPARAÇÃO DE TESTES MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS PERTENCENTES À FAMÍLIA PARAMYXOVIRIDAE EM AVES SILVESTRES BRASILEIRAS.....	43
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA PARAMIXOVIRIDAE

A ordem viral Mononegavirales, que compreende os vírus de RNA com fita negativa não segmentada, é composta por cinco famílias: Paramyxoviridae, Filoviridae, Bornaviridae, Nyamiviridae e Rhabdoviridae (ICTV, 2014). Os vírus da família Paramyxoviridae causam doenças em humanos e animais, acometendo alto índice de espécies hospedeiras quando comparados a outras famílias virais (WINSLOW et al., 1950). Esta família viral é dividida em duas subfamílias denominadas de Paramyxoviridae e Pneumovirinae.

A subfamília Paramyxoviridae é composta por sete gêneros: *Aquaparamyxovirus*, *Rubulavirus*, *Respirovirus*, *Ferlavirus*, *Morbillivirus*, *Hepanivirus* e o *Avulavirus*. O gênero *Avulavirus*, em especial o vírus da doença de Newcastle, pode afetar aves silvestres e domésticas tanto em produção industrial quanto de fundo de quintal (ALEXANDER; SENNE, 2008). Treze sorotipos já foram identificados dentro deste gênero (ALEXANDER; SENNE, 2008; MILLER et al., 2010; BRIAND et al., 2012; TERREGINO et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2015).

A subfamília Pneumovirinae é composta pelos gêneros *Metapneumovirus* e *Pneumovirus*. O gênero *Metapneumovirus* pode acometer humanos e aves silvestres e domésticas. O metapneumovírus aviário (aMPV) apresenta quatro sorotipos denominados como: aMPV/A, aMPV/B, aMPV/C e aMPV/D (ICTV, 2014).

1.2 GÊNERO *AVULAVIRUS*

O gênero *Avulavirus* é representado pelo vírus da doença de Newcastle (NDV), também conhecido como paramixovírus aviário do tipo 1 (APMV-1), que é o mais importante patógeno em aves domésticas (ALEXANDER; JONES, 2008; DHAMA; MAHENDRAN;

TOMAR, 2008). Treze sorotipos de paramixovírus aviário (APMV-1 a 13) foram descritos dentro do gênero *Avulavirus* classificados baseados no teste sorológico de inibição da hemaglutinação (HI) (MILLER et al., 2010; BRIAND et al., 2012; TERREGINO et al., 2013; ICTV, 2014; YAMAMOTO et al., 2015).

Análises filogenéticas baseadas no sequenciamento gênico de diversos isolados de APMV-1 e pelo menos de um vírus de cada sorotipo reforçam a mesma classificação dos nove sorotipos baseada na sorologia. As sequências genômicas completas dos NDV foram determinadas por um grande número de estirpes. Por isso, há uma grande quantidade de informações sobre sua patogênese e biologia molecular, contrastando com poucos dados disponíveis dos demais sorotipos de APMV (NAYAK et al., 2012).

Figura 1 - Ilustração esquemática do ciclo replicativo da família Paramyxoviridae

Fonte: (ARNS; SPILKI; DE ALMEIDA, 2007)

Legenda: 1) Ligação aos receptores; 2) Penetração por fusão do envelope viral com a membrana plasmática; 3) Transcrição do RNA mensageiro (mRNA) pelo complexo polimerase; 4) Tradução das proteínas virais pelos ribossomos celulares; 5) Síntese de RNA antígeno e replicação do RNA genômico pelo complexo polimerase; 6) Processamento e transporte das proteínas do envelope e inserção na membrana plasmática; 7) Morfogênese; 8) Egresso

Os vírus dos subtipos APMV-2, APMV-3, APMV-6 e APMV-7 tem como hospedeiros naturais aves silvestres, porém podem acometer aves domésticas, causando doenças respiratórias e queda na produção de ovos em poedeiras (ALEXANDER; SENNE, 2008). Em perus o subtipo APMV-2 está associado com doenças respiratórias leves e infertilidade, além de ter sido isolado recentemente em quatro amostras de Caradriiformes no estado do Rio de Janeiro (FORNELLS et al., 2013).

O APMV-3 é associado à encefalite, doenças respiratórias em peru e atrofia no crescimento de frangos jovens (ALEXANDER; PATTISON; MACPHERSON, 1983). Além de ter sido isolado a partir de suabes orofaríngeos e cloacais de avestruzes namibianos clinicamente saudáveis e foram designados como APMV-3b (KALETA; WERNER; HEMBERGER, 2010).

O APMV-4 tem sido isolado em Anseriformes e galinhas domésticas (TUMOVA; ROBINSON; EASTERDAY, 1979). No qual foi dividido em subgrupos A e B a partir de amostras de patos silvestres na Coreia coletados de 2006 a 2010: subgrupo A foi isolado em toda Coreia e B apenas na ilha de Cheju em 2011 (CHOI et al., 2013).

Os APMV-5 foram isolados de psittacídeos e são responsáveis pela doença nos Periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*), causando depressão, dispnéia, diarreia, torcicolo, enterite aguda fatal e mortalidade elevada (NEROME et al., 1978).

Os APMV-6 foram isolados pela primeira vez de pato doméstico, sendo responsáveis por causar infecção respiratória leve e queda na produção de ovos em perus, sendo avirulento em frangos (ALEXANDER, 2000; CHANG et al., 2001). O APMV - 6 / Japão / 8KS0813 / 08 é distinguível antígenoica e geneticamente a partir da estirpe protótipo, sugerindo que a variante de APMV - 6 tem circulado em aves migratórias (BUI et al., 2014).

O APMV-7 foi isolado a partir de uma pomba e em surtos naturais de doenças respiratórias em perus. Em perus causam diminuição na produção de ovos, doenças respiratórias e aerossaculite multifocal linfocítica nodular leve (SAIF et al., 1997). O isolado de pomba (protótipo estirpe / Tennessee / 4/75) foi classificado como avirulento em galinhas, a partir de isolamento viral em ovos embrionados, resultando em mortalidade de aproximadamente 144h (XIAO et al., 2009).

O APMV-8 foi isolado a partir de um ganso e de um marreco-arrebio selvagem (YAMANE et al., 1982) e o APMV-9 foi isolado a partir de patos em todo o mundo (CAPUA et al., 2004).

Novos isolados foram classificados em quatro sorotipos de paramixovírus aviários por apresentarem características antigênicas e genéticas distintas dos outros sorotipos existentes: (a) um isolado de pinguins de penacho amarelo classificado como protótipo do sorotipo 10 amarelo e no Brasil em pinguins de Magalhães no Estado do Espírito Santo, juntamente com o subtipo APMV-2 (MILLER et al., 2010; FORNELLS et al., 2012); (b) um isolado de narceja (*Gallinago gallinago*), foi classificado como prototipo do novo sorotipo 11 (BRIAND et al., 2012); (c) um isolado de patos (*Anas penelope*) foi classificado como prototipo do sorotipo 12 (TERREGINO et al., 2013); (d) recentemente, foi isolado o sorotipo APMV-13 originado de fezes de gansos silvestres no Japão (YAMAMOTO et al., 2015). Os protótipos de cada sorotipo viral e os hospedeiros naturais estão descritos no Quadro 1.

1.3 DOENÇA DE NEWCASTLE

A doença de Newcastle foi descrita inicialmente em 1926 como altamente patogênica, na Ilha de Java, Inglaterra e Newcastle-on-Tyne e em parte da Indonésia (KRANEVELD, 1926; DOYLE, 1927). Surtos semelhantes ao da doença de Newcastle ocorreram antes desse período, mas os conhecimentos sobre doenças em aves domésticas eram limitados e não houve confirmação.

A doença de Newcastle é uma doença infecciosa das aves causada por um paramixovírus aviário sorotipo 1 (APMV-1) de notificação obrigatória imediata ao serviço veterinário oficial, listada na Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (OIE, 2015). Considerada uma das doenças mais avassaladoras que acometem galinhas e outras aves domésticas, os surtos causam a eliminação de inúmeras aves em diversos países e restrições comerciais (ALEXANDER, 2001). Os vírus com patogenicidade elevada, conhecidos como velogênicos, causam um alto impacto econômico devido às restrições comerciais. Eles apresentam características específicas baseadas por critérios de patogenicidade, como o índice

de patogenicidade intracerebral (IPIC) de pelo menos 0,7 em pintos de um dia de idade livres de patógenos específicos (SPF), ou pela presença de múltiplos aminoácidos básicos (arginina –R- e lisina- K) entre os resíduos 113 e 116 e fenilalanina no posição 117 do sítio de clivagem do precursor proteína de fusão (F0) (OIE, 2015). Surto causado pelos vírus de patogenicidade elevada não se limitam apenas nas aves acometidas, mas sim pelo impacto econômico negativo causado pela restrição do comércio de animais e subprodutos devido a interdição de países com focos da doença (OIE, 2015).

Quadro 1 - Características gerais dos diferentes protótipos dos paramixovírus aviário pertencentes ao gênero *Avulavirus*

(Continua)

Prototipo viral	Hospedeiros naturais	Outros hospedeiros	Doenças causadas em aves domésticas
APMV-1- Newcastle disease virus	Mais de 250 espécies	Mais de 250 espécies	Variável entre extremamente patogênica a ausente de acordo com o hospedeiro e estirpe viral
APMV-2/chicken/California/Yucaipa/56	Perus, pássaros	Psitacídeos, gruiformes, galinhas	Doença respiratória e queda na produção Sinais respiratórios moderado.
APMV-3*/turkey/Wisconsin/68	Perus	Desconhecido	Problemas de queda de postura graves exacerbados pelo ambiente
APMV3*/parakeet/Netherlands/449/75	Psitacídeos	Pássaros e Flamingos	Doença respiratória, entérica e neurológica
APMV-4/duck/Hong Kong/D3/75	Patos	Perus e Gansos	Pneumonia intersticial e traqueíte catarral em galinhas
APMV-5/budgerigar/Japan/Kunitachi/74	Psitacídeos	Desconhecido	Alta mortalidade, doença entérica
APMV-6/duck/Hong Kong/199/77	Patos	Gansos, perus, gruiformes	Doença respiratória moderada e aumento da mortalidade em perus

Prototipo viral	Hospedeiros naturais	Outros hospedeiros	(Conclusão)	
			Doenças causadas em aves domésticas	
APMV-7/dove/Tennessee/4/75	Pombos e perus	Perus e Avestruzes	Doença respiratória moderada	
APMV-8/goose/Delaware/1053/76	Patos e Gansos	Desconhecido	Desconhecido	
APMV-9/domestic duck/New York/22/78	Patos	Desconhecido	Desconhecido	
APMV-10/penguin/Falkland Islands/324/2007	Pinguins rockhopper	Desconhecido	Desconhecido	
APMV-11/Common snipe/France/100212/2010	Narcejas	Desconhecido	Desconhecido	
APMV-12/wigeon/Italy/3920-1/2005	Patos	Desconhecido	Desconhecido	
APMV-13/wild geese/Japan/Shimane67/2015	Gansos	Desconhecido	Desconhecido	

Fonte: Adaptado de (ALEXANDER; SENNE, 2008; MILLER et al., 2010; BRIAND et al., 2012; TERREGINO et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2015).

1.4 O VÍRUS

O genoma desta família viral é composto por um RNA genômico (RNAg) de fita negativa não segmentada com um tamanho aproximado de aproximadamente 13 a 15 kilo bases (EASTON; DOMACHOWSKIE; ROSENBERG, 2004). O genoma dos vírus do gênero *Avulavírus* é composto por seis genes: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), matriz (M), fusão (F), hemaglutinina-neuraminidase (HN) e proteína polimerase grande (L) (ALEXANDER; JONES, 2008) (Figura 1). O gene P codifica outras proteínas, como V e W, que são responsáveis pela diminuição da resposta imune hospedeira, além de ter funções similares à proteína P na replicação viral (GANAR et al., 2014). O genoma dos vírus do gênero *Metapneumovírus* é composto por oito genes: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), matriz (M), fusão (F), matriz 2 (M2), pequena hidrofóbica (SH), Glicoproteína de ligação. (G) e proteína polimerase grande (L) (EASTON; DOMACHOWSKIE; ROSENBERG, 2004). A proteína G não apresenta função de hemaglutinação e neuraminidase, por isso, os vírus do gênero *Metapneumovírus* não possuem capacidade de hemaglutinar hemácias (COLLINS & GOUGH, 1988).

Figura 2 - Representação do RNA genômico do gênero *Avulavírus* e *Metapneumovírus*

Gênero *Avulavírus*

Gênero *Metapneumovírus*

Fonte: (EASTON; DOMACHOWSKIE; ROSENBERG, 2004) Adaptado por Helena Lage Ferreira (2016)

Legenda: Os retângulos representam os genes individuais. NP) nucleoproteína; P/V/W) Fosfoproteína; M) Proteína da Matriz, F) proteína da fusão; HN) hemaglutinina-neuraminidase; L) polimerase; M2) Proteína da Matriz 2; SH) proteína pequena hidrofóbica; G) Glicoproteína de ligação.

Na arquitetura complexa dos vírus da família viral há um envelope lipoprotéico, um nucleocapsídeo e uma proteína de matriz. As partículas víricas são envelopadas, esféricas ou

pleomórficas, que apresentam 150 a 300 nanômetros (nm) de diâmetro. As partículas filamentosas são frequentes podendo ter a extensão de 1.000 a 10.000 nm. Em células infectadas a única estrutura visível por microscopia eletrônica é o envelope que apresenta uma espessura de 7 a 15 nm recoberto por projeções glicoproteicas na superfície com extensões de 8 a 20 nm. O nucleocapsídeo apresenta simetria helicoidal com diâmetros de 13 a 18 nm por 600 a 1.000 nm de extensão, que com as nucleoproteínas, fosfoproteínas e polimerases forma o complexo ribonucleoproteína (RNP). Este complexo auxilia na síntese de RNA durante a transcrição e a replicação do genoma. Os vírions apresentam não só glicoproteínas de envelope e proteínas do nucleocapsídeo, mas também múltiplas cópias de proteínas de matriz que preenchem o espaço entre nucleocapsídeo e envelope (Figura 2).

