

ADRIANO DE OLIVEIRA TORRES CARRASCO

**AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE, TRANSMISSIBILIDADE,
ESTADO DE PORTADOR (RESERVATÓRIO) E DA
RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE POMBOS (*COLUMBA
LIVIA*) SUBMETIDOS À INFECÇÃO EXPERIMENTAL FRENTE
A ESTIRPES DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE (VDN)
DE ALTA E BAIXA PATOGENICIDADE**

Tese (Doutorado) apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Doutor em Ciências
(Microbiologia).

SÃO PAULO
2009

ADRIANO DE OLIVEIRA TORRES CARRASCO

**AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE, TRANSMISSIBILIDADE,
ESTADO DE PORTADOR (RESERVATÓRIO) E DA
RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE POMBOS (*COLUMBA
LIVIA*) SUBMETIDOS À INFECÇÃO EXPERIMENTAL FRENTE
A ESTIRPES DO VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE (VDN)
DE ALTA E BAIXA PATOGENICIDADE**

Tese (Doutorado) apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Doutor em Ciências
(Microbiologia).

Área de Concentração:
Microbiologia

Orientador:
Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto

SÃO PAULO
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Carrasco, Adriano de Oliveira Torres.

Avaliação da infectividade, transmissibilidade, estado de portador (reservatório) e da resposta imune humoral de pombos (*Columba livia*) submetidos à infecção experimental frente a estirpes do vírus da doença de *Newcastle* (V.D.N.) de alta e baixa patogenicidade / Adriano de Oliveira Torres Carrasco. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Aramis Augusto Pinto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Viroses e Clamidioses Animais.

Versão do título para o inglês: Evaluation of infectivity, potential of transmission, reservoirs and humoral immune response of pigeon (*Columba livia*) experimentally infected with low and high pathogenicity strains of Newcastle disease virus (N.D.V.).

Descritores: 1. Doença de Newcastle 2. Columbiformes
3. Virologia veterinária 4. Reação em cadeia pela polimerase I.
Pinto, Aramis Augusto II. Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
III. Título.

ICB/SBIB38/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Adriano de Oliveira Torres Carrasco.

Título da Tese: Avaliação da infectividade, transmissibilidade, estado de portador (reservatório) e da resposta imune humoral de pombos (*Columba livia*) submetidos à infecção experimental frente a estirpes do vírus da doença de Newcastle (V.D.N.) de alta e baixa patogenicidade.

Orientador(a): Aramis Augusto Pinto.

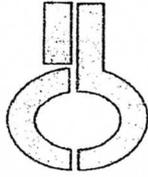
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **093** nas fls. **16** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Aramis Augusto Pinto, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "***Estudo da infectividade, transmissibilidade, estado de portador (Reservatório) e da resposta imune humoral de pombos (Columba livia) submetidos à infecção experimental frente ao vírus da doença de Newcastle (VDN)***" do qual participou(aram) o(s) alunos: **Adriano de Oliveira Torres Carrasco**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.02.2006**.

São Paulo, 06 de março de 2006.

Prof. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA - ICB/USP

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às pessoas que, sem as quais, seria impossível a transposição desta etapa e, por terem acreditado em mim, mesmo quando eu mesmo já não acreditava mais...

- *Silvestre Torres Carrasco e Lígia de Oliveira Torres Carrasco, meus pais, simplesmente por tudo;*
- *Alexandre e André, por todo o apoio fornecido, desde a graduação;*
- *À Maria Clara, um anjo que veio fazer parte de nossa família;*
- *Meire, por todo amor, apoio, carinho, compreensão, afeto e cumplicidade;*
- *Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto, pela orientação, no verdadeiro sentido da palavra*

Dedico....

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por tudo...
- Aos amigos de todas as horas e de boas risadas: Marcos Tranquilim, Ricardo, Zara, Liane, Paulo César, Fabrina, Heloísa, Greyson, Giuliana, Elisângela, Karen, Marcos Garcia, Fábio, Alexandre, João, Trícia, Patrícia, Andréa, aqui vai meu muito obrigado;
- Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso, pela amizade, parceria e cumplicidade;
- Ao Prof. Dr. Ricardo Luis Moro de Sousa, pelo auxílio na interpretação dos resultados e pela amizade;
- Aos amigos de Departamento de Patologia da FCAV: Karina, Josie, Tiago, Marcos André, Ana Carolina; Jaqueline, Ronaldo, entre outros que me perdoem pela falha de memória;
- Aos meus alunos, orientados e, principalmente amigos: Roberta, Ewerton, Nádia, Andressa, José Carlos, Kettlyn, pelo apoio na CEVET, SAAS, pelo companheirismo e pelas boas risadas;
- Aos Professores Rosângela Z. Machado, Ângelo Berchieri Júnior e Karin Werther, por todo apoio fornecido para realização deste trabalho;
- Prof. Dr. Antônio Carlos Paulillo, pelo empréstimo das instalações, bem como pelo fornecimento da estirpe viral;
- Prof. Dr. Edison Luiz Durigon pela excelente receptividade no ICB II, além de seus orientados, Luciano, Jansen, Larissa, Eduardo, Andréa, Cláudia e em especial, Juliana Rodrigues, pelo auxílio no sequenciamento das minhas amostras padrão;

- Aos funcionários do Depto. de Patologia Veterinária: Lurdinha; Chica; Lia; Moema; João; Edgar; Téo; Sr. Antônio e D. Cida;
- A Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, em especial o DEVET, instituição que me acolheu da melhor forma possível, proporcionando meu crescimento pessoal e profissional;
- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processo 04/13868-0 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –CNPq-, Processo 511722/93-4, pelo financiamento do projeto;
- A todos os meus alunos, que de uma forma ou outra, participam de minha formação constante, no exercício do magistério;
- Aos meus animais, que foram excelentes companhias: Vida; Vírus; Tequila; Tila e Fiona
- Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo atencioso atendimento;
- A Alice Mitsue Shimabuku, secretária do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do ICB/USP, pela dedicação e paciência em auxiliar na consecução protocolar deste trabalho;
- A todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, sempre estiveram presentes nestes anos de luta.

MUITO OBRIGADO DE CORAÇÃO!!!!

LONGOS ANOS DE TRABALHO SÓ ME TRANQUİLIZA SABER QUE GUARDEI FOLGA PARA DEFENDER OS MAIS POBRES, MINHAS CONVICÇÕES POLÍTICAS, SATISFEITO COMIGO MESMO. A ARQUITETURA NÃO É NADA PRA MIM... O PRINCIPAL É A VIDA, ESTE MUNDO QUE UM DIA VAMOS MODIFICAR.”

OSCAR NIEMEYER

“A CADA DIA QUE VIVO, MAIS ME
CONVENÇO DE QUE O DESPERDÍCIO DA
VIDA ESTÁ NO AMOR QUE NÃO DAMOS,
NAS FORÇAS QUE NÃO USAMOS, NA
PRUDÊNCIA EGOÍSTA QUE NADA ARRISCA
E QUE, ESQUIVANDO-SE DO SOFRIMENTO,
PERDEMOS TAMBÉM A FELICIDADE.

A DOR É INEVITÁVEL.
O SOFRIMENTO É OPCIONAL.

A DOR É APENAS A DIFERENÇA ENTRE O
QUE É, E O QUE EU QUERO QUE SEJA.”

CARLOS DRUMMOND DE ANDRADE

RESUMO

CARRASCO, A. O. T. **Avaliação da infectividade, transmissibilidade, estado de portador (reservatório) e da resposta imune humoral de pombos (*Columba livia*) submetidos à infecção experimental frente a estirpes do Vírus da Doença de Newcastle (V.D.N) de alta e baixa patogenicidade.** 2009. 122 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O presente trabalho foi delineado com o objetivo de agregar o maior número de informações possíveis acerca do comportamento de pombos domésticos (*Columba livia*) e galinhas (*Gallus gallus*), imunes e não imunes, submetidos à infecção experimental direta e por contato pelo vírus da doença de Newcastle (VDN). Os resultados obtidos nos quatro modelos experimentais estudados, avaliados por meio das técnicas sorológicas de Inibição da Hemaglutinação (HI) e de Fixação do Complemento (RFC) e de detecção de genoma viral (RT-PCR), revelaram que pombos e galinhas previamente imunizadas com a estirpe de baixa patogenicidade do VDN (LaSota), desenvolveram altos títulos de anticorpos em ambas as espécies aviárias, os quais reduzem significativamente a excreção viral, quando submetidos à infecção por estirpe de alta patogenicidade do VDN (São João do Meriti). Nos pombos experimentalmente infectados pela estirpe viral patogênica, não foram observados sinais clínicos aparentes da doença, o mesmo não ocorrendo nas galinhas, que vieram a óbito, a partir de 72 horas pós-infecção. Os pombos infectados eliminaram genoma da estirpe viral patogênica, os quais não foram detectados nas galinhas sentinelas e controles, em contato. A utilização de oligonucleotídeos específicos permitiu a diferenciação entre as estirpes virais (alta e baixa patogenicidade) eliminadas pela cloaca das aves em estudo. Na avaliação da presença do VDN em amostras de tecidos, por meio da RT-PCR, o baço foi o local de maior ocorrência de detecção.