A replicação do vírus é intracitoplasmática, no qual o RNA viral tem sentido negativo e a RNA polimerase produz transcrições complementares de sentido positivo para duas finalidades: 1) molde para o novo RNA genômico e molde para a tradução proteica como RNA mensageiro. Aos vírus da doença de Newcastle possuem a replicação viral eficiente apenas se o genoma viral for múltiplo de 6, conhecida como a “regra de seis”, nos vírus deste gênero (PEETERS et al., 2000).

Figura 3 - Ilustração esquemática do vírus da Doença de Newcastle

Fonte: Modificado de (EASTON; DOMACHOWSKIE; ROSENBERG, 2004)

Legenda: As proteínas NP, P/V/W, L juntamente com o RNA genômico (RNAg) formam o complexo da RNP.

A proteína NP tem aproximadamente 80% da sua sequência conservada e está associada ao genoma viral, pois forma o nucleocapsídeo que é responsável pela proteção do genoma, mantendo-se associada ao genoma viral durante a transcrição e replicação. A concentração de proteína NP está associada à transição entre a transcrição e a replicação do genoma. O complexo RNP é formado pelo RNA viral associado à aproximadamente 2.500 cópias da proteína NP, 300 cópias da proteína P e 50 moléculas da proteína L, que representa a subunidade catalítica da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A proteína L só exerce sua atividade a partir da formação do complexo com a proteína P, este complexo é essencial para a atividade da polimerização a partir de moldes de RNA conjugados pela proteína NP (LAMB; PARKS, 2007). As sequências de nucleotídeos (nt) são conservadas em membros de uma subfamília, não observando a mesma conservação em subfamílias diferentes, destas sequências cinco estão localizadas próximo ao centro do gene e apresentam alta homologia que parecem codificar domínios proteicos essenciais para a atividade da RdRp. A proteína P está envolvida na mudança da transcrição para a replicação. Com a adição de 1 ou 2 nucleotídeos na tradução do gene P, há a formação das proteínas V ou W. Estas proteínas são determinantes para a replicação viral (GANAR et al., 2014).

Os paramixovírus possuem propriedades biológicas particulares que caracterizam o grupo. O vírus do gênero *Avulavirus* possuem a capacidade de aglutinar glóbulos vermelhos é uma delas, isso ocorre pela ligação das proteínas hemaglutinina-neuraminidase aos receptores na superfície das hemácias. Esta propriedade e a inibição específica da aglutinação por antissoro são utilizadas como testes diagnósticos (BURNET, 1942). Todas as estirpes de NDV são capazes de aglutinar hemácias de anfíbios, répteis, células aviárias (LANCASTER, 1966). Contudo, apenas algumas estirpes virais são capazes de aglutinar hemácias de bovinos, cabras, ovinos, suínos e cavalos (WILSON; SKEHEL; WILEY, 1981). As glicoproteínas HN estão localizadas no envelope projetadas como espículas a partir da superfície viral. Estas glicoproteínas são responsáveis pela adsorção do vírus ao receptor da célula hospedeira. A HN está associada a capacidade de clivar o receptor celular (ácido siálico), evitando que partículas virais se liguem a células já infectadas ou fiquem retidas na membrana celular durante o egresso do vírion recém-formado (IORIO; MAHON, 2008).

Em muitos paramixovírus, a co-expressão de HN e F causam a formação dos sincícios, indicando a participação da proteína HN na atividade fusogênica. A proteína de

fusão (F) é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular, promovendo a penetração do nucleocapsídeo na célula hospedeira (PEETERS et al., 1999). O precursor da proteína da fusão (F0) necessita da clivagem de F1 e F2 para tornar-se ativo, exercendo um papel determinante para a patogenicidade viral, pois esta clivagem é essencial para a infectividade dos paramixovírus. A clivagem ocorre no interior da vesícula do complexo de Golgi, durante o transporte das proteínas virais para a membrana plasmática (SCHEID; CHOPPIN, 1974). A proteína SH está localizada na região extracelular e sua função não está elucidada, porém sua deleção causa uma diminuição representativa na eficiência de fusão e formação de sincícios (LAMB; PARKS, 2007).

A proteína M é a mais encontrada no vírion, pois preenche o espaço entre o capsídeo e o envelope e auxilia na interação entre o nucleocapsídeo viral e a membrana da célula hospedeira durante a morfogênese, maturação e brotamento do vírion. Essas interações induzem ao brotamento de novas partículas na superfície da célula hospedeira (PEEPLES; BRATT, 1984) após a interação da proteína M com a proteína NP (ARNS; SPILKI; DE ALMEIDA, 2007) (Figura 3).

1.5 DIVERSIDADE GÊNICA DO NDV

Os vírus de NDV já foram detectados nos principais países produtores de aves (Figura 4). Os paramixovírus aviários, também conhecidos como NDV, podem ser classificados em duas “classes” geneticamente divergentes: classe I e classe II (CZEGLEDI et al., 2006). Os vírus pertencentes à classe II já foram classificados de diversas formas (ALDOUS et al., 2003; CZEGLEDI et al., 2006). Contudo, estas classificações geraram genótipos e diversos subgenótipos (muitas vezes com diversidade genética maior que muitos genótipos) (MILLER; DECANINI; AFONSO, 2010). Por isso, uma nova nomenclatura foi proposta, baseada em sequências completas do gene F, composta por 15 genótipos. Recentemente, novos genótipos foram adicionados desde 2012 (COURTNEY et al., 2013; DE ALMEIDA et al., 2013; SNOECK et al., 2013) e hoje 18 genótipos (nomeados I ao XVIII) circulam em todo o mundo (DIMITROV et al., 2016) (Figura 5).

Figura 4 - Focos de NDV relatados no mundo entre 1 de janeiro de 2005 a 20 de dezembro de 2015

Fonte: (OIE, 2015)

Os vírus do genótipo I são atualmente classificados em 3 subgenótipos: Ia, Ib e Ic. Estes vírus são classificados como lentogênicos e velogênicos e causam infecções em aves domésticas e silvestres (DIMITROV et al., 2016).

Os vírus do genótipo II foram detectados na América do Norte, África, Ásia, Europa, América do Sul em aves domésticas (galináceos e aves aquáticas) (SEAL, 2004; ORSI et al., 2010a; UTHRAKUMAR et al., 2014). Estes vírus são amplamente utilizados para vacinas, como os vírus LaSota e B1 (YU et al., 2001). Diversos isolados deste genótipo já foram classificados como velogênicos (UTHRAKUMAR et al., 2014), demonstrando a importância econômica deste genótipo para a avicultura comercial.

Os vírus do genótipo III foram responsáveis por surtos no Reino Unido, Zimbábue e Cingapura em aves domésticas (galináceos e aves aquáticas). Todos os vírus deste genótipo são classificados como velogênicos de acordo com a sequência de aminoácidos do sítio de clivagem da proteína F (KHAN et al., 2010). Alguns autores sugerem que este genótipo tenha emergido do escape vacinal de um vírus mesogênico (estirpe Mukteswar) com uma posterior mutação (ALDOUS et al., 2003).

O genótipo IV circulou na Europa entre 1933 a 1940 e depois na década de 70 (CZEGLEDI et al., 2006). A estirpe Herts/33 tem sido utilizada com representativa deste genótipo (DIMITROV et al., 2016). Alguns surtos ocorreram fora da Europa, como Rússia na década de 70, na África no ano de 1991 e na Ásia no ano de 1989. Deste então, este genótipo não tem sido relatado nas aves domésticas (DIMITROV et al., 2016).

O genotipo V apresenta 4 subgenotipos: Va, Vb, Vc, Vd. Todos os vírus deste genotipo são classificados como velogênicos pela análise do sítio de clivagem e alguns como mesogênicos pela patotipagem in vivo (DIMITROV et al., 2016). Estes vírus já foram detectados em aves domésticas, patos e psitacídeos. Eles emergiram na América Central e América do Sul, na década de 70, inclusive no Brasil (FERNANDES et al., 2014) e depois foram introduzidos para a Europa, América do Norte e África (MILLER; DECANINI; AFONSO, 2010).

O genotipo VI, também conhecido como paramixovírus de pombos sorotipo I ou PPMV-1, é considerado panzootico e possui limitação de hospedeiro. Este genotipo apresenta 9 subgenotipos (VIa ao VIi) com uma grande diversidade genética. Ele tem sido detectado principalmente em Columbiformes (aves domésticas e silvestres) e em algumas (poucas) aves domésticas (DIMITROV et al., 2016).

O genotipo VII circula em todo o mundo, África, Ásia, Oriente Médio, América do Sul e Europa (LIU et al., 2008b; LIU et al., 2008a). Este genotipo apresenta uma enorme diversidade genética, também com 9 subgenotipos (VIIa ao VIIi) (DIMITROV et al., 2016).

O genotipo VIII foi relatado na década de 60 na Argentina, China e Malásia. Há muitas décadas não vem sendo relatado, o que implica em sua provável extinção. Todos os vírus deste genotipo foram classificados como velogênicos (DIMITROV et al., 2016).

O genotipo IX tem sido detectado principalmente na China (ZHANG et al., 2011). Todos os vírus deste genotipo são classificados como velogênicos pelo sequenciamento gênico (ZHANG et al., 2011), embora alguns isolados sejam classificados como lentogênicos pelo teste de patogenicidade in vivo (DUAN et al., 2014). Este vírus são detectados em aves domésticas e silvestres assintomáticas (DUAN et al., 2014).

O genotipo X circula na Argentina e nos Estados Unidos em aves silvestres (ZANETTI et al., 2005; MILLER et al., 2009) e perus (HINES et al., 2012). Estes vírus são caracterizados como lentogênicos.

O genotipo XI é proveniente de estirpes isoladas de Madagascar (MAMINIAINA et al., 2010; DE ALMEIDA et al., 2013). Estes vírus são classificados como velogênicos pelo sequenciamento gênico, embora tenham sido detectados de aves domésticas (frangos) sadias não vacinadas e de aves doentes (MAMINIAINA et al., 2010; DE ALMEIDA et al., 2013).

O genotipo XII tem sido detectado na América do Sul e China em aves domésticas. Estes vírus são classificados como velogênicos pelo sequenciamento gênico e pelo teste de patogenicidade in vivo (DIEL et al., 2012; HINES et al., 2012).

O genotipo XIII circula na Eurásia e África e apresenta dois subgenotipos. Estes vírus velogênicos têm sido isolados de aves domésticas doentes e sadias e aves silvestres (CATTOLI et al., 2010; MUNIR et al., 2012).

O genotipo XIV foi descrito recentemente na África e apresenta dois subgenotipos (DE ALMEIDA et al., 2013). Estes vírus foram classificados como velogênicos pelo sequenciamento gênico a partir de amostras de aves domésticas (galináceos). Estes subgenotipos continuam circulando na África e sua variabilidade genética continua aumentando apesar da prática de vacinação nestas aves (VAN BORM et al., 2012).

Figura 5 - Genotipos de NDV pertencentes à classe II

Fonte: (DIMITROV et al., 2016)

As sequências do genotipo XV foram identificadas como recombinantes de isolados virais de frangos e gansos na China entre 1997 e 2004. Contudo, estes vírus parece que não circulam mais em aves domésticas e silvestres e são geralmente excluídos dos estudos filogenéticos (DIMITROV et al., 2016).

Os vírus do genotipo XVI foram encontrados apenas no México em 1948 e na República Dominicana entre os anos de 1986-2008. Estes vírus foram classificados como

velogênicos pelo sequenciamento gênico a partir de amostras de aves domésticas (galináceos) (COURTNEY et al., 2013).

O genotipo XVII também tem sido detectado apenas em aves domésticas na África. Este genotipo é dividido em dois subgenotipos. Estes vírus são classificados como velogênicos pelo sequenciamento gênico a partir de amostras de aves domésticas (galináceos) (CATTOLI et al., 2010; VAN BORM et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2013).

O genotipo XVIII apresenta similaridades entre os genotipos XIV e XVII. Estes vírus também apresentam dois subgenotipos e parecem estar disseminados nas aves domésticas e infectam esporadicamente as aves silvestres (CATTOLI et al., 2010; DE ALMEIDA et al., 2013; SNOECK et al., 2013).

1.6 EPIDEMIOLOGIA DO NDV

As aves silvestres, especialmente aves de rapina, passeriformes e aquáticas migratórias são consideradas reservatórios importantes de vários patógenos (CHA; YU; ZSAK, 2013). Diferentes genotipos de NDV já foram isolados a partir de amostras destes animais e os mesmos são assintomáticos, possuindo papel importante na disseminação da doença para as aves domésticas (PEARSON; MCCANN, 1975).

O vírus de NDV já foi detectado em mais de 250 espécies de aves, correspondendo a 27 classes de um total de 50 (ALEXANDER, 1995). As espécies mais susceptíveis às infecções por estes vírus são: galinhas, galinhas d'angola, faisões, codornas e pombos, em contrapartida patos, gansos e aves de rapina aparentemente são mais resistentes. Há relatos de doença aguda em algumas espécies, como: pigargos (*Haliaeetus albicilla*), águia pescadora (*Pandion haliaetus*), abutres barbudos (*Gypaetus barbatus*), gaivotas (ordem Charadriiformes), pelicanos (ordem Pelecaniformes), corujas (ordem Strigiformes) e faisões de vida livre, psitacídeos e outras aves silvestres. Enquanto outras espécies de aves podem não apresentar sinais clínicos da doença (ALEXANDER, 2001; ALEXANDER; SENNE, 2008).

A transmissão de NDV é horizontal, uma vez que ocorre a partir da inalação ou ingestão de partículas ou gotículas de material excretado infectado (ALEXANDER; SENNE,

2008). A transmissão aerógena do agente depende de fatores como: temperatura, densidade e umidade do ambiente (LI et al., 2009). Acredita-se que esta seja a via de transmissão primária.

A presença de indivíduos portadores da doença, a presença de aves susceptíveis, a presença de aves silvestres e domésticas infectadas no mesmo ambiente que aves suscetíveis é o principal fator de risco para a introdução e manutenção de NDV em uma população (LI et al., 2009). A introdução e propagação viral em áreas livres estão principalmente relacionadas com o comércio mundial de aves de cativeiro e aves de recria, rotas de migração de aves silvestres, o intercâmbio de insumos e água contaminados e a comercialização de produtos agrícolas (ALEXANDER; SENNE, 2008).