Palavras Chave: Doença de Newcastle; *Columba livia*; Pombos; Inibição da Hemaglutinação; RT-PCR; Infecção Experimental

ABSTRACT

CARRASCO, A. O. T. **Evaluation of infectivity, potential of transmission, reservoirs state and humoral immune response of pigeon (*Columba livia*) experimentally infected with low and high pathogenicity strains of Newcastle Disease virus (N.D.V.).** 2009. 122 p. Ph. D. Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

This study was designed with the goal of adding as much information as possible about the behavior of pigeons (*Columba livia*) and chicken (*Gallus gallus*), immune and not immunized, submitted to direct experimental infection and by contact with Newcastle Disease virus (NDV). The results obtained in four experimental models in question, evaluated by serological techniques of Hemagglutination Inhibition (HI) and Complement Fixation (RFC), and the detection of viral genome (RT-PCR) revealed that pigeons and chickens previously immunized with a low pathogenic strain of NDV (LaSota) developed high antibody titers in both avian species, which significantly reduces virus shedding, when subjected to infection by highly pathogenic strain of NDV (São João do Meriti). In pigeons experimentally infected with pathogenic viral strain did not see any clinical signs of disease, which did not occur in chickens, which they had died, from 72 hours post-infection. Pigeons infected eliminated genome of pathogenic viral strain, which were not detected in sentinel chickens and controls. The use of specific primers allowed the differentiation between viral strains (high and low pathogenicity) excreted for cloaca of birds. In assessing the presence of NDV in tissue samples, by RT-PCR, the spleen was the most frequent site of detection.

Keywords: Newcastle Disease; *Columba livia*; Pigeons; Hemagglutination Inhibition; RT-PCR; Experimental Infection

LISTA DE FIGURAS

1. Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de pombos experimentalmente infectados (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1. 65
2. Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de pombos vacinados (D0 e 35º DE) e experimentalmente infectados (61º DE), submetidos ao Modelo Experimental 2. 67
3. Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de galinhas sentinelas, submetidas ao Modelo Experimental 2. 67
4. Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de pombos experimentalmente infectados (40º DE), submetidos ao Modelo Experimental 3. 69
5. Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e sentinelas, submetidas ao Modelo Experimental 3. 69
6. Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros dos pombos sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4. 71
7. Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros das galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e experimentalmente infectadas (40º DE) em contato com galinhas sentinelas, submetidas ao Modelo Experimental 4. 71

8. Representação gráfica dos títulos de anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), de soros de pombos experimentalmente infectados (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1. 73
9. Representação gráfica dos títulos de anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos vacinados (D0 e 35^o DE) e experimentalmente infectados (61^o DE), submetidos ao Modelo Experimental 2. 74
10. Representação gráfica dos títulos de anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos experimentalmente infectados (40^o DE), submetidos ao Modelo Experimental 3. 75
11. Representação gráfica dos títulos de anticorpos fixadores do complemento (Log_2X) dos soros de pombos sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4. 76
12. Ilustração e caracterização geral dos modelos experimentais: **A**- Isolador de pressão negativa, utilizado para a infecção experimental ; **B** – Galinhas e pombos compartilhando o mesmo ambiente dentro do isolador; **C**- Pombo no momento anterior à vacinação; **D** -Pombo imediatamente após a vacinação; **E**- Galinha experimentalmente infectada apresentando secreção em cavidade oral; **F**- Petéquias hemorrágicas em pró-ventrículo de galinha experimentalmente infectada. 88

- 13 Eletroforese em gel de agarose 1,2% com os produtos da RT-PCR: **A**- Amostras provenientes de tecidos (Pulmão – P; Fígado – F; Baço – B; Traquéia – T) do pombo P30, pertencente ao Modelo Experimental 2. Coluna 5 controle negativo; coluna 6 controle positivo (362pb); pb – marcador de peso molecular 100pb. **B** - Amostras provenientes de reação utilizando *primers* específicos. Colunas 1 e 2 controle positivo (*primer* LS – 120 pb) ; colunas 3 e 4 amostras positivas (*primer* SJM – 234 pb); coluna 5 controle negativo; coluna 6 controle positivo (*primer* genérico – 362 pb); pb – marcador de peso molecular 100pb.

LISTA DE TABELAS

1. Resultados dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de pombos experimentalmente infectados e de aves (pombos e galinhas) pertencentes ao grupo controle, submetidos ao Modelo Experimental 1. 65
2. Resultados dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de pombos vacinados e experimentalmente infectados, em contato com galinhas sentinelas e de aves (pombos e galinhas) pertencentes ao grupo controle, submetidos ao Modelo Experimental 2. 66
3. Resultados dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de pombos experimentalmente infectados em contato com galinhas (vacinadas e sentinelas) e de aves (pombos e galinhas) pertencentes ao grupo controle, submetidos ao Modelo Experimental 3. 68
4. Resultados dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de galinhas vacinadas e experimentalmente infectadas, em contato com pombos e galinhas sentinelas e de aves (pombos e galinhas) pertencentes ao grupo controle, submetidos ao Modelo Experimental 4. 70
5. Resultados dos títulos dos anticorpos fixadores do complemento (Log_2X) dos soros de pombos experimentalmente infectados (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1. 73

6. Resultados dos títulos dos anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos vacinados (D0 e 35º DE) e experimentalmente infectados (61º DE), submetidos ao Modelo Experimental 2. 74
7. Resultados dos títulos dos anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos experimentalmente infectados (40º DE), submetidos ao Modelo Experimental 3. 75
8. Resultados dos títulos dos anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4. 76
9. Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, em pombos e galinhas experimentalmente infectados (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1. 79
10. Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, em pombos vacinados (D0 e 35º DE) e experimentalmente infectados (61º DE) em contato com galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 2. 80
11. Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, em pombos experimentalmente infectados (40º DE) em contato com galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 3. 81
12. Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, em galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e experimentalmente infectadas (40º DE), em contato com pombos e galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4. 82

13. Detecção do genoma do VDN, aferida pela RT-PCR, em amostras de tecidos de pombos e galinhas experimentalmente infectadas (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1. 83
14. Detecção do genoma do VDN, aferida pela RT-PCR, em amostras de tecidos de pombos vacinados (D0 e 35º DE) e experimentalmente infectados (61º DE) em contato com galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 2. 83
15. Detecção do genoma do VDN, aferida pela RT-PCR, em amostras de tecidos de pombos experimentalmente infectados (40º DE) em contato com galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 3. 84
16. Detecção do genoma do VDN, aferida pela RT-PCR, em amostras de tecidos de galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e experimentalmente infectadas (40º DE), em contato com pombos e galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4. 84
17. Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos São João do Meriti (SJM), em aves experimentalmente infectadas (D0), submetidas ao Modelo Experimental 1. 86
18. Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos São João do Meriti (SJM), em pombos vacinados (D0 e 35º DE) e experimentalmente infectados (61º DE) em contato com galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 2. 86

19. Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos São João do Meriti (SJM), em pombos experimentalmente infectados (40º DE) em contato com galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 3.

87

20. Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos São João do Meriti (SJM), em galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e experimentalmente infectadas (40º DE), em contato com pombos e galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4.

87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
3	OBJETIVOS	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	Aves Experimentais e Manejo	47
4.2	Produção de Antígenos	51
4.3	Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)	51
4.4	Reação de Fixação de Complemento (RFC)	53
4.4.1	Determinação da Dose de Reatividade do Antígeno	54
4.5	Técnica de Adsorção e Eluição Viral	55
4.6	Reação em Cadeia pela Polimerase Pós Transcrição Reversa	56
4.6.1	Extração do RNA Viral	56
4.6.2	Descrição dos Oligonucleotídeos Iniciadores (“ <i>primers</i> ”)	56
4.6.3	Síntese de cDNA – Transcrição Reversa do RNA Viral	57
4.6.4	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	57
4.6.5	Deteção do Produto Amplificado	58
4.7	Seqüenciamento das Amostras Padrão	58
4.8	Desenho de <i>Primers</i> Específicos	60
4.9	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) Específica	60
4.10	Deteção do Produto Amplificado Específico	61
5	RESULTADOS	63
5.1	Reação de Inibição da Hemaglutinação	63
5.2	Reação de Fixação de Complemento	72
5.3	Avaliação da Eliminação do Genoma Viral	76
5.4	Diferenciação Molecular (RT-PCR) entre as Estirpes Virais LaSota e São João do Meriti Eliminadas	84

6	DISCUSSÃO	90
7	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

1 INTRODUÇÃO

A Doença de Newcastle (DN) é uma enfermidade de etiologia viral e de rápido poder de disseminação, que acomete várias espécies de aves domésticas e silvestres. Segundo critérios estabelecidos pelo Código Zoosanitário Internacional da OIE (*Oficce International des Epizooties*) é considerada doença de notificação compulsória, devido aos elevados prejuízos que causa à avicultura, acarretando sérias conseqüências sócio-econômicas, principalmente em decorrência da limitação do livre comércio internacional de aves e seus subprodutos.

Um grande número de espécies aviárias, distribuídas entre as 27 das 50 ordens existentes, é susceptível ao vírus da doença de Newcastle (VDN). Entre tais espécies, o pombo doméstico (*Columba livia*), usualmente encontrado tanto em áreas urbanas, como em áreas rurais, tem sido incriminado como hospedeiro e disseminador da doença não só para aves de produção, mas também para aves silvestres, razão da sua importância na cadeia epidemiológica da enfermidade.

De fato, a coabitação de pombos, amplamente disseminado pelas cidades brasileiras, com aves destinadas às criações comerciais, quando a procura de alimento e água é uma situação que simula o que realmente acontece em condições de campo. Por ser ave de vida livre, pode carrear o VDN para dentro de granjas comerciais e, ainda, em condições favoráveis transmitir para aves de vida livre, estirpes virais presentes em granjas. É pouco conhecida ou questionável a capacidade de pombos previamente infectados com estirpe de VDN patogênica para galinhas, transmitir a doença para galinhas em contato.