1.7 PATOGENICIDADE DO NDV

A base molecular da patogenicidade é baseada em diferentes sequências da proteína precursora da fusão, a F0, que durante a replicação é clivada em F1 e F2 para que as partículas virais da progênie se tornem infecciosas (LAMB; KRUG, 2001). Esta clivagem pós-traducional ocorre pela ação de proteases celulares dos hospedeiros (NAGAI; KLENK; ROTT, 1976). Diferentes estudos compararam a sequência de aminoácidos deduzidos do precursor F0 dos APMV-1 com diferentes padrões de patogenicidade em frangos (GLICKMAN et al., 1988; MCGINNES; MCQUAIN; MORRISON, 1988; COLLINS; BASHIRUDDIN; ALEXANDER, 1993). Vírus lentogênicos apresentaram leucina no resíduo 117 da porção N-terminal da proteína F1 e até 2 resíduos de aminoácidos básicos no sítio de clivagem F0 entre os resíduos 113 e 116. Estes vírus podem ser clivados apenas por enzimas proteolíticas extra-celulares do tipo tripsina, encontradas apenas em epitélios do trato respiratório e intestinal. Os vírus mesogênicos e velogênicos possuem fenilalanina no resíduo 117 e múltiplos aminoácidos básicos (mais de três) entre os resíduos 113 e 116. A presença de múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem permite com que as proteases presentes em diversos tipos celulares em diferentes tecidos e órgão de hospedeiros clivem as partículas virais das progênies, que provocam infecções sistêmicas (ALEXANDER; SENNE, 2008).

Alguns autores diferenciam a patogenicidade das estirpes virais de acordo com os sinais clínicos apresentados pelas aves (OIE, 2012) (Quadro 2): 1) Velogênico viscerotrópico que causa uma doença severa e fatal, com alta mortalidade em galinhas, com sinais clínicos graves e lesões hemorrágicas; 2) Velogênico neurotrópico que causa problemas respiratórios

(espirros e corrimento nasal, ou edema pulmonar), edema de cabeça, prostração, torcicolo, paralisia de pernas, tremores musculares e morte em até 100% das aves; 3) Mesogênica, que causa leves sintomas respiratórios, queda na produção, eventuais sintomas nervosos e mortalidade baixa; 4) Lentogênica, que causa sintomas respiratórios brandos em aves jovens e algumas estirpes são utilizadas como vacinas; 5) Assintomáticas, não patogênicas, que são amplamente utilizadas como estirpes vacinais.

Quadro 1 - Patotipos de NDV e suas características clínicas e patogenicidade

Classificação	Sintomas/Lesões	Patogenicidade	Observações
1- Viscerotrópico e velogênico	Apatia, diarreia esverdeada e lesões hemorrágicas intestinais	Alta	Elevada mortalidade em galinhas
2- Neurotrópico e velogênico	Espirros, corrimento nasal, ruído dos pulmões, edema de cabeça e face, torcicolo, paralisia das pernas e tremores musculares	Alta	Mortalidade pode chegar a 100% das aves
3- Mesogênico	Respiratórios leves, queda de postura em poedeiras e eventualmente sintomas nervosos	Moderada	Baixa mortalidade e mais comum em aves jovens
4- Lentogênico	Respiratórios brandos	Leve	Usados como estirpes vacinais
5- Assintomático	Não causa sintomas ou lesões nas aves	Não patogênico	Usados como estirpes vacinais

Fonte: (OIE, 2012)

1.8 IMUNIDADE

A imunidade mediada por células e a imunidade humoral são importantes para a resposta imune protetora contra o NDV. A resposta imune mediada por células não tem ação protetora suficiente para estirpe virulenta do vírus (REYNOLDS; MARAQA, 2000), mas é

extremamente importante para a remoção viral (RUSSELL; DWIVEDI; DAVISON, 1997; RAUW et al., 2009).

A imunidade humoral é dividida em sistêmica e local: a imunidade sistêmica é detectada no sangue e a imunidade local ocorre na presença de anticorpos em trato respiratório superior e trato gastrointestinal e geralmente em 5 dias após a infecção (RAUW et al., 2009). A imunidade local independe da imunidade humoral sistêmica (HOLMES, 1979) e ela é importante para a limitação da replicação na entrada e transmissão primária dos vírus (TAKADA; KIDA, 1996). Os níveis de anticorpos geralmente têm um pico de resposta em torno de 3 a 4 semanas, mas também dependem da estirpe viral infectante (ALEXANDER, 2001). Estes anticorpos podem ser detectáveis por até um ano em aves recuperadas de infecção dos vírus mesogênico ou após uma série de imunizações (ALLAN; LANCASTER; TOTH, 1978).

Os anticorpos podem ser direcionados contra qualquer superfície funcional (epitopo) das glicoproteínas HN e F (RUSSELL, 1988). As imunoglobulinas (Ig) do tipo IgM, IgA e IgY são encontradas após a primeira infecção, enquanto que a principal imunoglobulina encontrada após a reinfecção é do tipo IgY (RAUW et al., 2009). A glândula harderian é o principal local de formação de anticorpos IgA, embora anticorpos IgA também sejam detectados no trato respiratório e digestório (AL-GARIB et al., 2003). A IgM pode ser a classe de anticorpo mais envolvida na depuração do vírus em infecções da conjuntiva (RUSSELL; KOCH, 1993). Anticorpos IgY são encontrados no trato respiratório superior e trato gastro-intestinal (PARRY; AITKEN, 1977). Estes anticorpos podem também ser encontrados na lamina própria intestinal após a transudação a partir do sangue (MUIR; BRYDEN; HUSBAND, 2000).

Os anticorpos contra NDV podem ser transferidos da mãe para a progênie através da gema de ovo. Os níveis de anticorpos estão intimamente relacionados com o título de anticorpos de mãe. Esta imunidade materna é conhecida como protetora, portanto deve também ser considerada na vacinação da progênie (TIZARD, 2013).

A imunossupressão, que pode ser causada por agentes imunossupressores, estresse, erros de manejo, pode agravar a doença causada por algumas estirpes de NDV ou promover uma resposta inadequada da vacinação (PATTISON; ALLAN, 1974; ROSENBERGER; GELB JR, 1978).

1.9 SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos da NDV em aves infectadas dependem de fatores: como espécie hospedeira, a idade do hospedeiro, estado imunológico do hospedeiro, o tipo viral, coinfeções e estresse ambiental. As aves podem apresentar-se assintomáticas e morrer subitamente ou apresentar uma síndrome respiratória e lesões neurológicas (ALEXANDER; JONES, 2008; ALEXANDER; SENNE, 2008). Os sinais clínicos apresentados são diarreia, depressão, edema de crista, barbela e cabeça; sinais nervosos como torcicolo e paralisia; sinais respiratórios, redução do rendimento como ganho de peso e postura (ALEXANDER, 2001). A mortalidade do plantel pode ocorrer de 70 a 100% em 2 a 3 dias e o período de incubação pode variar de 3 até 15 dias. A manifestação dos sinais clínicos e a mortalidade variam de acordo com a patogenicidade da estirpe ou amostra viral, podendo ser velogênica (muito alta), mesogênica (intermediária) e lentogênica (muito baixa) (OIE, 2012).

1.10 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A identificação viral pode ser feita a partir de amostras de órgãos de aves mortas recentemente, como pulmão, tecidos cardíacos, rins, intestinos, baço, cérebro e fígado. As amostras coletadas de aves vivas podem ser suabes cloacais, traqueais ou orofaríngeos e fezes frescas (ALEXANDER; SENNE, 2008). As técnicas mais utilizadas para o diagnóstico do paramixovírus são baseadas na detecção do agente infeccioso, como isolamento do vírus em ovos embrionados de galinhas, testes moleculares e na detecção de anticorpos específicos contra o agente pelos testes sorológicos. O isolamento viral é o teste de referência da OIE para garantir os tratados comerciais (OIE, 2012).

1.10.1 Testes moleculares

As amostras devem ser cuidadosamente selecionadas, pois estudos demonstraram alteração na sensibilidade para a detecção do vírus de acordo com alguns órgãos (CREELAN;

GRAHAM; MCCULLOUGH, 2002). Em galináceos, os suabes orofaríngeos são utilizados preferencialmente para a detecção do NDV. (SPACKMAN et al., 2013), uma vez que suabes cloacais podem conter substâncias que inibem a reação de RT-PCR. (VAN BORM et al., 2007; DAS et al., 2009)

A técnica de transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real (RRT-PCR) pode ser utilizada para a quantificação e a caracterização de ácidos nucleicos do vírus da doença de Newcastle (OIE, 2012). Este teste foi validado durante um surto nos Estados Unidos da América (EUA) em 2002-2003 (WISE et al., 2004). Porém, ele têm demonstrado que não é capaz de detectar todos as estirpes de NDV (KIM; SUAREZ; AFONSO, 2008). Recentemente, uma nova técnica de RRT-PCR foi validada para a detecção de uma maior variedade de estirpes virais (HINES et al., 2012). A principal vantagem deste teste é a eliminação da etapa de processamento após a amplificação, que reduz enormemente a contaminação de amostras (ALEXANDER; SENNE, 2008).

Técnicas de RT-PCR podem ser utilizadas para amplificar a região do sítio de clivagem, que permite caracterizar as amostras quanto a patogenicidade pelo sequenciamento gênico (DE ALMEIDA et al., 2013; MILLER et al., 2015).

Algumas técnicas de RT-PCR foram desenvolvidas para detectar todos os vírus do gênero *Avulavirus*. Estas técnicas demonstram ser eficaz para a identificação de novos vírus e foram denominada como pan-paramixo RT-PCR (TONG et al., 2008; VAN BOHEEMEN et al., 2012). Os oligonucleotídeos usados na técnica, que podem ser degenerados, possuem a característica de se ligarem a essas regiões mais conservadas encontradas nos paramixovírus (TONG et al., 2008; VAN BOHEEMEN et al., 2012). A principal vantagem do pan-paramixo RT-PCR é a de que ele não necessita de testes individuais para todos os membros conhecidos de um a família. Além disso, este tipo de técnica tem o potencial de identificar vírus anteriormente desconhecidos ou emergentes que possam afetar os animais, além daquelas de nosso interesse (SCHATZBERG et al., 2009).

1.10.2 Caracterização da Patogenicidade

A caracterização das estirpes virais é um importante mecanismo para a diferenciação entre vírus de alta e baixa patogenicidade em galinhas .De acordo com a OIE a avaliação

definitiva da patogenicidade do vírus é feita com base em testes in vivo (teste de patogenicidade intracerebral- IPIC) e in vitro (sequenciamento gênico) (OIE, 2012).

O sequenciamento gênico é utilizado para caracterizar a patogenicidade dos vírus. Assim, a presença de múltiplos aminoácidos básicos (arginina –R- e lisina- K) entre os resíduos 113 e 116 e fenilalanina na posição 117 do sítio de clivagem da proteína de fusão F0 indicam um vírus velogênico (OIE, 2015). Estes vírus são clivados por proteases do tipo furina, que estão presentes em células e tecidos de todos os órgãos.

Outra forma de avaliar a patogenicidade é pelo teste IPIC. Neste teste, o líquido alantóide infeccioso fresco com um título de hemaglutinação (HA) $> 1/16$ deve ser diluído em solução isotônica salina estéril sem antibióticos e injetado por via intracerebral em cada um dos dez pintos SPF nascidos entre 24 a 40 horas de vida. As aves são examinadas a cada 24 horas, durante 8 dias, e a média dos valores é determinada, utilizando a seguinte classificação: 0 se normal, 1 se doente, e 2 se morta. As aves moribundas devem ser eutanaziadas e classificadas como mortas. Os vírus com valores acima de 0,7 são classificados como velogênicos (OIE, 2012).

Alguns vírus isolados de pombos podem ter a sequência do sítio de clivagem características de vírus velogênicos, mas que apresentam baixos valores de ICPI (COLLINS; STRONG; ALEXANDER, 1994). Estudos anteriores demonstraram que a proteína de fusão não é a única responsável pela patogenicidade destes vírus (DORTMANS et al., 2009), mas todo as proteínas do complexo de replicação, como nucleoproteína, fosfoproteína e polimerase (DORTMANS et al., 2010).

1.10.3 Testes sorológicos

Os testes sorológicos mais utilizados são o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e inibição da hemaglutinação (HI), em que o NDV deve ser utilizado como antígeno. Estes testes são utilizados para avaliar a presença de anticorpos contra NDV, produzidos pela resposta à circulação de um vírus de campo ou à vacinação (OIE, 2012). O teste de HI é o teste mais utilizado para detectar anticorpos para APMV-1 em aves. Outros testes sorológicos como a soroneutralização, imunofluorescência indireta, imunoperoxidase também podem ser utilizados, mas são menos empregados.

O teste HI além de utilizado para titular anticorpos contra NDV é considerado padrão para seu diagnóstico (OIE, 2012). Painéis de anticorpos monoclonais (mAbs) são utilizados para estabelecer os perfis antigênicos dos isolados de NDV (ALEXANDER et al., 1997) e confirmar sua presença em muitos países (ALEXANDER et al., 1987; ALEXANDER et al., 1997).

O método de ELISA apresenta vantagens quando comparados ao HI, pois é amplamente utilizado na avicultura, rápido, sensível e mais específico (SANTOS et al., 2000). Uma grande variedade de ELISAs já foi descrita (SNYDER et al., 1984; RIVETZ et al., 1985; MEULEMANS et al., 2002). Este método tem se tornado uma ótima ferramenta de monitoramento, pois pode ser automatizado ou semi-automatizado facilitando assim o diagnóstico (SNYDER et al., 1984). Além disso, uma ótima correlação entre os testes HI e ELISA já foi relatada por alguns estudos (ADAIR et al., 1989; BROWN; RESURRECCION; DICKSON, 1990; CVELIC-CABRILO et al., 1992). Em aves de vida livre o uso de sorodiagnóstico de NDV com ELISA é limitado por não haver disponibilidade de conjugados para outras espécies de aves além das galiformes. Este problema pode ser resolvido através do uso de ELISA competitivo (cELISA). O cELISA não necessita de anticorpos secundários específicos, pois o anticorpo conjugado é específico contra a proteína subunitária presente na placa de ELISA sensibilizada e não contra uma imunoglobulina (KOTHLOW et al., 2008). Vale ressaltar que todos os tipos de ELISA devem ser validados ou modificados de acordo com as diferentes espécies avaliadas.

1.11 CONTROLE E PROFILAXIA

A prevenção de NDV varia entre os diferentes países que consideram as estirpes circulantes nos plantéis avícolas. Alguns programas não permitem a vacinação para identificar possíveis introduções de NDV em seu território para facilitar sua erradicação, como Suécia, Finlândia e Estônia (EC, 2014).

A maioria dos países utiliza a vacinação como estratégia profilática. Vacinas com estirpes vivas lentogênicas ou vacinas inativadas são as mais utilizadas, embora alguns países utilizem estirpes mesogênicas para prevenir a doença causada pelas estirpes de campo. A situação de prevalência da doença e outros fatores afetam os programas de vacinação, como a

disponibilidade de vacinas, imunidade materna, outras doenças e os custos (ALEXANDER et al., 1997).

As medidas de vigilância para a doença de Newcastle são determinadas por instruções normativas (IN) e ofícios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): 1) IN Nº 32/2002, IN Nº 17/2006, Ofício Circular DSA Nº 7/2007 e Ofício Circular DSA Nº 157/2007 e nota técnica CSA Nº 16/2012, que estabelecem normas para a vigilância da doença em plantéis avícolas e sítios de aves migratórias (BRASIL, 2009); 2) IN Nº 46/2008 e IN Nº 17/ 2010, que tratam sobre a importação de material genético de aves domésticas destinados à reposição e de aves exóticas e seus ovos férteis (BRASIL, 2009). Finalmente, a IN Nº 21/2014, tem como objetivo estabelecer “Normas Técnicas para Certificação Sanitária da Compartimentação da Cadeia Produtiva Avícola para Influenza Aviária e Doença de Newcastle” (SÃO PAULO, 2014). Neste ano a Coordenação de Sanidade Avícola está realizando um inquérito epidemiológico em todos os estabelecimentos avícolas brasileiros.

O procedimento determinado pelo MAPA, no caso de focos, é a erradicação do vírus pela destruição das aves infectadas. Os casos suspeitos da doença devem ser comunicados aos órgãos de vigilância oficiais (Inspetorias Veterinárias), que enviarão médicos veterinários para realizar a coleta de material de animais suspeitos. O material será enviado para o laboratório oficial do MAPA para realizar o diagnóstico no Laboratório nacional agropecuário (LANAGRO – Campinas). Em caso de confirmação do resultado positivo, serão tomadas as medidas descritas no manual do Programa Nacional de Sanidade Avícola (disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>).

1.11.1 Biosseguridade

A biosseguridade abrange todos os procedimentos necessários para prevenir as consequências da enfermidade, que incluem a seleção de aves livres da doença, criação de ambientes favoráveis e procedimentos adequados para impedir a exposição do lote ao vírus. Em lotes com baixa ou alta biosseguridade, a introdução e manutenção de NDV ocorrem por causas comuns, mas o que difere é a rapidez na identificação da fonte de infecção (BERMUDEZ, 2008).

A movimentação dos trabalhadores entre granjas ou entre galpões de uma mesma empresa pode disseminar rapidamente os vírus para as aves susceptíveis. Pragas como

besouros, ratos, pombos, aves migratórias e outras aves ornamentais são responsáveis pela introdução de NDV às granjas em vários dos casos (ALEXANDER, 1988).

Um programa de biossegurança pode ser dividido em três níveis: biosseguridade conceitual, biosseguridade estrutural e biosseguridade operacional. 1) A biosseguridade conceitual está relacionada com a localização da granja a fim de evitar o contato com fontes de infecção e manter uma ótima produção; 2) a biossegurança estrutural inclui o planejamento na construção da granja, descontaminação das instalações, manejo do alimento a granel, estrutura dos aviários para impedir o acesso de pássaros, locais apropriados para troca de roupa; 3) por fim a biossegurança operacional compreende aos procedimentos administrativos e rotineiros que previnem a introdução e disseminação da infecção. Estes procedimentos incluem aplicação de medidas como controle de tráfego, vacinação, e programas de vigilância epidemiológica. A biosseguridade efetiva simplesmente requer grande atenção em todos os detalhes relacionados com a produção avícola (BERMUDEZ, 2008).

1.11.2 Vacinação

Vacinas eficazes contra a NDV estão disponíveis no mercado por anos, proporcionando proteção às espécies aviárias para as quais são formuladas, porém são menos efetivas para proteger contra a infecção, apenas reduzem a quantidade de vírus eliminado pela ave infectada. A redução da eliminação do vírus não elimina a possível transmissão de NDV para outras aves (ALEXANDER et al., 1997).

Vacinas vivas lentogênicas provenientes de estirpes de NDV B1 ou La Sota são usadas universalmente em regiões que autorizam a vacinação, não descartando as estirpes V4, F, Ulster ou VG-GA que também tem sido utilizadas (ALEXANDER et al., 1997). Vacinas inativadas são formuladas com emulsões oleosas compostas por propiolactona- 3 ou formalina tem sido utilizada como vacinas monovalentes. As estirpes lentogênicas Ulster 2C ou La Sota tem substituído o uso de vírus virulento (DA SILVA et al., 2008).

No Brasil, a vacinação contra NDV é obrigatória em poedeiras e reprodutoras conforme IN N° 32/2002, IN N° 17/2006. O esquema usualmente utilizado em poedeiras requer pelo menos 3 doses, que pode variar de acordo com a prevalência da doença no local: aos 10 a 12 dias, segunda dose aos 30 a 35 dias de idade e a terceira dose com 90 ou 120 dias de vida com uma vacina inativada. Para a realização da primeira vacinação, é recomendado o

uso as estirpe B1, Ulster ou VG-GA, já a estirpe LaSota na segunda dose (PAULILLO; JÚNIOR, 2000; JORGE, 2002; NUNES et al., 2002). Não recomenda-se vacinação em pintos de forma simultâneas e associação da vacina da doença de Newcastle com a de Bouda (MALAVAZZI, 1999).

1.12 A AVICULTURA NO BRASIL

O Brasil destaca-se na avicultura, pois gera mais de cinco milhões de empregos diretos e indiretos, ocupando a colocação de maior exportador mundial e terceiro maior produtor de carne de frango (ABPA, 2015). Em 2014 a produção de carne de frango atingiu 12.691 milhões de toneladas, sendo 67,7% da produção destinadas ao mercado interno e 32,3% ao mercado externo, correspondendo a 4.099 milhões de toneladas de carne de frango exportadas (Figura 6). Este cenário destaca a importância econômica e social que a avicultura brasileira representa no âmbito nacional e internacional (ABPA, 2015).

As barreiras sanitárias e tarifárias impostas por países importadores correspondem a um dos maiores empecilhos para o acesso de produtos produzidos em um país no mercado internacional. Uma das principais barreiras sanitárias na avicultura que impedem o livre comércio na avicultura é a presença da doença de Newcastle (OIE, 2015). As doenças respiratórias estão associadas a grandes perdas econômicas em todo o mundo e as enfermidades virais tem se tornado o maior desafio da avicultura moderna (OIE, 2015). Dessa forma, o monitoramento sanitário dos plantéis avícolas deve ser rigoroso, para que o status produtivo alcançados nos últimos anos seja mantido.

No Brasil ainda são criadas “aves de fundo de quintal”, popularmente conhecidos como frangos caipiras, produzidas por pequenos produtores que têm esses animais e seus produtos para consumo próprio e comercialização. Desde o ano de 2003, o Brasil é considerado livre de estirpes patogênicas do vírus da doença de Newcastle (NDV), isto é, velogênicas (vNDV) (ORSI et al., 2010b). Porém, estudos detectaram a presença do vírus de baixa patogenicidade, isto é, lentogênico, em aves domésticas de fundo de quintal (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2005; ORSI, 2010; MARKS et al., 2014) e em aves silvestres no Brasil (SILVA et al., 2006; CARRASCO et al., 2012; THOMAZELLI et al., 2012; FORNELLS et al., 2013).

Figura 6 - Cenário mundial da produção, importação e exportação de carne de frango

Fonte: (UBPA, 2015, modificado por SILVA, R. K, 2015).

1.13 IMPACTO ECONÔMICO E SOCIAL

O vírus da doença de Newcastle representa um impacto econômico global. A perda econômica causada por focos de NDV e medidas de controle são representativas em países desenvolvidos com a indústria avícola (LESLIE, 2000). Estes gastos também estão presentes em países livres da doença, pois são feitos testes periódicos para a comprovação do status epidemiológico e aprovação da comercialização de produtos da indústria avícola. Países endêmicos com NDV encontram barreiras para estabelecer relações comerciais, tornando um limitante para o desenvolvimento da produção de aves comerciais. Em muitas regiões a população depende da produção de ovos e carnes de frango como fonte de proteínas que compõe as necessidades diárias e perdas causadas pelo NDV influenciam a quantidade e a qualidade da dieta da população (SPRADBROW, 1992; SEN et al., 1998). O impacto não causa danos apenas ao comércio, mas também impactos à população, refletindo na saúde e diminuição do potencial socioeconômico.

O NDV não influencia apenas na desnutrição, mas é reconhecido como um patógeno humano. Mesmo não apresentando relatórios de doenças ou muitas vezes insignificantes, os sinais clínicos que apresentam melhores fundamentações são referentes a infecções oculares, podendo ser unilateral ou bilateral, apresentam vermelhidão, edema de pálpebras, excessiva lacrimação, hemorragias subconjuntivais e conjuntivite. As infecções em sua maioria são transitórias e não ocorre nenhum comprometimento da córnea. Existem relatos em que a infecção pode vir acompanhada de calafrios, febres, dores de cabeça e a presença de conjuntivite não descrita em alguns casos, porém esses dados não são bem fundamentados (CHANG, 1981).

2 OBJETIVOS

Investigar a presença dos paramixovírus aviários pertencentes do gênero *Avulavirus* da família Paramyxoviridae e caracterizá-los molecularmente em materiais obtidos a partir de aves silvestres do Brasil.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Aplicação de testes de RT-PCR e PCR nested, descritos previamente, para detecção dos paramixovírus aviários utilizando diferentes vírus de referência.
- B. Detecção da presença do gene L dos APMVs através do RT-PCR e PCR em suabes cloacais e orofaríngeas obtidos a partir de aves silvestres.
- C. Detecção da presença dos genes L e M do APMV-1 através do RRT-PCR em suabes cloacais e orofaríngeas obtidos a partir de aves silvestres.
- D. Sequenciamento gênico do sítio de clivagem do gene F.
- E. Realizar a análises moleculares baseadas no gene que codifica a proteína F dos paramixovírus aviários a fim de caracterizar os variantes circulantes presentes nas aves silvestres.

3 COMPARAÇÃO DE TESTES MOLECULARES PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS PERTENCENTES À FAMÍLIA PARAMYXOVIRIDAE EM AVES SILVESTRES BRASILEIRAS

**Comparação de testes moleculares para a detecção de vírus pertencentes à família
Paramyxoviridae em aves silvestres brasileiras**

**Comparison between molecular tests for detection of Paramyxoviridae viruses in
Brazilian wild birds samples**

RESUMO

As aves silvestres são importantes reservatórios de vírus que podem acometer as aves domésticas. O presente estudo visou comparar duas técnicas de RT-PCR convencional capazes de detectar os vírus da família Paramyxoviridae, que tem como alvo o gene da polimerase dessa família viral. As técnicas de RT-PCR convencionais pan-paramixo foram validadas utilizando amostras de referência dos vírus da doença de Newcastle, metapneumovírus aviário subtipo A e B e vírus da cinomose. Após a validação, a sensibilidade analítica e diagnóstica e a especificidade analítica foram comparadas entre as técnicas. Após a comparação, 50 amostras (suabes cloacais e orofaríngeas) coletadas a partir de aves silvestres foram testadas e o sítio de clivagem das amostras positivas foram sequenciados. Duas do total de amostras testadas foram detectadas pelo RT-PCR pan-paramixo, que também foram detectadas pelo teste específico de RRT-PCR para o NDV. Entretanto, esse último demonstrou ser até 10^5 vezes mais sensível que a RT-PCR pan-paramixo. As amostras positivas foram classificadas como estirpes lentogênicas e foram agrupadas com as amostras vacinais de NDV do tipo La Sota. Ainda assim, essa técnica de RT-PCR pan-paramixo parece ser uma interessante ferramenta para a detecção desses vírus em outras espécies animais.

Palavras-chave: Vírus. RT-PCR. Aves. Vigilância. Paramyxoviridae.

ABSTRACT

Wild birds are an important reservoir of different viruses that can affect poultry. Therefore, the present study aimed to detect viruses of *Paramyxoviridae* family by a RT-PCR targeting

the polymerase gene from this viral family. A conventional RT-PCR for pan-paramyxovirus detection was validated by using reference strains of Newcastle disease virus, avian metapneumovirus subtype A and B and canine distemper virus. After validation, analytical and diagnostic sensitivity and analytical specificity were compared among the techniques and fragments of 450 base pair of F gene including the cleavage site of the positive samples were sequenced. Two out of total tested samples were detected by the pan-paramyxovirus RT-PCR and the RRT-PCR specific to NDV. Nonetheless, the latter was up to 10^5 times more sensitive when compared to pan-paramyxovirus RT-PCR. Positive samples were classified as lentogenic strain close related with La Sota-like NDV vaccinal strains. Even though, this RT-PCR test seems to be an interesting tool for detection of these viruses in other animal species.

Key words: Virus. RT-PCR; birds. Surveillance. Paramyxoviridae.