Por outro lado, é sabido que pombos domésticos são capazes de transmitir naturalmente estirpes patogênicas do VDN para outros pombos sem, contudo, apresentar qualquer indício de sinal clínico da doença. Em tais condições, somente a resposta imune humoral e o estado de portador têm sido observados, este último, caracterizado pela eliminação intermitente do vírus.

Em face disso e considerando que a avicultura brasileira desempenha importante papel na balança comercial, por ser o País o maior exportador de frangos do mundo, torna-se imperioso encetar estudos objetivando ampliar os conhecimentos a respeito da infectividade, transmissibilidade, estado de portador

(reservatório) e da resposta imune humoral de pombos, submetidos à infecção experimental e à vacinação frente a estirpes do VDN de alta e baixa patogenicidade para galinhas. E, ainda, avaliar o comportamento de pombos quando submetidos à infecção com uma estirpe viral de alta patogenicidade para galinhas, no que tange à possibilidade de adaptação viral, após passagem em uma nova espécie aviária distinta, para se estabelecer, com maior objetividade, as relações dentro do sistema VDN-POMBO-GALINHA, envolvidos na doença de Newcastle.

Assim sendo, o presente estudo tem como proposta a quantificação da resposta imune humoral de pombos frente a estirpes vacinais usualmente utilizadas na imunização de aves comerciais, bem como averiguar a capacidade destes imunógenos em reduzir a eliminação viral e, conseqüentemente, tornar arrefecido qualquer possibilidade de ocorrência de sinais clínicos da DN. E, ainda, avaliar, por meio de infecção experimental em pombos, o comportamento de uma estirpe viral de alta patogenicidade para galinhas, no que diz respeito à possibilidade de adaptação viral de tal estirpe, após passagem em uma nova espécie, ou seja, pombos. Finalmente, por meio de infecção experimental realizada em pombos e galinhas conviventes, obter informações acerca da transmissibilidade inter-específica do VDN. De posse de tais informações, dimensionar o real papel desempenhado pelo pombo na cadeia epidemiológica da DN, principalmente no que tange a disseminação da enfermidade para galinhas, bem como agregar informações no que diz respeito à medidas de imunoprofilaxia, objetivando desta forma, um melhor controle da enfermidade, seja em plantéis de aves comerciais, seja em aves de vida livre.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O vírus da doença de Newcastle (VDN) pertence à Ordem *Mononegavirales*, Família *Paramyxoviridae*, Subfamília *Paramyxovirinae* e Gênero *Avulavirus*. Os vírus pertencentes à família *Paramyxoviridae* são RNA vírus de fita simples, com envoltório e genoma não segmentado de aproximadamente 15,2Kb, além de polaridade negativa (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV, 2002). O VDN é também conhecido como Paramyxovirus Aviário Tipo 1 (APMV 1 – do inglês, *Avian Paramyxovirus Type 1*) pertencendo ao gênero *Avulavirus*. Ainda a este gênero, pertencem outras estirpes virais, como os Paramyxovirus Aviários Tipo 2 ao 9. Além destas, existem ainda amostras denominadas de Paramyxovirus Tipo 1 provenientes de pombos ("*Pigeon Paramyxovirus*" – 1 – PPMV-1) que foram primeiramente descritas em 1978, e posteriormente diferenciadas, por meio de anticorpos monoclonais, das demais estirpes de Paramyxovirus aviários (ICTV, 2002). Em linhas gerais, tais estirpes virais são variantes do APMV-1 que, após sucessivas passagens em outro(s) hospedeiro(s), sofreram um processo de adaptação aos pombos, tornando-se, adaptadas a esta espécie. Embora o VDN possua apenas um sorotipo, existem pelo menos oito genótipos distintos, designados de I a VIII, os quais foram caracterizados por meio de enzimas de restrição e análise das seqüências do gene de fusão F (MAYO, 2002; JEON et al., 2008).

O VDN possui morfologia esférica, podendo às vezes apresentar-se ligeiramente pleomórfico, com cerca de 150 a 200 nm de diâmetro e um nucleocapsídeo de 12 a 17 nm de diâmetro. O nucleocapsídeo é revestido por um envoltório constituído por dupla camada lipídica, das quais emergem projeções de origem viral, com atividades específicas de dois tipos: HN e F. A glicoproteína HN compreende as enzimas hemaglutinina e neuraminidase e a glicoproteína F a função de adesão da partícula viral à membrana celular do hospedeiro. A hemaglutinina confere ao VDN a capacidade de aglutinar eritrócitos, enquanto a neuraminidase atua promovendo a gradual eluição das partículas virais aglutinadas, atividades essas importantes na patogenia da doença. Todas as estirpes do VDN possuem a capacidade de adsorver e aglutinar hemácias de

aves, répteis, anfíbios, cobaias, ratos e humanos. Os anticorpos dirigidos contra a glicoproteína HN do vírion inibem a hemaglutinação do vírus à superfície da hemácia e o título de tais anticorpos é utilizado na mensuração da imunidade humoral, passíveis de serem quantificados por meio de testes de inibição da hemaglutinação (HI) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA), todos utilizados no diagnóstico sorológico da DN (ACKERMAN, 1964; KOUWENHOVEN, 1993; LAMB e KOLAKOFSKY, 1996; ALEXANDER, 1997; MILLAR et al., 1998).

O genoma viral é constituído por seis genes (3'-NP-P-M-F-HN-L-5') que codificam as duas glicoproteínas estruturais de superfície (HN e F), além de outras quatro proteínas, ou seja, proteína da matriz viral (M), proteína polimerase grande (L), proteína do nucleocapsídeo (NP) e uma fosfoproteína associada ao nucleocapsídeo (P) (KOUWENHOVEN, 1993; LEEUW e PEETERS, 1999). A proteína F, conforme anteriormente citado é a responsável pela fusão do envoltório viral a receptores da membrana plasmática da célula hospedeira e sua conseqüente penetração. Tal atividade só é possível pela clivagem do precursor F_0 , por meio de uma enzima do hospedeiro, em dois polipeptídios ligados, F_1 e F_2 (MERZ et al., 1981). As F_0 das amostras virulentas de VDN são clivadas em uma grande variedade de células do hospedeiro, enquanto aquelas das amostras não virulentas são clivadas somente em limitados tipos celulares. A capacidade de replicação das amostras virulentas em diversos grupos celulares torna o VDN capaz de disseminar extensivamente através de uma gama enorme de hospedeiros (TOYODA et al., 1987; JESTIN, V. e JESTIN, A., 1991; SEAL et al., 1995; SEAL et al., 1996; KANT et al., 1997; OBERDÖRFER e WERNER, 1998; ALDOUS e ALEXANDER, 2001; CAVANAGH, 2001). Portanto, a virulência dos APMV-1 está associada diretamente ao sítio de clivagem da proteína F_0 , ponto este responsável pela patogenicidade da estirpe viral (CREELAN et al., 2002). Assim, a partir da análise da seqüência do sítio de clivagem da proteína F_0 , é possível determinar a virulência de uma estirpe do VDN (LIU et al., 2007). Por outro lado, à medida que mutações são induzidas nos sítios de clivagem da proteína F, concomitantemente há um acréscimo da patogenicidade e da severidade dos sinais clínicos da DN em galinhas experimentalmente infectadas, com estirpes geneticamente modificadas (EGM) (WAKAMATSU et al., 2006). Ainda relacionada à patogenicidade, neste estudo ficou demonstrado que, mutações relacionadas à proteína HN também são fatores determinantes de

patogenicidade. O autor relaciona mutações nesta proteína, como potencializadores das mutações que ocorrem na proteína F. Galinhas inoculadas com EGM alteradas tanto na proteína F quanto na proteína HN apresentaram um acréscimo na severidade dos sinais clínicos apresentados, quando comparadas àquelas que foram inoculadas com EGM apenas com mutações na proteína F (WAKAMATSU et al., 2006).

A proteína do nucleocapsídeo (NP) é a mais importante proteína do vírion, mantendo uma estreita relação com o genoma viral. Durante o processo de replicação viral a proteína NP envolve o genoma recém sintetizado num nucleocapsídeo RNase resistente, propiciando desta forma a proteção da nova partícula viral. Ademais, é capaz de formar o complexo polimerase, em atuação conjunta com as proteínas P e L, interagindo desta forma com a proteína M na montagem do virion (LAMB e KOLAKOFSKY, 1996). A proteína M está presente em maior quantidade no interior do vírion; sua principal função é organizar a morfogênese viral, mantendo o nucleocapsídeo inativo e mediando a associação do nucleocapsídeo com o envoltório recém produzido, no momento da replicação viral (COLLINS et al., 1996).