INTRODUÇÃO

A manutenção da sanidade dos lotes aviários comerciais é de extrema importância para que os prejuízos econômicos sejam reduzidos (ABPA, 2015). As aves silvestres, especialmente aves aquáticas migratórias, aves de rapina e passeriformes, são frequentemente consideradas reservatórios de patógenos aviários de importância para a indústria avícola (CHA; YU; ZSAK, 2013). Os vírus da família Paramyxoviridae incluem um grande número de vírus responsáveis por causar diversas doenças em humanos e animais (LAMB, 2007). Tal família está classificada em duas subfamílias: Paramyxovirinae e Pneumovirinae (ICTV, 2012). Ambas as subfamílias já foram detectadas em amostras de aves silvestres e domésticas representadas pelos gêneros: *Avulavirus* (espécies paramixovírus aviários) e *Metapneumovirus* (espécie metapneumovirus aviário). No Brasil, o vírus da doença de Newcastle (NDV), um paramixovírus aviário do tipo 1, já foi detectado em aves silvestres e domésticas (ORSI, 2010; THOMAZELLI et al., 2012; CARRASCO et al., 2013). Outros paramixovírus aviários, como os tipos 1 ao 10, foram detectados em amostras de aves migratórias e residentes (FORNELLS et al., 2012; FORNELLS et al., 2013). Os metapneumovirus aviários também já foram detectados em aves sinantrópicas brasileiras (FELIPPE et al., 2011).

O uso de técnicas de RT-PCR convencional para detectar membros da família Paramyxoviridae utilizando oligonucleotídeos degenerados já demonstrou ser útil na identificação de novos vírus (TONG et al., 2008; VAN BOHEEMEN et al., 2012). Estes testes têm o potencial de identificar vírus emergentes que possam afetar os animais, que estão além do interesse econômico (SCHATZBERG et al., 2009). O presente estudo teve como objetivo comparar a especificidade e sensibilidade analítica e sensibilidade entre duas técnicas de RT-PCR previamente descritas (TONG et al., 2008; VAN BOHEEMEN et al., 2012). Finalmente, uma das técnicas foi selecionada para ser aplicada em 100 amostras de aves silvestres. Posteriormente as amostras positivas foram submetidas ao sequenciamento gênico e a análise filogenética.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de referência

Foram utilizadas cinco vacinas como amostras de referência, entre elas amostras de vírus vivos da doença de Newcastle disease, estirpe La Sota (New Vaccin La Sota, BIOVET, Vargem Grande Paulista), metapneumovírus aviário, subtipos A e B (Bio-SHS, BIOVET, Vargem Grande Paulista) e vírus da cinomose canina, estirpe Lenderle (ImunoVet, BIOVET, Vargem Grande Paulista), foram utilizadas como amostras de referência. A especificidade analítica foi avaliada utilizando o vírus da bronquite infecciosa (Bio-Bronk-Vet H-120, BIOVET, Vargem Grande Paulista) e vírus da doença de Marek (Bio-Mark-Vet L, BIOVET, Vargem Grande Paulista).

Amostras testadas

Foram testadas 100 amostras provenientes de suabes orofaríngeos e cloacais (56 orofaríngeos e 44 cloacais) que representam 18 espécies pertencentes a 7 ordens de aves coletadas em diferentes locais do estado de São Paulo: Centro de Recuperação de Animais Silvestres (CRAS) "Orlando Villas-Boas", do Parque Ecológico do Tietê (São Paulo, SP),

Bosque dos Jequitibás (Campinas, SP), Parque Ecológico Municipal de Americana (Americana, SP) e Casa de Aves (Pirassununga, SP).

Purificação de RNA

Os RNAs virais dos suabes coletados foram purificados com o kit QIAamp Viral RNA Mini (Cat no# 52904, Qiagen, Hilden) conforme as instruções do fabricante.

Controle interno

O teste RT-PCR em tempo real (RRT-PCR) para a detecção de um gene interno, a beta actina, foi utilizado para avaliar a qualidade das amostras conforme descrito anteriormente (VAN BORM et al., 2007) utilizando o kit QuantiFast Probe RT-PCR+ROXVial (Cat # 204554, Qiagen, Hilden).

Detecção dos vírus NDV, aMPV/A e aMPV/B pelos testes de RRT-PCR específicos

O teste RRT-PCR específico para a detecção de gene M do NDV com oligonucleotídeos e sondas descritas anteriormente (Paramyxoviridae; WISE et al., 2004) foi realizado com o kit QuantiFast Probe RT-PCR+ROXVial (Cat # 204554, Qiagen, Hilden, Germany). O teste RRT-PCR específico para a detecção de gene G do aMPV subtipos A e B com os oligonucleotídeos e sondas descritos anteriormente (GUIONIE et al., 2007) e kit TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Cat no# 4444432, Life Technologies, Carlsbad) foi utilizado. As sequências, posições dos oligonucleotídeos estão descritos na tabela 3. As reações de RRT-PCR foram realizadas no termociclador LightCycler 480II Thermal (Roche, Hilden, Germany).

Detecção dos vírus da família viral Paramixoviridae pelos testes de RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas utilizando o kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Cat no# 12574026, Life Technologies, Carlsbad) para a detecção do vírus da família Paramyxoviridae conforme os estudos anteriores (TONG et al., 2008; VAN BOHEEMEN et al., 2012). Os testes foram nomeados como “RT-PCR de Tong et al. (2008)” e “RT-PCR de Van Boheemen et al. (2012)” no presente estudo. As sequências, posições dos estão descritos no quadro 3.

Os produtos de PCR dos testes de RT-PCR convencionais foram visualizados pela luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel agarose 2,5% contendo o corante SYBR Safe (Life Technologies, Carlsbad, EUA) em tampão Tris-borato (pH 8.0). O marcador de DNA de 100 pares de base (pb) DNA (Life Technologies, Carlsbad, EUA) foi utilizado para determinar o tamanho do amplicon.

Limite de Detecção (LOD) dos testes

Diluições seriadas na base 10 em PBS foram realizadas e extraídas de cada uma das amostras de referência foram realizadas para a avaliação do limite de detecção entre todos os testes de RT-PCR e RRT-PCR para detecção dos agentes virais.

Comparação entre os testes de RT-PCR

Cinquenta amostras (19 suabes orofaríngeanos- OP- e 31 suabes cloacais) de aves silvestres foram testadas pelo teste RT-PCR de Van Boheemen et al. (2012) e RT-PCR de Tong et al. (2008) para a avaliação da sensibilidade diagnóstica. O teste estatístico KAPPA foi utilizado para avaliar o índice de concordância. Após a comparação, outras 50 amostras (37 suabes OP e 13 suabes cloacais) de aves silvestres foram testadas pelo teste de RT-PCR de Van Boheemen et al. (2012), resultando 100 amostras testadas pelo último referido teste.

Sequenciamento e análise filogenética

As amostras positivas foram submetidas a reações de RT-PCR para o sequenciamento parcial do gene F , incluindo o sítio de clivagem, baseadas em estudo anterior (MILLER et al., 2015) foram realizadas com o kit Qiagen onestep RT-PCR (Cat no#210212, Qiagen, Hilden, Germany). As reações de RT-PCR foram realizadas no aparelho Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, California, USA). As reações foram realizadas em triplicatas utilizando os oligonucleotídeos específicos (sentido senso ou anti-senso) para cada reação. O fragmento de DNA foi purificado através da eletroforese em gel agarose 1,5% (w/v) contendo SYBR safe (Life Technologies, Carlsbag). A banda específica foi extraída do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi, assim o produto de PCR foi purificado utilizando o kit de purificação Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Cat no#28-9034-70, GE Healthcare UK, Buckinghamshire) e as amostras quantificadas utilizando um espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer). Os produtos de PCR na concentração de 20ng/uL e 5µM de cada oligonucleotídeo foram enviados ao LACTAD (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida) da Universidade Estadual de Campinas, conforme recomendações do Setor de Sequenciamento de DNA. As sequências senso e anti-senso foram alinhadas no programa Bioedit Sequence Alignment Editor version 7.1.11. As regiões de leitura do gene F foram validadas após o alinhamento com as sequências disponíveis no GenBank com o programa Clustal W no programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013). As análises incluíram 150 sequências com 450 nucleotídeos do gene F. O modelo Hasegawa-Kishino-Yano foi empregados. As sequências de aminoácidos da região do sítio de clivagem do gene F foram deduzidas com o programa MEGA6 de acordo com o manual terrestre da OIE (OIE, 2012).

Quadro 2 - Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação do material genético dos testes moleculares

Gene Alvo	Nome	Sequência Primer/Sonda	Referência
Gene L (pan paramixo)	PMV1	5'-GAR-GGI-YII-TGY-CAR-AAR-NTN-TGG-AC-3'	VAN BOHEEMEN et al., 2012
	PMVX2	5'-TIA-YIG-CWA-TIR-IYT-GRT-TRT-CNC-C-3'	
Gene L (pan paramixo)	AVU-RUB-F1	5'-GGT TAT CCT CAT TTI TTY GAR TGG ATH CA -3'	TONG et al., 2008
	AVU-RUB-R	5'-GCA ATT GCT TGA TTI TCI CCY TGN AC -3'	
	AVU-RUB-F2	5'-ACA CTC TAT GTI GGI GAI CCN TTY AAY CC -3'	
	AVU-RUB-R	5'-GCA ATT GCT TGA TTI TCI CCY TGN AC-3'	
Gene M (APMV-1)	NDVM+4100	5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3'	WISE et al., 2004
	NDVM+4169	5'-FAM-TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCRG-C-BHQ-3'	
	NDVM-4220	5'-GCCATGTTGTCACTGTCTATTG-3'	
G Gene (aMPV/A)	Primer A Fw	5'-GGACATCGGGAGGAGGTACA-3'	GUIONIE et al., 2007
	Probe A	5'-FAM- TGCACAGTCACTATTGCACTACTGTTAGCG -BHQ-3'	
	Primer A Rev	5'-CACTCCTCTAACACTGACTGTTCAACT-3'	
G Gene (aMPV/B)	Primer B Fw	5'-AATAGTCCTCAAGCAAGTCCTCAGA-3'	GUIONIE et al., 2007
	Probe B	5'-VIC-CTGGTGTATCAGCCTTAGGCTTGACGCT-BHQ-3'	
	Primer B Rev	5'-CTGTCGTAATTGACCTGTTCTACACT-3'	
Beta-actina (hospedeiro)	β actin632F	5'-CCT CAT GAA GAT CCT GAC AGA -3'	VAN BORM et al., 2007
	β actin696	5'-FAM-CGTGACATCAAGGAGAAGCTGTG-BHQ-3'	
	β actin747R	5'-TCTCCTGCTCYAYTCCA -3'	

RESULTADOS

Controle interno

Todas as amostras foram positivas para o gene interno.

Deteccão dos vírus da família viral Paramixoviridae pelos testes de RT-PCR

Os testes RT-PCR pan paramyxo apresentaram os tamanho de fragmento esperados após o teste utilizando amostras de referência: 121 pares de bases (pb) para o teste RT-PCR de Van Boheemen et al. (2012) e 200pb para o teste RT-PCR de Tong et al. (2008). Todas as amostras de referência foram detectadas pelos testes (Figura 7).

Figura 7 - RT-PCR convencional para detecção da família Paramyxoviridae

Fonte: (SILVA et al., 2016)

Legenda: A) RT-PCR de van den Boheemenn et al. 2012. O amplicon do tamanho 121 pares de base (pb) foi observado no gelo de agarose de 2,5% corado com SYBR Safe (Life Technologies, Carlsbag). M – Marcador molecular de 100pb e Br: Controle negativo; Linhas 1 a 8: 1: NDV; 3: vírus da doença de Marek (MDV- Marek Disease virus); 4: Vírus da bronquite infecciosa (IBV- Infectious bronchitis virus); 5 e 6: vírus da cinomose canina (CDV- Cinome distemper virus); 7: metapneumovirus aviário subtipo A (aMPV/A- avian metapneumovirus subtype A); 8: metapneumovirus aviário subtipo B (aMPV/B- avian metapneumovirus subtype B). B) Tong et al. 2008 . Tamanho do amplicon de 200pb. Linhas 1 a 7. 1: NDV, 3: aMPV/B, 4: CDV, 5) aMPV/A, 6) MDV, 7) IBV.

Limite de Detecção

O limite de detecção entre cada teste foi comparado (Quadro 4). O teste RRT-PCR específico para a detecção de NDV foi o teste mais sensível. Este teste foi até 10^4 e 10^8 vezes mais sensível quando comparado com o teste RT-PCR de Tong et al. (2008) e RT-PCR de Van Boheemen et al. (2012), respectivamente. O teste RRT-PCR específico para a detecção

de aMPV/B foi 10^8 e 10^5 mais sensível quando comparado com RT-PCR de Tong et al. 2008 e RT-PCR de Van Boheemen et al. (2012), respectivamente.

Quadro 3 - Limite de detecção entre os testes moleculares para a detecção da família Paramixoviridae

Limite de detecção				
Vírus	RT-PCR (van Boheemen et al. , 2012)	RT-PCR (tong et al. 2008)	RRT-PCR aMPV/B (Guionie et al. 2007)	RRT-PCR NDV (Wise et al. 2004)
NDV	10^{-2}	10^{-9}	ND	10^{-10}
aMPV/B	10^{-3}	10^0	10^{-8}	ND

Legenda: Limite de detecção para o teste RT-PCR de Boheemen et al., 2012 e Tong et al. 2008 , Testes RRT-PCR específicos utilizando as amostras de referência da doença de Newcastle e metapneumovírus aviário do tipo B foram também avaliados. ND: Não determinado.

Deteção dos vírus da família viral Paramixoviridae pelos testes de RT-PCR em amostras de aves silvestres

Ambos testes de RT-PCR foram capazes de detectar uma amostra positiva entre as 50 amostras de aves silvestres testadas: amostra proveniente de um papagaio de peito roxo (*Amazona vinacea*). O teste KAPPA apresentou o valor de 1,0 quando comparados os resultados. Após a comparação inicial, o teste RT-PCR de Van Boheemen et al. (2012) foi selecionado para o teste de 50 amostras de aves silvestres suplementares. Outra nova amostra de um falcão peregrino (*Falco peregrinus*) foi detectada utilizando este teste.

Análise filogenética

Duas amostras de aves silvestres (*Amazona vinacea* and *Falco peregrinus*) foram identificadas como NDV, uma vez que elas foram detectadas pelo teste de RT-PCR específico para NDV e não detectadas pelos testes específicos para aMPV subtipos A e B. Um fragmento de 450pb correspondente ao sítio de clivagem do gene F foi sequenciado com sucesso. As amostras sequenciadas foram agrupadas juntamente com o genotipo II dos vírus de NDV relacionados às estirpes vacinais (Figura 8). A sequência de aminoácidos deduzida entre as posições 113 e 117 do sítio de clivagem de ambas amostras foi: ¹¹³RQGR ↓ L¹¹⁷.

DISCUSSÃO

Nossos resultados estão em concordância com estudos anteriores que detectaram uma maior sensibilidade dos testes específicos de RRT-PCR em comparação com os testes RT-PCR pan paramixo (TONG et al. 2008; VAN BOHEEMEN et al. 2012). No nosso estudo, o teste de RT-PCR de Tong et al. (2008) teve um excelente sensibilidade para a detecção do NDV e uma sensibilidade baixa para a detecção do aMPV/B quando comparado aos testes específicos. O teste de RT-PCR Van Boheemen et al. (2012) obteve uma sensibilidade comparável aos dois vírus testados. Estudos anteriores com este ensaio foram capazes de identificar amostras positivas de APMV-1, APMV-8 e aMPV/C, representando as duas subfamílias em amostras de gansos, patos, gansos e gaivotas (VAN BOHEEMEN et al. 2012). Em nosso estudo, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os dois testes pan-paramixo RT-PCR, uma vez que ambos os testes foram capazes de detectar a mesma amostra positiva de papagaio do peito roxo.

Ambos os tipos de suabes foram detectados pelo RT-PCR de Van Boheemen: um suabe orofaríngeo de um *Falco peregrinus* e um suabe cloacal de um *Amazona vinacea*. Em galináceos, os suabes orofaríngeos são as melhores amostras para a detecção de NDV (SPACKMAN et al., 2013). Os suabes cloacais podem apresentar diversos inibidores das reações de RT-PCR (VAN BORM et al., 2007; DAS et al., 2009). Estes fatores de inibição podem variar de acordo com o ecossistema, dieta e o habitat das aves (DAS et al., 2009). Contudo, não podemos inferir sobre este dado, uma vez que o número de amostras positivas foi limitado.

No presente estudo, uma estirpe vacinal de NDV foi detectada em uma espécie ameaçada de extinção (BIRDLIFE internacional, 2004; COCKLE et al., 2007). As análises filogenéticas mostraram que as amostras positivas são de Classe II e genótipo II. Estes vírus são mundialmente distribuídos e acometem tanto aves domésticas como aves silvestres. As vacinas B1 e LaSota são amplamente utilizadas no Brasil em plantéis comerciais, no entanto foram encontradas em aves silvestres (ORSI, 2010). Os psitacídeos já foram relacionados a muitos focos de NDV velogênicos (vNDV) (SEAL, 1995; LOMNICZI et al., 1998). Os papagaios parecem que podem originar novos subgenótipos de vNDV (MILLER et al., 2015). Estirpes de vNDV também foram isoladas de psitacídeos aparentemente saudáveis durante surtos e quarentena (CAVILL, 1974; ROY et al., 1998). As condições de saúde destas aves

em risco, especialmente durante sua reintrodução no ambiente selvagem precisam ser avaliadas cuidadosamente (SAIDENBERG et al., 2015). O impacto sobre este achado para a epidemiologia NDV e para a saúde da aves deve ser também elucidado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Julia Benassi pela sua excelente assistência técnica. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP- Processo número: 2011/09019-0) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- Processo número: 443250/2014-6), pela Bolsa de Produtividade de Pesquisa dos autores C.W. Arns TCC, CWA, RSM, pelas bolsas CAPES dos autores ACSB, RKS, GPC, LSR, RMS, pela bolsa do PIBIC/CNPq da autora MCS, pela bolsa rUSP da autora FNC, pela bolsa FAPESP do autor GPS.

COMITÊ DE ÉTICA

A coleta das amostras (suabes orofaríngeanos- OP- e cloacais) em aves foi realizada em conformidade com as diretrizes de proteção animal e aprovação legal (SISBIO nº 34751-1 e Comitê de Ética e Uso de Animais FZEA-USP nº 2012.1.170.74.0 e FMVZ-USP 5201050214).

Figura 8 - Análise filogenética das amostras

Fonte: (SILVA et al., 2016)

Legenda: A) Análise filogenética utilizando 250 sequências com 450 nucleotídeos do gene F. Isolados deste estudo foram identificados com o símbolo ◯ após o nome da amostra. Eles foram agrupados dentro do genotipo II com as estirpes vacinais La Sota. O percentual das replicatas em cada grupo pelo teste de Bootstrap (1000 replicatas) está escrito próximo de cada ramo (FELSENSTEIN, 1985).

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório anual**: 2015. São Paulo: ABPA, 2015.

CARRASCO, A. D. T.; RODRIGUES, J. N. M.; SEKI, M. C.; DE MORAES, F. E.; SILVA, J. R.; DURIGON, E. L.; PINTO, A. A. Use of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in molecular screening of Newcastle disease virus in poultry and free-living bird populations. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 2, p. 569-576, 2013.

CHA, R. M.; YU, Q.; ZSAK, L. The pathogenicity of avian metapneumovirus subtype C wild bird isolates in domestic turkeys. **Virology Journal**, v. 10, p. 38, 2013.

DAS, A.; SPACKMAN, E.; PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SUAREZ, D. L. Removal of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) inhibitors associated with cloacal swab samples and tissues for improved diagnosis of Avian influenza virus by RT-PCR. **J Vet Diagn Invest**, v. 21, n. 6, p. 771-778, 2009.

FELIPPE, P. A.; SILVA, L. H.; SANTOS, M. B.; SAKATA, S. T.; ARNS, C. W. Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. **Avian Pathology**, v. 40, n. 5, p. 445-452, 2011.

FELSENSTEIN, J. Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FORNELLS, L. A.; SILVA, T. F.; BIANCHI, I.; TRAVASSOS, C. E.; LIBERAL, M. H.; ANDRADE, C. M.; PETRUCCI, M. P.; VEIGA, V. F.; VASLIN, M. F.; COUCEIRO, J. N. Detection of paramyxoviruses in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on the Brazilian tropical coast. **Vet Microbiol**, v. 156, n. 3-4, p. 429-433, 2012.

FORNELLS, L. A.; TRAVASSOS, C. E.; COSTA, C. M.; NOVELLI, R.; PETRUCCI, M. P.; SOFFIATI, F. L.; BIANCHI, I.; DE SOUZA, L. F.; VEIGA, V. F.; LIBERAL, M. H.; COUCEIRO, J. N. Detection of avian paramyxoviruses in migratory and resident birds in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Avian Dis**, v. 57, n. 4, p. 780-784, 2013.

GUIONIE, O.; TOQUIN, D.; SELLAL, E.; BOULEY, S.; ZWINGELSTEIN, F.; ALLEE, C.; BOUGEARD, S.; LEMIERE, S.; ETERRADOSSI, N. Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus. **J Virol Methods**, v. 139, n. 2, p. 150-158, 2007.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus taxonomy**: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012.

LAMB, R. A.; PARKS, G. D. Paramyxoviridae. In: KNIPE, D. M. E HOWELL, D. L. (Ed.). **Fields virology**. [S.l: s.n.], 2007. v. 2, cap. 33, seção, 2, p. 957-

LAMB, R. A.; PARKS, G. D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M. E HOWELL, D. L. (Ed.). **Fields virology**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1450-1496.

LOMNICZI, B.; WEHMANN, E.; HERCZEG, J.; BALLAGI-PORDANY, A.; KALETA, E.; WERNER, O.; MEULEMANS, G.; JORGENSEN, P.; MANTE, A.; GIELKENS, A. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). **Archives of Virology**, v. 143, n. 1, p. 49-64, 1998.

MILLER, P. J.; DIMITROV, K. M.; WILLIAMS-COPLIN, D.; PETERSON, M. P.; PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SWAYNE, D. E.; SUAREZ, D. L.; AFONSO, C. L. International Biological Engagement Programs Facilitate Newcastle Disease Epidemiological Studies. **Front Public Health**, v. 3, p. 235, 2015.

ORSI, M. A. **Caracterização Biológica, molecular, imunológica e estabilidade térmica das estirpes vacinais e de isolados da doença de Newcastle de aves de produção industrial e migratórias no Brasil**. 2010. 146 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, 2010. .

SCHATZBERG, S. J.; LI, Q.; PORTER, B. F.; BARBER, R. M.; CLAIBORNE, M. K.; LEVINE, J. M.; LEVINE, G. J.; ISRAEL, S. K.; YOUNG, B. D.; KIUPEL, M.; GREENE, C.; RUONE, S.; ANDERSON, L.; TONG, S. Broadly reactive pan-paramyxovirus reverse transcription polymerase chain reaction and sequence analysis for the detection of Canine distemper virus in a case of canine meningoencephalitis of unknown etiology. **J Vet Diagn Invest**, v. 21, n. 6, p. 844-849, 2009.

SEAL, B. S. Analysis of matrix protein gene nucleotide sequence diversity among Newcastle disease virus isolates demonstrates that recent disease outbreaks are caused by viruses of psittacine origin. **Virus Genes**, v. 11, n. 2-3, p. 217-224, 1995.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol Biol Evol**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

THOMAZELLI, L. M.; DE ARAUJO, J.; FERREIRA, C. D.; 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 North Eastern Coast and Amazon biome of Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2012.

TONG, S.; CHERN, S. W.; LI, Y.; PALLANSCH, M. A.; ANDERSON, L. J. Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 8, p. 2652-2658, 2008.

VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T. M.; VERHAGEN, J. H.; OSTERHAUS, A. D.; PAS, S. D.; HERFST, S.; FOUCHIER, R. A. A family-wide RT-PCR assay for detection of paramyxoviruses and application to a large-scale surveillance study. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34961, 2012.

VAN BORM, S.; STEENSELS, M.; FERREIRA, H. L.; BOSCHMANS, M.; DE VRIESE, J.; LAMBRECHT, B.; VAN DEN BERG, T. A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction control and its application to avian influenza diagnosis and quantification. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 213-220, 2007. Supplement, 1.

WISE, M. G.; SUAREZ, D. L.; SEAL, B. S.; PEDERSEN, J. C.; SENNE, D. A.; KING, D. J.; KAPCZYNSKI, D. R.; SPACKMAN, E. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 329-338, 2004.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Newcastle disease. In: _____. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2012**. 7th ed. [S.l]: OIE, 2012. v. 2, cap. 2.3.14, p. 555-573.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de oligonucleotídeos degenerados em diferentes técnicas de RT-PCR para a identificação pode ser uma ferramenta interessante para a identificação diferentes gêneros da família Paramyxoviridae. Contudo, uma grande variação de acordo com o gênero a ser detectado foi encontrada. No presente estudo, o teste de RT-PCR van Boehemee et al. (2012) demonstrou ser uma eficiente ferramenta para auxiliar o monitoramento da circulação viral em aves silvestres, que são importantes reservatórios destes patógenos.

Os estudos realizados em materiais provenientes de aves silvestres indicam a presença do vírus vacinal em animais que não foram previamente vacinados. A detecção dos vírus vacinais em aves silvestres demonstra que o uso das vacinas vivas não está sendo bem avaliado. A proximidade entre criatórios de aves comerciais, aves de fundo de quintal e de vida livre demonstra a deficiência na biossegurança adotada pelos sistemas avícolas, que pode ser uma forma de manutenção do NDV na natureza e representar um risco para a avicultura e para a saúde da avifauna. Estudos epidemiológicos de NDV rigorosos e contínuos em diferentes populações aviárias são importantes para avaliar os vírus circulantes nas populações. A importância e interferência da circulação de estirpes vacinais em aves silvestres, como as vida livre, ainda precisa ser completamente elucidada.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório anual**: 2015. São Paulo: ABPA, 2015.

ADAIR, B. M.; MCNULTY, M. S.; TODD, D.; CONNOR, T. J.; BURNS, K. Quantitative estimation of Newcastle disease virus antibody levels in chickens and turkeys by ELISA. **Avian Pathology**, v. 18, n. 1, p. 175-192, 1989.

AL-GARIB, S. O.; GIELKENS, A. L.; GRUYS, D. E.; HARTOG, L.; KOCH, G. Immunoglobulin class distribution of systemic and mucosal antibody responses to Newcastle disease in chickens. **Avian Diseases**, v. 47, n. 1, p. 32-40, 2003.

ALDOUS, E. W.; MYNN, J. K.; BANKS, J.; ALEXANDER, D. J. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. **Avian Pathology**, v. 32, n. 3, p. 239-256, 2003.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease. **British Poultry Science**, v. 42, n. 1, p. 5-22, 2001.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease: methods of spread. In: _____. (Ed.). **Newcastle disease**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 256-272.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 19, n. 2, p. 443-455, 2000.

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

ALEXANDER, D. J.; JONES, R. C. Paramyxoviridae. In: PATTISON, M.; MCMULLIN, P.; BRADBURY, J. M.; ALEXANDER, D. J. (Ed.). **Poultry diseases**. 6. ed. Butterworth Heinemann, Edinburgh: Saunders Elsevier, 2008. v. 1, p. 294-309.

ALEXANDER, D.; MANVELL, R.; KEMP, P.; PARSONS, G.; COLLINS, M.; BROCKMAN, S.; RUSSELL, P.; LISTER, S. Use of monoclonal antibodies in the

characterisation of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. **Avian Pathology**, v. 16, n. 4, p. 553-565, 1987.

ALEXANDER, D.; MANVELL, R.; LOWINGS, J.; FROST, K.; COLLINS, M.; RUSSELL, P.; SMITH, J. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. **Avian Pathology**, v. 26, n. 2, p. 399-418, 1997.

ALEXANDER, D.; PATTISON, M.; MACPHERSON, I. Avian paramyxoviruses of PMV-3 serotype in British Turkeys. **Avian Pathology**, v. 12, n. 4, p. 469-482, 1983.