Ainda no processo de replicação viral, devido a baixa fidelidade da RNA polimerase, existe a possibilidade da produção de novas partículas virais, intimamente relacionadas, porém distintas, denominadas de *quasispecies* (DOMINGO, 2002; BARBEZANGE e JESTIN, 2005a). As *quasispecies* desempenham um importante papel na sobrevivência e na evolução dos vírus de RNA, particularmente na patogenicidade e nas manifestações clínicas das doenças (BARBEZANGE e JESTIN, 2005b) e, a teoria da origem destas, está alicerçada na teoria da evolução de Darwin, com ênfase na mutação e na adaptabilidade de partículas de RNA viral (KAMP, 2003; PERALES et al., 2005). A dinâmica das *quasispecies* é caracterizada pela geração contínua de variantes do genoma viral, seja por mutação espontânea, seja por pressão do sistema imune do hospedeiro. Tal evento é o ponto inicial do processo de variabilidade genética viral (PERALES et al., 2005; BRIONES et al., 2006; SNOECK et al. 2008), na qual está fundamentada em três pontos principais: mutação; recombinação e rearranjo genômico (COMAS et al., 2005). Em estudos realizados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foram observados que a variabilidade viral proporciona vantagens ao vírus, seja na manutenção de infecções crônicas, seja

na re-emergência de uma infecção ou ainda na ocorrência de resistência às terapias antivirais (BRIONES et al., 2006). Com relação ao APMV-1 foram observadas a presença de sub-populações virulentas em estirpes de baixa patogenicidade (Lentogênicas) e alteração de virulência também ocorreu após sucessivas inoculações em galinhas (ALEXANDER e PARSON, 1984). Alguns autores relatam a possibilidade de amostras do PPMV-1 serem heterogêneas dentro de uma população de pombos, porém após sucessivas passagens em galinhas, pode ocorrer homogeneização destas, selecionando desta forma sub-populações de alta virulência (KISSI e LOMNICZI, 1988 apud BARBEZANGE e JESTIN, 2005a). Este fato foi constatado por meio de infecções experimentais realizadas com seis estirpes distintas do APMV-1, cada qual sendo submetidas a quatro passagens em galinhas. Após estas quatro passagens em série, apenas a estirpe originária de pombos apresentou aumento significativo de patogenicidade, porém sem alteração no sítio de clivagem da proteína F, possivelmente explicado pelo mecanismo de *quasispecies* (KOMMERS et al., 2003).

Em infecções experimentais realizadas em pombos com o PPMV-1, após seis passagens realizadas pelo contato de aves infectadas com aves não infectadas, observou-se o surgimento de *quasispecies*, fato comprovado pelo sequenciamento das amostras colhidas a partir de *swabs* cloacais. Ao contrário, tais variantes não apresentaram modificações no Índice de Patogenicidade Intracerebral (ICPI) nem no sítio de clivagem F₀, apenas no genótipo, sugerindo que nem sempre as variantes irão alterar a patogenicidade viral (BARBEZANGE e JESTIN, 2005a). Da mesma forma, Barbezange e Jestin, 2005b, observaram que estirpes de APMV-1 classificadas como virulentas pelas técnicas tradicionais como o IPIC, quando da avaliação por técnicas moleculares se mostrava com características no sítio de clivagem F₀ como uma estirpe avirulenta, da mesma forma quando avaliada por anticorpos monoclonais. A principal hipótese levantada pelos autores seria uma recombinação de uma amostra vacinal com uma amostra virulenta (*quasispecies*), tendo em vista que genotipicamente a estirpe viral em questão apresentava ambas as características.

A Doença de Newcastle (DN) foi descrita pela primeira vez em 1926, ocasião em que ocorreram dois surtos em locais distintos. Um dos surtos ocorreu

na Ilha de Java, na Indonésia e o outro, que deu origem ao nome da doença, em Newcastle-upon-Tyne, na Inglaterra (ALEXANDER, 1997; SEAL et al., 2000).

Três panzootias são citadas na literatura compulsada desde o primeiro isolamento do VDN, em 1926. A primeira ocorreu por volta de 1926, atingindo aves comerciais no Sudeste Asiático, Oriente Médio e Europa, principalmente na Inglaterra, enquanto que a segunda, ocorrida na década de 60, parece ter surgido no Oriente Médio, porém, nesta última, a difusão da doença foi mais intensa, atingindo todos os continentes por volta de 1973. Esta rápida disseminação da doença é atribuída à importação e ao comércio intenso de psitacídeos, provenientes do Sudeste Asiático, América Central e América do Sul. Os sérios efeitos deletérios desta segunda panzootia impulsionaram o desenvolvimento de vacinas e a implantação de legislações internacionais que regulamentaram o comércio e a produção de aves (ALEXANDER, 1997). A terceira Panzootia ocorreu no final dos anos 70, no Oriente Médio, onde foi relatada como uma doença neurotrópica, sem sinais respiratórios, observada em pombos de competição. Por volta de 1981 a doença já estava disseminada por mais de 20 países, incluindo Canadá, E.U.A., Hong Kong e parte da Europa. Nestes países, a principal forma de disseminação foi à exposição e o comércio indiscriminado de pombos (ALEXANDER et al., 1984b; ALEXANDER, 1997). Hoje se sabe que o VDN é capaz de infectar cerca de 241 espécies de pássaros, distribuídas dentro de 27 das 50 ordens aviárias (KALETA e BALDAUF, 1998; PANSHIN et al., 2002). Estirpes virais de baixa virulência estão usualmente associadas às aves aquáticas, enquanto as de alta virulência estão associadas às aves tropicais, principalmente psitacídeos. Desta forma, no grupo de aves mais susceptíveis estão os galiformes, faisões, psitacídeos, ratitas e pombos. Dentre aquelas de susceptibilidade moderada encontram-se as aves de rapina, pingüins e passeriformes e os menos susceptíveis são as aves aquáticas, gansos, corvos e pelicanos (CROSS, 1995). Em 1991 a ocorrência da DN, sob a forma velogênica e viscerotrópica foi relatada em aves silvestres (Psittaciformes, Passeriformes e Galliformes) nos estados americanos de Illinois, Nevada, Califórnia, Indiana e Texas (PANIGRAHI et al., 1993). Ainda nos Estados Unidos, em outubro de 2002, o VDN foi isolado na Califórnia, durante um surto da doença, onde mais de três milhões de aves foram sacrificadas, ocasionando um prejuízo estimado de US\$ 250 milhões (KINDE et al., 2005; KAPCZYNSKI et al., 2006).

Na África do Sul, a ocorrência de surtos esporádicos da DN desde 1993-94, tem sido a causa de inúmeros problemas na exportação de avestruzes desta região, devido a barreiras sanitárias impostas por países importadores, causando enormes prejuízos aos estruocultores (VERWOERD et al., 1999). Daí decorre que os dois grandes elos da cadeia epidemiológica da DN são, sem sombra de dúvida, as aves de vida livre e aves comerciais, sendo que o VDN circula entre estas populações aviárias. Portanto, o contato entre aves de vida livre e aves de produção é um dos principais fatores desencadeadores de surtos da DN (CAMENISCH et al., 2008). Mesmo com adoção de severas medidas sanitárias de controle de entrada e saída de aves, o tráfico de aves silvestres ainda exerce um papel importante na entrada de estirpes virulentas do VDN em áreas até então livres do agente (PANIGRAHY et al., 1993).

Em concordância, para que ocorra a manutenção do vírus em uma determinada população aviária há necessidade da existência de reservatórios e/ou disseminadores, cuja participação e identificação na patogenia da doença é pouco compreendida. Diante disso, os fatores provavelmente envolvidos na manutenção da infecção são: presença de indivíduos portadores; introdução de aves susceptíveis; multiplicidade de espécies aviárias (aves comerciais x aves silvestres); heterogenicidade de estirpes do VDN (AWAN et al., 1994). Acresce-se ainda, a capacidade de espécies de vida livre introduzir e disseminar a DN, conforme já descrito e, possivelmente, o principal fator relacionado ao surto ocorrido na Califórnia entre 1971-73 (ALEXANDER, 1997; KAPCZYNSKI et al., 2006).

Após a ocorrência de um surto da DN em uma população de Cormorões (*Phalacrocorax auritus*) habitantes da região de Saskatchewan, ilha localizada no Lago Doré (região dos grandes lagos), ao sul do Canadá, foram aventados três principais problemas relacionados à presença do vírus nesta população de aves: a mortalidade das aves silvestres; o potencial de disseminação da doença para outras populações de aves de vida livres e o potencial impacto econômico na avicultura industrial do país. Devido a tais fatores, ficou patente a necessidade de uma maior compreensão da cadeia epidemiológica da doença, para que medidas de controle mais eficientes possam ser tomadas (KUIKEN et al., 1998).

Dentre as principais vias de transmissão do VDN destaca-se o contato direto com animais doentes e/ou portadores, contaminação de alimentos e água, fômites e de pessoas. A transmissão aerógena também é de extrema importância, sendo relacionada como fator preponderante no surto da DN na Inglaterra, entre 1970-71 (HUGH-JONES et al., 2004 apud Li et al., 2008). Na Inglaterra, um lote de faisões contaminado pelo PPMV-1 foi sacrificado, tendo sido aventada a hipótese da possibilidade de que ração contaminada com fezes de pombos portadores do VDN, utilizada na alimentação de tais aves, tenha sido a fonte principal de infecção (ALEXANDER et al., 1997). Do mesmo modo, ainda na Inglaterra, um lote de aves comerciais também teria sido infectado com o VDN devido à ingestão de ração contaminada com fezes de pombos (ALEXANDER et al., 1984a). No Canadá, em 2001, um surto do PPMV-1 em aves de postura foi relacionado à ração das aves contaminada por fezes de pombos (TORO et al., 2005),

No Brasil, o primeiro surto da DN ocorreu concomitantemente em Belém do Pará e Macapá, por volta de 1953 (SANTOS et al., 1954), sendo o primeiro isolamento do VDN realizado em 1954. A entrada do agente no país foi atribuída à importação de carcaças de aves contaminadas procedentes dos EUA, para hotéis da capital paraense (CUNHA e SILVA, 1955). Após sua ocorrência na década de 50, a DN permaneceu endêmica durante muitos anos nos plantéis avícolas comerciais, todavia de forma controlada, com a ocorrência de surtos esporádicos e isolados. Contudo, na década de 70, a doença ressurgiu sob uma forma altamente patogênica, conhecida como Newcastle Viscerotrópica, por atingir com severidade as vísceras das aves infectadas. No período de 1970 a 1975 foram registrados aproximadamente 1350 focos da doença em todo o país. Durante os 20 anos seguintes, o VDN foi responsável por vários focos da doença em todo o país, porém em menor intensidade. Após alguns anos sem a ocorrência de novos casos da doença, em 2006, no Rio Grande do Sul, foi isolada uma estirpe do APMV-1 em 17 frangos destinados ao consumo familiar. Medidas de controle, entre as quais sacrifício dos animais, quarentena, barreiras sanitárias, isolamento e desinfecção da área acometida foram tomadas, restringindo desta forma a propagação do agente (FLORES et al., 2006). A redução gradual na ocorrência da enfermidade é provavelmente devido ao controle sistemático e

intensivo da DN por meio de vacinas eficientes, além da implantação pelo governo federal do PNSA – Programa Nacional de Sanidade Avícola. Porém, segundo alguns autores, a DN ainda continua endêmica no Brasil, bem como em toda a América do Sul, servindo, por isso, como fonte constante de disseminação do vírus, principalmente por meio do tráfico de aves silvestres (SEAL et al., 1998; CLAVIJO et al., 2000).

Em um levantamento da prevalência da DN, realizado em uma comunidade de aves ornamentais de cativeiro do estado do Rio de Janeiro, foi encontrada uma porcentagem de isolamento do vírus de cerca de 11,0% (COUCEIRO et al., 1990). Em outro estudo, também realizado no Rio de Janeiro, anticorpos inibidores da hemaglutinação para o VDN foram detectados em cerca de 3,2% de aves mantidas em cativeiro (BELLUCI et al., 1999).

Na cidade de São Paulo, anticorpos inibidores da hemaglutinação foram encontrados em cerca de 85,7% das amostras de soros de uma população de Irerês (*Dendrocygna viduata*), embora genoma do VDN não tenha sido detectado por meio da técnica de RT-PCR (DEMÉTRIO, 2002). No entanto, de tempos em tempos, determinadas regiões são surpreendidas pelo aparecimento de estirpes do VDN com alta capacidade de difusão, cujos surtos tem sido atribuídos às mais diferentes espécies de aves susceptíveis, causando elevados prejuízos à avicultura (ALEXANDER, 1995).

Inúmeras espécies de aves silvestres têm sido descritas como susceptíveis a infecção pelo VDN e existe a possibilidade do vírus permanecer sob forma latente nestas aves. Sob condições favoráveis, podem ocorrer mutações, as quais podem levar a formação de estirpes virulentas e, conseqüentemente, causar a doença clínica em pombos (ALEXANDER et al., 1985; MONNE et al., 2006)

A partir do momento em que aves de vida livre podem ser responsabilizadas por ser a fonte primária de introdução da doença, estudos comparativos de estirpes do VDN isoladas de aves e estirpes utilizadas no preparo de vacinas vivas tornaram-se de crucial importância (WOBESER et al., 1993; PANSHIN et al., 2002; KAPCZYNSKI et al., 2006).

A DN apresenta sinais clínicos variáveis, os quais estão intimamente relacionados à estirpe viral envolvida, à idade, ao estado de saúde e à

susceptibilidade do hospedeiro (BRUGH e BEARD, 1984; BALLAGI-PORDÁNY et al., 1996; ALEXANDER, 1997; SEAL et al., 2000; ALDOUS e ALEXANDER, 2001). Além da influência da estirpe viral envolvida, o hospedeiro é de crucial importância na disseminação do agente. Sobre esse aspecto, tem sido observado que algumas estirpes que provocam 100% de mortalidade em galinhas, ao contrário, produzem apenas doença branda em outras espécies. Tal comportamento viral interespecífico é algo que deve ser exaustivamente estudado (BEARD e BRUGH, 1975). Entretanto, estirpes provenientes de pombos que se tornaram naturalmente adaptadas a galinhas, apresentam virulência consideravelmente mais elevada (ALEXANDER, 1986). Da mesma forma, estirpes de VDN isoladas de aves aquáticas e/ou migratórias, usualmente apresentam baixa virulência para galinhas, sendo classificadas como estirpes entéricas assintomáticas. Contudo, há indícios de que tais estirpes virais possam sofrer processos de mutação e se tornarem patogênicas para galinhas (ALEXANDER, 1995; BARBEZANGE e JESTIN, 2005b).

Não existem lesões patognomônicas para qualquer uma das formas clínicas da DN. As estirpes patogênicas podem causar anorexia, apatia, dispnéia, descarga nasal e ocular, morte súbita, conjuntivite, diarreia esverdeada, ataxia, convulsões, tremores, redução do ganho de peso e da postura de ovos. Todavia, um achado sugestivo desta enfermidade é a presença de petéquias hemorrágicas na passagem do pró-ventrículo para o ventrículo. A mortalidade é variável, podendo chegar a 100% (ALEXANDER, 1997).

Para fins didáticos, as estirpes do VDN têm sido divididas em cinco grupos: velogênica viscerotrópica; velogênica neurotrópica; mesogênica; lentogênica ou vacinal; e entérica assintomática (BEARD e HANSON, 1984). Formas clínicas atípicas da DN devem ser consideradas como uma séria ameaça para a criação comercial de aves devido à possibilidade da rápida disseminação da doença, antes de seu diagnóstico conclusivo (BRUGH e BEARD, 1984).

Os columbiformes, de vasta distribuição pelo planeta, provavelmente tenham se originado na região tropical do velho mundo e, daí, migrado para as Américas, durante o período das colonizações. São aves, na maioria granívoras e frugívoras, descendo ao solo somente para se alimentarem. São excelentes

voadores; os casais formados são inseparáveis e, após a reprodução, têm a peculiaridade de se associarem em bandos (SICK, 1992).

Pombos de uma forma geral são monogâmicos, com duas a três oviposições anuais, colocando dois ovos por postura, que eclodem após 17-19 dias de incubação. Entretanto, sob alimentação em abundância, podem aumentar a sua capacidade reprodutiva para várias posturas por ano, comprovando assim que o ciclo reprodutivo é regulado pela oferta de alimento (SICK, 1992).

Os primeiros isolamentos de PPMV 1 ocorreram na Itália em 1982 (BIACIFIORI e FIORONI, 1983) e nos E.U.A. durante o ano de 1984, em um lote de pombos em Nova York (PEARSON et al., 1987; KOMMERS et al., 2001), mas existem suspeitas de que esta estirpe já tenha circulado no oriente médio, na década de 70, causando doença em pombos, ou em outras espécies de aves de vida livre (KALETA et al., 1985; BARBEZANGE e JESTIN, 2005a). Da mesma forma, na Itália, um tordo (*Erithacus rubecula*) foi encontrado morto, numa área pública de lazer. Este foi diagnosticado como positivo, por meio de isolamento viral, para uma estirpe do PPMV-1 relacionada genomicamente com uma estirpe causadora de um surto anterior da DN em pombos da Europa, comprovando desta forma a atual circulação de estirpes do PPMV-1 naquele continente (MONNE et al., 2006). Em países com grande população de Columbiformes, embora existam programas de vacinação para estas espécies aviárias, a DN ainda é considerada endêmica, (KIM et al., 2008).

Em pombos, os PPMV-1 induzem ao aparecimento de um quadro clínico caracterizado por diarreia e sinais neurológicos, porém sem lesões macroscópicas patognomônicas (BIANCIFIORI e FIORONI, 1983; ALEXANDER e PARSONS, 1986; SEAL et al., 2000; KAPCZYNSKI et al., 2006). As aves também podem apresentar consumo excessivo de água, diarreia hemorrágica, paralisia das asas, perda de acuidade visual, perda de qualidade das penas. Caso entre em convalescença, a diarreia pode persistir de forma crônica (CROSS, 1995). As lesões necroscópicas mais frequentes são perda de peso, congestão pulmonar, edema subcutâneo (TANGREDI, 1988) e a morbidade fica em torno de 10% (KALETA et al., 1985). Estirpes do PPMV-1 representam um problema atual para a indústria avícola, pois podem infectar e causar doença em poedeiras, reprodutores e pintos, porém a patogenicidade do PPMV-1 ainda não é bem compreendida (BARBEZANGE e JESTIN, 2005a). Merece ser ressaltado ainda

que o PPMV-1 representa também um grave problema relacionado à aves de vida livre, pela possível quebra de um equilíbrio ecológico. Diante disso, a compreensão da ecologia viral bem como a relação entre vírus e hospedeiro se torna de extrema importância (KIM et al., 2008).

Em oposição, são raros os levantamentos epidemiológicos realizados em populações de pombos em vida livre, seja em áreas rurais ou urbanas. Em pesquisa realizada na região do Leste Europeu, foram encontrados anticorpos inibidores da hemaglutinação em 51,4% (110/214) dos pombos estudados. Contudo, quando as amostras séricas em estudo foram submetidas ao teste de dupla difusão em gel de ágar, apenas 5,4% (6/110) de tais amostras soro-reagentes ao teste de HI apresentaram reação positiva (TUCAK, 1978 apud AWAN et al., 1994).