ALEXANDER, D. J.; SENNE, D. A. **Newcastle disease**. Ames: Backwell Publishing Professional, 2008. p. 75-100. (Diseases of Poultry).

ALLAN, W. H.; LANCASTER, J. E.; TOTH, B. **Newcastle disease vaccines: their production and use**. Roma: FAO, 1978. 163 p. (FAO Animal Production Serie n. 10).

ARNS, C. W.; SPILKI, F. R.; DE ALMEIDA, R. S. Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p. 657-688.

BERMUDEZ, A. J. **Principles of disease prevention: diagnosis and control**. Ames: Backwell Publishing Professional, 2008. p. 3-42. (Diseases of Poultry).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Coordenação Geral de Combate às Doenças. Coordenação de Sanidade Avícola. **Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle**. 6 de abril de 2006. 2009. Versão 1.3. IN 17/2006. Disponível no site http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20avicola/pano%20de%20contingencia.pdf. Acesso em 10/10/2014.

BRIAND, F. X.; HENRY, A.; MASSIN, P.; JESTIN, V. Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus. **Journal Virology**, v. 86, n. 14, p. 7710, 2012.

BROWN, J.; RESURRECCION, R. S.; DICKSON, T. G. The relationship between the hemagglutination-inhibition test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease. **Avian Diseases**, v. 34, n. 3, p. 585-587, 1990.

BUI, V. N.; MIZUTANI, T.; NGUYEN, T. H.; TRINH, D. Q.; AWAD, S. S. A.; MINOUNGOU, G. L.; YAMAMOTO, Y.; NAKAMURA, K.; SAITO, K.; WATANABE, Y.; RUNSTADLER, J.; HUETTMANN, F.; OGAWA, H.; IMAI, K. Characterization of a genetic and antigenic variant of avian paramyxovirus 6 isolated from a migratory wild bird, the red-necked stint (*Calidris ruficollis*). **Archives of Virology**, v. 159, n. 11, p. 3101-3105, 2014.

BURNET, F. The affinity of Newcastle disease virus to the influenza virus group. **Australian Journal Experimental Biology and Medical Science**, v. 20, n., p. 81-88, 1942.

CAPUA, I.; DE NARDI, R.; BEATO, M. S.; TERREGINO, C.; SCREMIN, M.; GUBERTI, V. Isolation of an avian paramyxovirus type 9 from migratory waterfowl in Italy. **Veterinary Record**, v. 155, n. 5, p. 156, 2004.

CARRASCO, A. O. T.; RODRIGUES, J. N. M.; SEKI, M. C.; DE MORAES, F. E.; SILVA, J. R.; DURIGON, E. L.; PINTO, A. A. Use of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in molecular screening of Newcastle disease virus in poultry and free-living bird populations. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, p. 569-576, 2012.

CATTOLI, G.; FUSARO, A.; MONNE, I.; MOLIA, S.; LE MENACH, A.; MAREGEYA, B.; NCHARE, A.; BANGANA, I.; MAINA, A. G.; KOFFI, J. N.; THIAM, H.; BEZEID, O. E.; SALVIATO, A.; NISI, R.; TERREGINO, C.; CAPUA, I. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa--implications for diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 168-176, 2010.

CHA, R. M.; YU, Q.; ZSAK, L. The pathogenicity of avian metapneumovirus subtype C wild bird isolates in domestic turkeys. **Virology Journal**, v. 10, n., p. 38, 2013.

CHANG, P. Newcastle disease [Paramyxoviruses]. In: BERAN, G.W. (Ed). **CRC handbook. Series in zoonoses. Section B: viral zoonoses**. Vol. II. Boca Raton: CRC Press; 1981. p. 261-4.

CHANG, P. C.; HSIEH, M. L.; SHIEN, J. H.; GRAHAM, D. A.; LEE, M. S.; SHIEH, H. K. Complete nucleotide sequence of avian paramyxovirus type 6 isolated from ducks. **Journal General Virology**, v. 82, pt. 9, p. 2157-2168, 2001.

CHOI, K.-S.; KIM, J.-Y.; KYE, S.-J.; PARK, C.-K.; SUNG, H.-W. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 4 isolates from wild ducks in Korea from 2006 to 2011. **Virus Genes**, v. 46, n. 2, p. 302-308, 2013.

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

COLLINS, M. S.; STRONG, I.; ALEXANDER, D. J. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses". **Archives of Virology**, v. 134, n. 3-4, p. 403-411, 1994.

COURTNEY, S. C.; SUSTA, L.; GOMEZ, D.; HINES, N. L.; PEDERSEN, J. C.; BROWN, C. C.; MILLER, P. J.; AFONSO, C. L. Highly divergent virulent isolates of Newcastle disease virus from the Dominican Republic are members of a new genotype that may have evolved unnoticed for over 2 decades. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 508-517, 2013.

CREELAN, J. L.; GRAHAM, D. A.; MCCULLOUGH, S. J. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, v. 31, n. 5, p. 493-499, 2002.

CVELIC-CABRILO, V.; MAZIJA, H.; BIDIN, Z.; RAGLAND, W. L. Correlation of haemagglutination inhibition and enzyme-linked immunosorbent assays for antibodies to Newcastle disease virus. **Avian Pathology**, v. 21, n. 3, p. 509-512, 1992.

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

DA SILVA, L. H.; SPILKI, F. R.; RICCETTO, A. G.; DE ALMEIDA, R. S.; BARACAT, E. C.; ARNS, C. W. Genetic variability in the G protein gene of human respiratory syncytial virus isolated from the Campinas metropolitan region, Brazil. **J Med Virol**, v. 80, n. 9, p. 1653-1660, 2008.

DAS, A.; SPACKMAN, E.; PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SUAREZ, D. L. Removal of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) inhibitors associated with cloacal swab samples and tissues for improved diagnosis of Avian influenza virus by RT-PCR. **J Vet Diagn Invest**, v. 21, n. 6, p. 771-778, 2009.

DE ALMEIDA, R. S.; HAMMOUMI, S.; GIL, P.; BRIAND, F. X.; MOLIA, S.; GAIDET, N.; CAPPELLE, J.; CHEVALIER, V.; BALANCA, G.; TRAORE, A.; GRILLET, C.; MAMINIAINA, O. F.; GUENDOUZ, S.; DAKOUO, M.; SAMAKE, K.; BEZEID OEL, M.; DIARRA, A.; CHAKA, H.; GOUTARD, F.; THOMPSON, P.; MARTINEZ, D.; JESTIN, V.; ALBINA, E. New avian paramyxoviruses type I strains identified in Africa provide new outcomes for phylogeny reconstruction and genotype classification. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76413, 2013.

DHAMA, K.; MAHENDRAN, M.; TOMAR, S. Pathogens Transmitted by Migratory Birds: Threat Perceptions to Poultry Health and Production. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 6, p. 516-525, 2008.

DIEL, D. G.; SUSTA, L.; CARDENAS GARCIA, S.; KILLIAN, M. L.; BROWN, C. C.; MILLER, P. J.; AFONSO, C. L. Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 2, p. 378-387, 2012.

DIMITROV, K. M.; RAMEY, A. M.; QIU, X.; BAHL, J.; AFONSO, C. L. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). **Infect Genet Evol**, v. 39, n., p. 22-34, 2016.

DORTMANS, J. C. F. M.; KOCH, G.; ROTTIER, P. J. M.; PEETERS, B. P. H. Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2746-2750, 2009.

DORTMANS, J. C. F. M.; ROTTIER, P. J. M.; KOCH, G.; PEETERS, B. P. H. The Viral Replication Complex Is Associated with the Virulence of Newcastle Disease Virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 10113-10120, 2010.

DOYLE, T. Newcastle disease of fowls. Cited by Doyle TM (1935). **J Comp Pathol Therap**, v. 48, p. 1-20, 1927.

DUAN, X.; ZHANG, P.; MA, J.; CHEN, S.; HAO, H.; LIU, H.; FU, X.; WU, P.; ZHANG, D.; ZHANG, W.; DU, E.; YANG, Z. Characterization of genotype IX Newcastle disease virus strains isolated from wild birds in the northern Qinling Mountains, China. **Virus Genes**, v. 48, n. 1, p. 48-55, 2014.

EASTON, A. J.; DOMACHOWSKIE, J. B.; ROSENBERG, H. F. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 2, p. 390-412, 2004.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Newcastle disease**. 2014. Disponível em < http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/newcastle_en.htm > . Acesso em 15/11/2015

FERNANDES, C. C.; VARANI, A. M.; LEMOS, E. G.; DE MIRANDA, V. F.; SILVA, K. R.; FERNANDO, F. S.; MONTASSIER, M. F.; MONTASSIER, H. J. Molecular and phylogenetic characterization based on the complete genome of a virulent pathotype of Newcastle disease virus isolated in the 1970s in Brazil. **Infect Genet Evol**, v., n., p., 2014.

FORNELLS, L. A.; SILVA, T. F.; BIANCHI, I.; TRAVASSOS, C. E.; LIBERAL, M. H.; ANDRADE, C. M.; PETRUCCI, M. P.; VEIGA, V. F.; VASLIN, M. F.; COUCEIRO, J. N. Detection of paramyxoviruses in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on the Brazilian tropical coast. **Vet Microbiol**, v. 156, n. 3-4, p. 429-433, 2012.

FORNELLS, L. A.; TRAVASSOS, C. E.; COSTA, C. M.; NOVELLI, R.; PETRUCCI, M. P.; SOFFIATI, F. L.; BIANCHI, I.; DE SOUZA, L. F.; VEIGA, V. F.; LIBERAL, M. H.; COUCEIRO, J. N. Detection of avian paramyxoviruses in migratory and resident birds in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Avian Diseases**, v. 57, n. 4, p. 780-784, 2013.

GANAR, K.; DAS, M.; SINHA, S.; KUMAR, S. Newcastle disease virus: Current status and our understanding. **Virus Research**, v. 184, n., p. 71-81, 2014.

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

HINES, N. L.; KILLIAN, M. L.; PEDERSEN, J. C.; REISING, M. M.; MOSOS, N. A.; MATHIEU-BENSON, C.; MILLER, C. L. An rRT-PCR assay to detect the matrix gene of a broad range of avian paramyxovirus serotype-1 strains. **Avian Diseases**, v. 56, n. 2, p. 387-395, 2012.

HOLMES, H. Resistance of the respiratory tract of the chicken to Newcastle disease virus infection following vaccination: the effect of passively acquired antibody on its development. **Journal of Comparative Pathology**, v. 89, n. 1, p. 11-19, 1979.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus taxonomy**: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2014.

IORIO, R. M.; MAHON, P. J. Paramyxoviruses: different receptors—different mechanisms of fusion. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 135-137, 2008.

KALETA, E. F.; WERNER, O.; HEMBERGER, Y. Isolation and characterization of avian paramyxovirus type 3b from farmed Namibian ostriches (*Struthio camelus* f. dom.). Isolierung und Charakterisierung von aviärem Paramyxovirus Typ 3b aus farmmäßig gehaltenen Straußen (*Struthio camelus* f. dom.) in Namibia. **Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.**, v. 8, n. 3-4, p. 103-110, 2010.

KHAN, T. A.; RUE, C. A.; REHMANI, S. F.; AHMED, A.; WASILENKO, J. L.; MILLER, P. J.; AFONSO, C. L. Phylogenetic and biological characterization of Newcastle disease virus isolates from Pakistan. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1892-1894, 2010.

KIM, L. M.; SUAREZ, D. L.; AFONSO, C. L. Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. **J Vet Diagn Invest**, v. 20, n. 4, p. 414-425, 2008.

KOTHLOW, S.; HAUSLAIGNER, R.; KASPERS, B.; GRUND, C. Evaluation of Newcastle disease virus immunoassays for waterfowl using a monoclonal antibody specific for the duck immunoglobulin light chain. **Avian Pathology**, v. 37, n. 3, p. 323-328, 2008.

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

LAMB, R. A.; KRUG, R. M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M. E HOWELL, D. L. (Ed.). **Fields virology**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1487-1531.

LAMB, R. A.; PARKS, G. D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1450-1496.

LANCASTER, J. E. Newcastle disease. A review of some of the literature published between 1926 and 1964. **Newcastle disease. A review of some of the literature published between 1926 and 1964.**, v., n., p., 1966.

LESLIE, J. Newcastle disease: outbreak losses and control policy costs. **The Veterinary Record**, v. 146, n. 21, p. 603-606, 2000.

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

LIU, H.; WANG, Z.; WU, Y.; WU, Y.; SUN, C.; ZHENG, D.; XU, T.; LI, J. Molecular characterization and phylogenetic analysis of new Newcastle disease virus isolates from the mainland of China. **Res Vet Sci**, v. 85, n. 3, p. 612-616, 2008a.

LIU, H.; WANG, Z.; WANG, Y.; SUN, C.; ZHENG, D.; WU, Y. Characterization of Newcastle disease virus isolated from waterfowl in China. **Avian Diseases**, v. 52, n. 1, p. 150-155, 2008b.

MAMINIAINA, O. F.; GIL, P.; BRIAND, F. X.; ALBINA, E.; KEITA, D.; ANDRIAMANIVO, H. R.; CHEVALIER, V.; LANCELOT, R.; MARTINEZ, D.; RAKOTONDRAVAO, R.; RAJAONARISON, J. J.; KOKO, M.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A. A.; JESTIN, V.; SERVAN DE ALMEIDA, R. Newcastle disease virus in Madagascar: identification of an original genotype possibly deriving from a died out ancestor of genotype IV. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e13987, 2010.

MARKS, F. S.; RODENBUSCH, C. R.; OKINO, C. H.; HEIN, H. E.; COSTA, E. F.; MACHADO, G.; CANAL, C. W.; BRENTANO, L.; CORBELLINI, L. G. Targeted survey of Newcastle disease virus in backyard poultry flocks located in wintering site for migratory birds from Southern Brazil. **Prev Vet Med**, v. 116, n. 1-2, p. 197-202, 2014.

MCGINNES, L.; MCQUAIN, C.; MORRISON, T. The P protein and the nonstructural 38K and 29K proteins of Newcastle disease virus are derived from the same open reading frame. **Virology**, v. 164, n. 1, p. 256-264, 1988.