Em amostras de soros de pombos colhidas na região nordeste do estado de São Paulo, 4/172 (2,32%) foram positivas para a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação. Entretanto, em nenhuma das amostras obtidas de *swabs* cloacais colhidas de tais aves foi detectada genoma do VDN, pela técnica de RT-PCR (CARRASCO, 2005).

Grande parte dos relatos da DN em pombos tem ocorrido de forma simultânea aos surtos da doença em aves comerciais, fato que levanta a suspeita de que estirpes do VDN presente nos pombos teriam originado de aves comerciais e, até mesmo, que estes teriam atuado como disseminadores do agente, fato de suma importância do ponto de vista epidemiológico. Porém, na ausência da doença em aves comerciais, estirpes lentogênicas do PPMV 1 têm sido isoladas de pombos apresentando sinais respiratórios (ALEXANDER et al., 1985; UJVARI, 2003). Nesse aspecto, estudos realizados com uma estirpe viral de alta patogenicidade para galinhas (APMV-1), pombos submetidos a infecção experimental permaneceram saudáveis, apesar de eliminarem DNA viral durante vinte dias, de forma intermitente, tendo o máximo de eliminação viral ocorrido entre o 11º e 13º D.P.I. (CARRASCO et al., 2008a).

Kommers et al. (2001) diferenciou, por meio de testes *in vivo* (Índice de Patogenicidade Intracerebral – IPIC; Tempo Médio de Morte Embrionária – TMME; Índice de Patogenicidade Intravenosa – IPIV) e *in vitro*, (anticorpos monoclonais - MAbs, testes de Hemaglutinação - HA e de Inibição da hemaglutinação - HI, RT-PCR e seqüenciamento), seis estirpes do VDN isoladas

de pombos. Segundo esses autores, a passagem do PPMV-1 em ovos embrionados SPF resulta em aumento da patogenicidade do vírus para aves comerciais. Entretanto, é difícil prever a virulência de estirpes de VDN em espécies diferentes de aves (BRUGH e BEARD, 1984). Na Arábia Saudita, em um surto da DN em pombos, a estirpe isolada foi o PPMV-1, provocando doença clínica semelhante à forma neurotrópica das galinhas (ELZEIN et al., 1999). Na Argentina, seis pombos domésticos foram encontrados moribundos, apresentando sinais clínicos compatíveis aos da DN, ou seja, diarreia verde, ataxia e tremores. Após o isolamento do vírus, realização de testes de RT-PCR e seqüenciamento do vírus isolado destas aves, foi confirmada a presença do PPMV-1 (ZANETTI et al., 2001).

Em 1982, no Sudão, um surto em pombos de vida livre provocou morte súbita em algumas aves, enquanto outras apresentaram sinais clínicos da DN por período de 7 dias, até virem a óbito. A taxa de mortalidade destas aves chegou a 80% (EISA e OMER, 1984), ocorrência não usual para a doença em pombos, pois segundo alguns autores, em tal espécie aviária é comum a ocorrência de baixa mortalidade e morbidade (BIANCIFIORI e FIORONI, 1983; KALETA et al., 1985). São raras as ocorrências de sinais clínicos da DN em pombos de vida livre, devido a resistência imunológica, comum nesta espécie, cujo mecanismo ainda é desconhecido (KAPCZYNSKI et al., 2006). Portanto, a importância do pombo como disseminador, bem como possível reservatório da doença, ainda não está bem esclarecida, apesar da possibilidade dessas aves, em condições favoráveis, contaminarem alimentos (ração) e água consumida por outras aves é um fato que merece grande atenção (ALEXANDER, 1995). Avaliações realizadas na Itália, em estudo comparativo entre estirpes virais isoladas de pombos domésticos (*Columba livia*) e selvagens (*Streptopelia decaocto*), revelaram que, embora muitas vezes estas aves ocupem o mesmo habitat e nicho ecológico, podem albergar estirpes virais de linhagens distintas (TERREGINO et al., 2003). Nesse aspecto, a presença do VDN em populações de pombos, sejam eles domésticos ou selvagens, podem proporcionar um acréscimo na virulência das estirpes circulantes, até o momento que tais estirpes entrem em contato com aves comerciais, dando início a surtos da doença. Desta forma, medidas de controle, como o desenvolvimento de programas de vacinação e o monitoramento de aves de vida livre, se tornam imprescindíveis (KIM et al., 2008).

A principal medida profilática para o controle da DN é a vacinação. As vacinas mais utilizadas são preparadas com estirpes virais lentogênicas, embora vacinas produzidas com vírus inativado, principalmente em excipiente oleoso, também têm sido utilizadas, principalmente em aves de reprodução e de postura comercial (REHMANI, 1996). Uma grande desvantagem da utilização destas vacinas usuais é que fica impossível a diferenciação por provas sorológicas de animais vacinados de animais infectados. Desse modo, a produção de vacinas recombinantes, expressando as proteínas NH e F se apresenta com resultados promissores, gerando em mais de 80% das aves imunizadas uma proteção eficaz contra a apresentação clínica da doença (LEE et al., 2008). Apesar de a vacinação ser intensivamente utilizada na rotina, surtos da DN continuam a ser observados e o objetivo da vacinação a ser alcançado é de induzir uma imunidade protetora, aliada ao mínimo de efeito adverso na ave. Acresce-se ainda que, em um programa de vacinação contra a DN, os resultados esperados são a redução da mortalidade e das manifestações clínicas da doença, bem como lesões geradas nas aves. Mesmo após a vacinação, eliminação viral ainda ocorre, contudo a redução significativa da mesma obtida com a imunização é de extrema valia no controle da disseminação da enfermidade (KAPCZYNSKI e KING, 2005; LEE et al., 2008).

Muitos fatores influenciam o sucesso de um programa de vacinação, entre os quais, a eficácia da estirpe vacinal escolhida; efeitos inibitórios da imunidade materna residual; condição geral da ave; situação da doença na região a ser vacinada (presença ou não de desafio); o tipo de ave produzida (corte ou postura); presença de outros agentes patogênicos; tamanho dos lotes de aves; efeitos adversos de um programa de vacinação (estresse, reações secundária pós-vacinais, queda da produção de ovos); histórico e o custo de vacinação (REHMANI, 1996; ALEXANDER, 1997; GALLILI e BEN-NATHAN, 1998). A questão da imunidade materna residual tem grande importância a partir do momento em que aves jovens são vacinadas com vacinas vivas e esta imunidade materna poderá interferir na vacinação, resultando em uma baixa taxa de proteção, sugerindo desta forma que aves jovens são mais susceptíveis à infecção, bem por possíveis participantes como disseminadores virais

(KAPCZYNSKI e KING, 2005; JEON et al., 2008). A ocorrência constante de surtos de DN em populações de aves vacinadas reafirma a necessidade mundial de pesquisas e desenvolvimento em vacinas eficazes, principalmente contra estirpes virais emergentes de alta patogenicidade (KAPCZYNSKI e KING, 2005).

Consoante revela Alexander, 1995, na escolha do tipo de vacina a ser usada existem três premissas que devem ser observadas: a imunogenicidade da vacina, o tipo da vacina (inativada e/ou viva), a virulência, no caso de vacinas vivas, não apenas para o hospedeiro, mas também para outras espécies aviárias que possam estar entrando em contato com a estirpe vacinal. Dentro deste contexto, as estirpes vacinais mais utilizadas são: H, F, Mukteswar, Komarov, Roakin, Hitchner B1, Ulster e LaSota (ALEXANDER, 1997), sendo as três últimas as mais utilizadas no Brasil. Existem estudos nos quais aves imunizadas com a estirpe LaSota se tornaram protegidas contra qualquer estirpe virulenta do VDN, independente do genótipo da mesma. Contudo, embora nenhuma ave tenha ficado doente durante o experimento, a vacina foi incapaz de impedir a eliminação viral (JEON et al., 2008). No mesmo direcionamento, Kapczynski e King, 2005, observaram menores níveis de eliminação viral em galinhas que receberam vacinas vivas, quando comparadas àquelas que receberam vacinas inativadas, possivelmente em decorrência da indução de imunidade em nível de mucosas. Este tipo de imunidade, também constitui uma importante barreira para a entrada do VDN. Avaliando-se que as mucosas são os sítios iniciais de replicação do VDN, a indução de uma resposta imune local, com conseqüente produção de anticorpos da classe IgA, é capaz de proteger as aves de uma infecção sistêmica e esta resposta local é alcançada com a utilização de vacinas vivas administradas via ocular ou oral (TAKADA e KIDA, 1996). Recentemente, na Austrália, aves criadas soltas em áreas peri-domiciliares, submetidas a diferentes procedimentos de vacinação, apresentaram melhor soro-conversão e conseqüentemente, melhor proteção ao desafio, quando imunizadas pela via ocular (THEKISOE et al., 2004).

Existe, portanto, uma correspondência entre altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação e a resistência da ave ao desafio, frente a uma estirpe virulenta do VDN, apesar de que baixos títulos não necessariamente indiquem ausência de proteção. Desta forma, em valores médios, os anticorpos inibidores da hemaglutinação guardaram correspondência com os valores de

proteção ao desafio (OWOLODUN e AJYBOIE, 1975; MONTENEGRO et al., 1978; RICHTZENHAIN, 1988; THEKISOE et al., 2004; KAPCZYNSKI e KING, 2005; CARRASCO et al., 2009). Altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação podem produzir proteção de até seis meses (OWOLODUN e AJYBOIE, 1975). Da mesma forma, aves com baixos níveis de anticorpos podem continuar susceptíveis à infecção, o que explica o fato de estirpes virulentas do VDN serem isoladas de locais onde programas de vacinação são empregados rotineiramente, já que nem sempre todas as aves respondem à um programa de vacinação da mesma forma. (JEON et al., 2008). Na Coreia, embora um intensivo programa de vacinação seja aplicado, surtos da DN têm ocorrido periodicamente naquele país, o que coloca em dúvida a eficácia da vacina contra determinadas estirpes virais (CHO et al., 2008).

Em estudo realizado em galinhas, um grupo de aves imunizadas com vacinas vivas preparadas com a estirpe LaSota, foram colocadas em contato com aves SPF. Três semanas após, as aves SPF em contato apresentaram sor conversão suficiente para protegê-las frente ao desafio realizado com uma estirpe patogênica do VDN (OWOLODUN e AJYBOIE, 1975). Da mesma forma, pombos domésticos (*Columba livia*) imunizados com vacinas anti VND pela via ocular (LaSota e Ulster) e, posteriormente colocados com pombos (sentinelas) ausentes de anticorpos anti-NDV, ao final do experimento, tanto as aves vacinadas, assim como as sentinelas apresentaram níveis de anticorpos estatisticamente semelhantes, para ambas estirpes vacinais observadas (CARRASCO, 2005; CARRASCO et al., 2009). Em experimento conduzido para avaliação da eficácia vacinal em pombos, Kapczynski et al., 2006, observaram que a concentração antigênica da vacina bem como o número de doses aplicadas não resultaram em diferenças na proteção induzida, uma vez que tenha ocorrido o estímulo ao sistema imune. Ainda segundo relatam esses autores, mesmo com a ocorrência de altos níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação, a vacinação não foi suficiente para impedir a eliminação viral após infecção experimental, sendo que a mesma permaneceu até o 4º D.P.I., contudo as aves não apresentaram nenhum sinal clínico compatível com a DN (KAPCZYNSKI et al., 2006).

Dentro do contexto da compreensão da patogenia da DN está inclusa a infecção experimental (IE), método pelo qual é avaliada, de maneira controlada, a resposta da ave quando submetida a um vírus patogênico (KAPCZYNSKI et al., 2006). Com exceção de aves comerciais, pouco é conhecido sobre a transmissão e o comportamento do VDN frente às demais espécies aviárias, particularmente as de vida livre, fato que é de extrema importância devido a facilidade de contato com que tais aves possam ter com aves de exploração comercial. Sob esse aspecto, a IE, realizada sob condições extremamente controladas, fazendo o uso de estirpes virulentas, pode trazer informações de extremo valor sobre a resposta imune das aves, bem como mecanismos de manutenção e disseminação da enfermidade dentro de uma população (BEARD e BRUGH, 1975). Portanto, por meio de IE é possível esclarecer, por exemplo, questões sobre a susceptibilidade de uma espécie aviária frente a uma determinada estirpe viral, o tempo de duração de uma possível infecção, a eliminação viral, bem como a resposta imune da espécie em estudo (VICKERS e HANSON, 1980).

Pássaros Preto (*Agelaius phoeniceus*) experimentalmente infectados com estirpes do VDN patogênicas para galinhas (*Gallus domesticus*) apresentaram soro-conversão eficiente, mensurada pela técnica de HI. Também ficou demonstrado, por meio de isolamento viral, a eliminação do VDN pela traquéia a partir do 2º DPI até o 8º DPI, sem, contudo ter havido mortalidade das aves, mas apenas sinais respiratórios brandos (VICKERS e HANSON, 1980). Da mesma forma, IE realizadas em aves silvestres, no que diz respeito à eliminação viral, revelaram que papagaios podem eliminar o VDN por até um ano; periquitos até o 137º DPI e mainás até o 161º DPI, todavia, canários são refratários ao vírus não apresentando qualquer sinal clínico da enfermidade, bem como uma curta eliminação viral, durando apenas 12 dias (ERICKSON et al., 1978).

Patos e gansos geralmente são considerados resistentes a algumas estirpes do VDN, que usualmente são virulentas para galinhas. Objetivando avaliar a capacidade patogênica do VDN em gansos, lotes destas aves foram experimentalmente infectadas e colocadas em contato com galinhas não imunizadas. Dos gansos inoculados, 75% vieram a óbito e 100% das galinhas colocadas em contato, se infectaram e posteriormente também vieram à óbito,

sendo que destas galinhas o VDN foi isolado do baço, fígado, rins; timo, pulmão, proventrículo e intestino (WAN et al., 2004).

Além dos fatores relacionados à espécie aviária e estirpe viral envolvida, existe a relação de linhagens de aves, com a susceptibilidade ao VDN. Estudo realizado com o objetivo de avaliar a resistência de diferentes linhagens de perus ao VDN revelou que algumas linhagens são mais resistentes ao desafio que outras, quando utilizadas estirpes virais provenientes de galinhas (TSAI et al., 1992).

Em estudo realizado em galinhas inoculadas com o PPMV-1, os sinais clínicos apresentados variaram conforme a via de inoculação utilizada. Assim, aves de um dia de idade, inoculadas pela via intracerebral apresentaram 100% de mortalidade, enquanto àquelas inoculadas por via intra-traqueal, apresentaram sinais clínicos, seguidos de morte. Lotes de aves com 14 dias de idade, também inoculadas pela via traqueal, ficaram doentes, porém se recuperaram. Todas as aves previamente imunizadas com vacinas comerciais resistiram ao desafio frente a esta estirpe viral, o que comprova uma proteção cruzada entre o APMV-1 e o PPMV-1 (GELB et al., 1987).

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

Pombos experimentalmente infectados, por diferentes vias, com a estirpe PPMV-1 eliminaram o VDN a partir do 6º DPI mantendo a eliminação viral até o 31º DPI. Entretanto, nenhuma ave inoculada por via intranasal veio a óbito, o que não aconteceu com aves inoculadas por via intravenosa, que morreram no 6º DPI (ALEXANDER et al., 1984). Da mesma forma, em estudo de avaliação do comportamento de pombos (*Columba livia*) frente à estirpe do VDN responsável pelo surto ocorrida na Califórnia (APMV-1), em 2002, as aves apresentaram uma baixa morbidade e mortalidade. (KAPCZYNSKI et al., 2006). Segundo relata este mesmo autor, embora não seja possível estimar a dose viral que a ave entra em

contato em um surto de ocorrência natural da enfermidade, a dose ministrada em IE é muito maior que àquela recebida durante a exposição natural ao agente (KAPCZYNSKI et al., 2006).

Pombos jovens e adultos experimentalmente infectados pela via ocular, eliminaram VDN pelas vias orais e cloacais, a partir do 3º DPI. No caso dos pombos jovens a eliminação viral persistiu até o 21º DPI, enquanto nos adultos não ultrapassou o 7º DPI (ERICKSON et al., 1980), fato semelhante também apresentado por Kapczynski et al., 2006. Em estudo experimental realizado em pombos adultos, com uma estirpe viral de alta patogenicidade para galinhas, responsável por surtos na década de 70 no Brasil (Amostra São João do Meriti), as aves permaneceram clinicamente saudáveis durante todo o experimento, mas capazes de infectar aves sentinelas conviventes, cinco dias após a infecção (CARRASCO et al., 2008a).

Apesar da ocorrência de vários surtos da DN em pombos e galinhas, estudos que relacionem estas duas espécies, no que diz respeito à transmissibilidade do agente, ao aparecimento de sinais clínicos, bem como avaliem a eliminação viral são escassos (ALEXANDER e PARSONS, 1984). Segundo esses autores, em nenhum dos países onde ocorreram epidemias do Paramyxovírus Aviário Tipo 1 em pombos de competição, foram realizados estudos que relacionem a disseminação deste agente para aves de produção (ALEXANDER e PARSONS, 1984).

O objetivo do diagnóstico da DN é nortear as decisões a serem tomadas para o controle da doença e, desse modo, evitar a disseminação da doença (ALEXANDER, 1997). Portanto, um diagnóstico confiável, seguro e de fácil realização deve ser considerado, pois quanto mais rápido for realizado, mais eficazes serão as medidas de controle da doença a serem postas em execução, evitando-se assim, maiores perdas e a disseminação da enfermidade (KHO et al., 2000).

Como já mencionado, nenhum dos sinais clínicos da DN pode ser considerado como patognomônico da doença, tornando ainda mais complexo o diagnóstico, tendo em vista a grande diversidade de estirpes de VDN e de espécies hospedeiras, razão da necessidade e importância do diagnóstico laboratorial conclusivo. Diante disso, antes do advento da biologia molecular, os

métodos mais seguros para o diagnóstico da DN eram o isolamento viral, em ovos embrionados ou em cultivo de células, seguido de posterior caracterização do vírus, usualmente por meio das reações de HA e HI, IPIC; TMME; IPIV (ALEXANDER, 1997).

O sorodiagnóstico, usualmente realizado por meio das reações de HI, vírus neutralização (VN) e ensaio imunoenzimático (ELISA), são os procedimentos de diagnóstico mais amplamente utilizado para a detecção e mensuração de anticorpos anti-VDN. Dentre tais testes, o de HI têm por princípio a detecção da presença de anticorpos anti glicoproteína e neuraminidase virais; a HN, que tem a função de hemaglutinação e de neuraminidase, respectivamente, é considerado internacionalmente o teste de referência para o diagnóstico indireto da DN (KOUWENHOVEN, 1993; RICHTZENHAIN et al., 1993; ALEXANDER, 1997; KHO et al., 2000; O.I.E., 2004).