MEULEMANS, G.; VAN DEN BERG, T. P.; DECAESSTECKER, M.; BOSCHMANS, M. Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. **Avian Pathology**, v. 31, n. 5, p. 515-519, 2002.

MILLER, J. P.; AFONSO, C. L.; SPACKMAN, E.; SCOTT, M. A.; PEDERSEN, J. C.; SENNE, D. A.; BROWN, J. D.; FULLER, C. M.; UHART, M. M.; KARESH, W. B.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; SWAYNE, D. E. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. **J Virol**, v. 84, n. 21, p. 11496-11504, 2010.

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

MILLER, P. J.; DIMITROV, K. M.; WILLIAMS-COPLIN, D.; PETERSON, M. P.; PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SWAYNE, D. E.; SUAREZ, D. L.; AFONSO, C. L. International Biological Engagement Programs Facilitate Newcastle Disease Epidemiological Studies. **Front Public Health**, v. 3, p. 235, 2015.

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

MUIR, W. I.; BRYDEN, W. L.; HUSBAND, A. J. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 325-342, 2000.

MUNIR, M.; CORTEY, M.; ABBAS, M.; QURESHI, Z. U.; AFZAL, F.; SHABBIR, M. Z.; KHAN, M. T.; AHMED, S.; AHMAD, S.; BAULE, C.; STAHL, K.; ZOHARI, S.; BERG, M. Biological characterization and phylogenetic analysis of a novel genetic group of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in commercial poultry and from backyard poultry flocks in Pakistan. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 5, p. 1010-1019, 2012.

NAGAI, Y.; KLENK, H. D.; ROTT, R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. **Virology**, v. 72, n. 2, p. 494-508, 1976.

NAYAK, B.; DIAS, F. M.; KUMAR, S.; PALDURAI, A.; COLLINS, P. L.; SAMAL, S. K. Avian paramyxovirus serotypes 2-9 (APMV-2-9) vary in the ability to induce protective immunity in chickens against challenge with virulent Newcastle disease virus (APMV-1). **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2220-2227, 2012.

NEROME, K.; NAKAYAMA, M.; ISHIDA, M.; FUKUMI, H. Isolation of a new avian paramyxovirus from budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). **J Gen Virol**, v. 38, n. 2, p. 293-301, 1978.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. D.; SCHIAVO, P. A.; DORETTO JÚNIOR, L.; ORSI, M. A.; MAZUR, C.; ANDRADE, C. M. Isolation and biological characterization of JAP99 Newcastle disease virus isolated from domestic ducks (*Neta sp*) in Rio de Janeiro State. **Ciencia Rural**, v. 35, n. 4, p. 948-951, 2005.

ORSI, M. A. **Caracterização Biológica, molecular, imunológica e estabilidade térmica das estirpes vacinais e de isolados da doença de Newcastle de aves de produção industrial e migratórias no Brasil**. 2010. 146 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, 2010. .

ORSI, M. A.; DORETTO, L.; CAMILLO, S. C. A.; REISCHAK, D.; RIBEIRO, S. A. M.; RAMAZZOTI, A.; MENDONCA, A. O.; SPILKI, F. R.; BUZINARO, M. G.; FERREIRA, H. L.; ARNS, C. W. A Survey for Maintenance of Virulent Newcastle Disease Virus-Free Area in Poultry Production in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 368-375, 2010.

PARRY, S.; AITKEN, I. Local immunity in the respiratory tract of the chicken. II. The secretory immune response to Newcastle disease virus and the role of IgA. **Veterinary Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 143-165, 1977.

PATTISON, M.; ALLAN, W. Infection of chicks with infectious bursal disease and its effect on the carrier state with Newcastle disease virus. **Veterinary Record**, v. 95, n. 3, p. 65-66, 1974.

PEARSON, G. L.; MCCANN, M. K. The role of indigenous wild, semidomestic, and exotic birds in the epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1972-1973. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 167, n. 7, p. 610-614, 1975.

PEEPLES, M.; BRATT, M. Mutation in the matrix protein of Newcastle disease virus can result in decreased fusion glycoprotein incorporation into particles and decreased infectivity. **Journal of Virology**, v. 51, n. 1, p. 81-90, 1984.

PEETERS, B. P. H.; DE LEEUW, O. S.; KOCH, G.; GIELKEN, A. L. J. Rescue of Newcastle Disease Virus from Cloned cDNA: Evidence that Cleavability of the Fusion Protein Is a Major Determinant for Virulence. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 5001-5009, 1999.

PEETERS, B. P. H.; GRUIJTHUIJSEN, Y. K.; DE LEEUW, O. S.; GIELKENS, A. L. J. Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. **Archives of Virology**, v. 145, n. 9, p. 1829-1845, 2000.

RAUW, F.; GARDIN, Y.; PALYA, V.; VAN BORM, S.; GONZE, M.; LEMAIRE, S.; VAN DEN BERG, T.; LAMBRECHT, B. Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. **Vaccine**, v. 27, n. 27, p. 3631-3642, 2009.

REYNOLDS, D.; MARAQA, A. Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. **Avian Diseases**, v. 44, n. 1, p. 145-154, 2000.

RIVETZ, B.; WEISMAN, Y.; RITTERBAND, M.; FISH, F.; HERZBERG, M. Evaluation of a novel rapid kit for the visual detection of Newcastle disease virus antibodies. **Avian Dis**, v. 29, n. 4, p. 929-942, 1985.

ROSENBERGER, J.; GELB JR, J. Response to several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, v. 22, n. 1, p. 95-105, 1978.

RUSSELL, P. Monoclonal antibodies in research, diagnosis and epizootiology of Newcastle disease. In: ALEXANDER, D. J. **Newcastle disease**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 131-146.

RUSSELL, P. H.; DWIVEDI, P. N.; DAVISON, T. F. The effects of cyclosporin A and cyclophosphamide on the populations of B and T cells and virus in the Harderian gland of chickens vaccinated with the Hitchner B1 strain of Newcastle disease virus. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 60, n. 1-2, p. 171-185, 1997.

RUSSELL, P. H.; KOCH, G. Local Antibody-Forming Cell Responses to the Hitchner B1 and Ulster Strains of Newcastle-Disease Virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 37, n. 2, p. 165-180, 1993.

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

SANTOS, C.; SILVA, E.; BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. Métodos de diagnósticos laboratoriais microbiológicos e sorológicos. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 171-182.

SCHATZBERG, S. J.; LI, Q.; PORTER, B. F.; BARBER, R. M.; CLAIBORNE, M. K.; LEVINE, J. M.; LEVINE, G. J.; ISRAEL, S. K.; YOUNG, B. D.; KIUPEL, M.; GREENE, C.; RUONE, S.; ANDERSON, L.; TONG, S. Broadly reactive pan-paramyxovirus reverse

transcription polymerase chain reaction and sequence analysis for the detection of Canine distemper virus in a case of canine meningoencephalitis of unknown etiology. **J Vet Diagn Invest**, v. 21, n. 6, p. 844-849, 2009.

SÃO PAULO (Estado). Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo. Certificação Sanitária da Compartimentação da Cadeia Produtiva Avícola das granjas de reprodução, de corte e incubatórios, de galinhas ou perus, para a infecção pelos vírus de influenza aviária - IA e doença de Newcastle - DNC. **Instrução normativa SDA**, n. 21, de 21 de outubro de 2014. Disponível em: < <http://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=1001> >. Acesso em 08/02/2015.

SEAL, B. S. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase protein genes among Newcastle disease virus isolates. Phylogenetic relationships among the Paramyxovirinae based on attachment glycoprotein sequences. **Funct Integr Genomics**, v. 4, n. 4, p. 246-257, 2004.

SEN, S.; SHANE, S.; SCHOLL, D.; HUGH-JONES, M.; GILLESPIE, J. Evaluation of alternative strategies to prevent Newcastle disease in Cambodia. **Preventive veterinary medicine**, v. 35, n. 4, p. 283-295, 1998.

SILVA, J.; MOTA, R.; VILELA, S.; DORETTO JÚNIOR, L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.; SILVA, L. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of the agreste region of the State of Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 8, n. 2, p. 125-129, 2006.

SNOECK, C. J.; OWOADE, A. A.; COUACY-HYMAN, E.; ALKALI, B. R.; OKWEN, M. P.; ADEYANJU, A. T.; KOMOYO, G. F.; NAKOUNE, E.; LE FAOU, A.; MULLER, C. P. High Genetic Diversity of Newcastle Disease Virus in Poultry in West and Central Africa: Cocirculation of Genotype XIV and Newly Defined Genotypes XVII and XVIII. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2250-2260, 2013.

SNYDER, D. B.; MARQUARDT, W. W.; MALLINSON, E. T.; SAVAGE, P. K.; ALLEN, D. C. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. III. Simultaneous measurements of antibody titers to infectious bronchitis, infectious bursal disease, and Newcastle disease viruses in a single serum dilution. **Avian Dis**, v. 28, n. 1, p. 12-24, 1984.

SPACKMAN, E.; PEDERSEN, J. C.; MCKINLEY, E. T.; GELB, J., JR. Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. **BMC Vet Res**, v. 9, p. 35, 2013.

SPRADBROW, P. A review of the use of food carriers for the delivery of oral Newcastle disease vaccine. **Newcastle Disease in Village Chickens Control with Thermostable Oral Vaccine**, n. 39, p. 18-20, 1992.

TAKADA, A.; KIDA, H. Protective immune response of chickens against Newcastle disease, induced by the intranasal vaccination with inactivated virus. **Vet Microbiol**, v. 50, n. 1-2, p. 17-25, 1996.

TERREGINO, C.; ALDOUS, E. W.; HEIDARI, A.; FULLER, C. M.; DE NARDI, R.; MANVELL, R. J.; BEATO, M. S.; SHELL, W. M.; MONNE, I.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; CAPUA, I. Antigenic and genetic analyses of isolate APMV/wigeon/Italy/3920-1/2005 indicate that it represents a new avian paramyxovirus (APMV-12). **Archives of Virology**, v. 158, n. 11, p. 2233-2243, 2013.

THOMAZELLI, L.; DE ARAUJO, J.; FERREIRA, C. D. S.; HURTADO, R.; OLIVEIRA, D.; OMETTO, T.; GOLONO, M.; SANFILIPPO, L.; DEMETRIO, C.; FIGUEIREDO, M. Molecular surveillance of the Newcastle disease virus in domestic and wild birds on the North Eastern Coast and Amazon biome of Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 14, n. 1, p. 01-07, 2012.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology**. St Louis: Elsevier, 2013. 554 p.
TONG, S.; CHERN, S. W.; LI, Y.; PALLANSCH, M. A.; ANDERSON, L. J. Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 8, p. 2652-2658, 2008.

TUMOVA, B.; ROBINSON, J.; EASTERDAY, B. A hitherto unreported paramyxovirus of turkeys. **Research in Veterinary Science**, v. 27, n. 2, p. 135-140, 1979.

UTHRAKUMAR, A.; VIJAYARANI, K.; KUMANAN, K.; BHUVANESWARI, S.; KUCHIPUDI, S. V.; ELANKUMARAN, S. Complete genome sequence of a velogenic newcastle disease virus isolated from an apparently healthy village chicken in South India. **Genome Announc**, v. 2, n. 3, p. e00597, 2014.

VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T. M.; VERHAGEN, J. H.; OSTERHAUS, A. D.; PAS, S. D.; HERFST, S.; FOUCHIER, R. A. A family-wide RT-PCR assay for detection of paramyxoviruses and application to a large-scale surveillance study. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34961, 2012.

VAN BORM, S.; OBISHAKIN, E.; JOANNIS, T.; LAMBRECHT, B.; VAN DEN BERG, T. Further evidence for the widespread co-circulation of lineages 4b and 7 velogenic Newcastle disease viruses in rural Nigeria. **Avian Pathol**, v. 41, n. 4, p. 377-382, 2012.

VAN BORM, S.; STEENSELS, M.; FERREIRA, H. L.; BOSCHMANS, M.; DE VRIESE, J.; LAMBRECHT, B.; VAN DEN BERG, T. A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction control and its application to avian influenza diagnosis and quantification. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 213-220, 2007. Supplement, 1.

WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. **Nature**, v. 289, n. 5796, p. 366-373, 1981.

WINSLOW, N. S.; HANSON, R.; UPTON, E.; BRANDLY, C. Agglutination of mammalian erythrocytes by Newcastle disease virus. **Experimental Biology and Medicine**, v. 74, n. 1, p. 174-178, 1950.

WISE, M. G.; SUAREZ, D. L.; SEAL, B. S.; PEDERSEN, J. C.; SENNE, D. A.; KING, D. J.; KAPCZYNSKI, D. R.; SPACKMAN, E. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 329-338, 2004.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Newcastle disease. In: _____. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2012**. 7th ed. [S.l]: OIE, 2012. v. 2, cap. 2.3.14, p. 555-573.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Infection with newcatle disease virus. In: CHAPTER 10.9. Newcastle Disease. In: _____. (Ed.). **Terrestrial animal health code**. 2015. v. 2, cap. 10.9, seção 10. p. 555-573.

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

YAMAMOTO, E.; ITO, H.; TOMIOKA, Y.; ITO, T. Characterization of novel avian paramyxovirus strain APMV/Shimane67 isolated from migratory wild geese in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 9, p. 1079-1085, 2015.

YAMANE, N.; ARIKAWA, J.; ODAGIRI, T.; ISHIDA, N. Characterization of avian paramyxoviruses isolated from feral ducks in northern Japan: the presence of three distinct viruses in nature. **Microbiol Immunol**, v. 26, n. 7, p. 557-568, 1982.

YU, L.; WANG, Z.; JIANG, Y.; CHANG, L.; KWANG, J. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 10, p. 3512-3519, 2001.

ZANETTI, F.; BERINSTEIN, A.; PEREDA, A.; TABOGA, O.; CARRILLO, E. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. **Avian Diseases**, v. 49, n. 4, p. 546-550, 2005.

ZHANG, S.; WANG, X.; ZHAO, C.; LIU, D.; HU, Y.; ZHAO, J.; ZHANG, G. Phylogenetic and pathotypical analysis of two virulent Newcastle disease viruses isolated from domestic ducks in China. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25000, 2011.