Tais testes, quando utilizados com o objetivo de detectar anticorpos anti-VDN decorrentes de infecção, somente têm valor diagnóstico quando aplicados em aves não submetidas a programas de vacinação ou com a realização de testes com amostras de soros pareados, colhidas com intervalos de pelo menos, 14 dias. Nos testes de HI, soros de galinha raramente apresentam reações falso-positivo, devido à ausência de inibidores inespecíficos da hemaglutinação, não havendo, portanto, necessidade de tratamento prévio dos soros a serem examinados. Porém, em soros de outras espécies aviárias é comum a ocorrência de hemaglutinação natural das hemácias de galinhas, mas que usualmente é contornado por meio da inativação do soro a 56°C por 30 minutos e/ou, através da adsorção prévia do soro com hemácias de galinha ou ainda com o tratamento da amostra com Caolin (HOVI, 1978; ANDERS et al., 1990; CARRASCO et al., 2008b)

As estirpes de VDN fazem parte de um único grupo viral antigenicamente homogêneo; entretanto, quando utilizados anticorpos monoclonais (MAbs), discretas variações antigênicas têm sido observadas. As proteínas NH e F são os principais antígenos relacionados à proteção e estes antígenos que são mapeados pelos MAbs (CHO et al., 2008). Contudo, para efeito de proteção vacinal das aves, apenas um sorotipo é considerado (KOUWENHOVEN, 1993; ALDOUS e ALEXANDER, 2001). Ademais, anticorpos contra proteínas estruturais do VDN podem ser encontrados em aves que ser

recuperaram de uma infecção, bem como em aves que foram submetidas a um processo de vacinação (PANSWIN et al., 2002).

O isolamento viral pode ser realizado através da inoculação de material clínico, usualmente, secreção oral e/ou traqueal, excreções cloacais, ou ainda, quando de animais mortos ou sacrificados, fragmentos de traquéia, pulmões, cérebro, fígado e baço. Uma vez procedido o isolamento, deve ser feita a caracterização da amostra. Para tanto, são realizados testes *in vivo*, quais sejam, IPIC, TMME e o IPIV. Todavia, o processo de isolamento viral e posterior determinação do IPIC é extremamente laborioso, caro, demorado, sendo que algumas amostras necessitam de seis passagens em ovos embrionados, além de serem eticamente condenados (KANT et al., 1997; NANTHAKUMAR et al., 2000; ALDOUS et al., 2001; ALDOUS e ALEXANDER, 2001; CREELAN et al., 2002).

A partir de 1991, quando a Reação em Cadeia pela Polimerase - Pós Transcrição Reversa do RNA (RT-PCR – do Inglês – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) foi primeiramente utilizada no diagnóstico de material genético do VDN (JESTIN, V. e JESTIN, A., 1991), este procedimento tem sido reproduzido, aperfeiçoado e amplamente utilizado na rotina laboratorial (CAVANAGH, 2001). Com isso, a PCR vem sendo amplamente utilizada como nova ferramenta de diagnóstico para um grande número de viroses de interesse veterinário (KHO et al., 2000). No Manual de Padronização de Testes Diagnósticos e Vacinas, publicado em 2000 pela OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (O.I.E), a PCR passou a ser aceita e considerada o método padrão de diagnóstico para a DN. Neste caso, são avaliadas as características do padrão dos aminoácidos presentes na região de clivagem da proteína F₀ (CREELAN et al., 2002).

A RT-PCR permite uma amplificação seletiva de um pedaço do material genético. Essa técnica tem sido muito utilizada no diagnóstico de doenças genéticas humanas, devido à sua capacidade em detectar mudanças passíveis de ocorrer em um segmento específico do genoma (JESTIN, V. e JESTIN, A., 1991). Estes avanços biotecnológicos e o melhor entendimento da patogenicidade do VDN, têm permitido o uso de procedimentos alternativos aos ensaios realizados *in vivo* para a caracterização de estirpes, bem como da virulência do VDN (ALDOUS et al., 2001).

Com isso, tornou-se possível responder utilizando apenas um teste molecular, a três importantes questões: presença ou ausência do vírus; determinação da patogenicidade, em face da existência de uma grande correlação entre a biologia molecular e os índices dos testes *in vivo* e utilização dos dados encontrados em estudos de epidemiologia molecular (ALDOUS e ALEXANDER, 2001).

Sendo o VDN um RNA vírus, a RT-PCR é o ponto de partida para a maioria das técnicas moleculares a serem utilizadas para diferenciação de suas estirpes. Por meio da transcrição reversa, o RNA viral passa a DNA complementar (cDNA), que pode ser utilizado na PCR. Posteriormente, associado a outras técnicas moleculares tais técnicas permitem uma completa caracterização da estirpe viral, como por exemplo, o seqüenciamento do genoma viral (ALDOUS e ALEXANDER, 2001).

A identificação de estirpes virais tem uma importância muito grande no diagnóstico da doença, principalmente em países onde diferentes tipos de vacinas vivas são utilizadas (BALLAGI-PORDÁNY et al., 1996). Como procedimentos alternativos, tomam-se como exemplos o seqüenciamento do sítio de clivagem Fo, devida à correlação da patogenicidade e a presença de certos aminoácidos (Arginina e Lisina) neste sítio (TOYODA et al., 1989; JESTIN, V. e JESTIN, A., 1991; YANG et al., 1999; ALDOUS e ALEXANDER, 2001; KE et al., 2001; KOMMERS et al., 2001; YU et al., 2001); amplificação de locais característicos no genoma viral de estirpes virulentas por meio da RT-PCR (KANT et al., 1997; KING e SEAL, 1997; ZANETTI et al., 2001); análises com enzimas de restrição (BALLAGI-PORDÁNY et al., 1996; NANTHAKUMAR et al., 2000), e a hibridização por meio de sondas moleculares (OBERDÖRFER e WERNER, 1998). Contudo, ainda existem controvérsias com relação a viabilidade e utilização da técnica de PCR em tempo real (*Real Time PCR*) para a detecção do VDN, sendo que esta apresentou resultados inferiores ao isolamento viral (KAPCZYNSKI et al., 2006).

Consoante revelam Aldous e Alexander (2001), em artigo de revisão sobre técnicas moleculares utilizadas no diagnóstico do VDN, apesar da ocorrência de mutações rondonômicas espontâneas e da existência de uma grande variabilidade genética, as técnicas moleculares certamente serão dominantes para a detecção, diferenciação e caracterização do VDN. Enfatizam

ainda que, os problemas decorrentes da variabilidade genética e mutações, poderão ser solucionados por meio da utilização de *primers* e sondas altamente específicos.

Estudos prévios comprovaram que a amplificação do VDN, utilizando o par de *primers* previamente publicado por Toyoda et al. (1989), ocorre independentemente da estirpe, da patogenicidade e da espécie hospedeira infectada (OBERDÖRFER e WERNER, 1998). Assim sendo, a RT-PCR se constitui em um método útil a ser utilizado no diagnóstico da DN (KANT et al., 1997; SOARES, 2002; CARRASCO et al., 2008a; CARRASCO et al., 2009), tendo em vista que em alguns casos o diagnóstico pode ser dado em 24-36 horas. Desta forma, permite a rápida adoção de medidas de controle, reduzindo as perdas econômicas, bem com promovendo um acréscimo no bem estar dos animais mantidos em quarentena (CREELAN et al., 2002). Contudo, estudos recentes demonstraram que o Nested RT-PCR é cerca de 100 vezes mais sensível que a RT-PCR, embora tenha o inconveniente de aumentar o risco de contaminação da amostra (KHO et al., 2000; ALDOUS e ALEXANDER, 2001). Além do risco de contaminação, outro fator que pode dificultar o diagnóstico molecular é a possibilidade da presença de agentes inibidores da PCR em amostras fecais, as quais contribuiriam para a ocorrência de reações falso-negativas. Contudo, devido ao fato do VDN infectar uma grande quantidade de tecidos, a escolha de *swabs* traqueais e/ou cloacais acaba sendo a melhor opção de amostra para um diagnóstico (CREELAN et al., 2002).

3 OBJETIVOS

Tendo em vista a escassez de informações no Brasil a respeito da DN em pombos e o fato de, quando infectada com o VDN tal espécie aviária ter condições de albergar o VDN por considerável espaço de tempo, contudo sem manifestação de sinais clínicos da doença, o que a torna importante do ponto de vista epidemiológico, foi que se delineou o presente estudo, que tem como objetivos:

➤ Estudar mais detalhadamente o comportamento de pombos domésticos (*Columba lívia*) e galinhas (*Gallus gallus*) submetidos à infecção experimental direta, assim como por contato com galinhas e/ou pombos com uma estirpe do VDN de alta patogenicidade para galinhas;

➤ Estabelecer um modelo experimental de estudo, objetivando avaliar o comportamento de galinhas imunes e não imunes ao VDN, quando em contato com pombos previamente infectados (“portador”), ou seja, na fase de eliminação de VDN, com o propósito de obter informações mais detalhadas acerca da transmissibilidade do agente para galinhas;

➤ Avaliar a resposta imune de pombos quando submetidos a um esquema de imunização realizado com vacinas vivas preparadas com estirpe de baixa patogenicidade do VDN (LaSota) amplamente utilizada na imunização de poedeiras e frangos comerciais, com o propósito de averiguar a performance destas aves (pombos), no tocante à resposta imune humoral e à eliminação do RNA viral, quando infectadas com estirpe de alta patogenicidade para galinhas;

➤ Avaliar, por meio da técnica de RT-PCR, a cinética de eliminação viral em pombos e galinhas vacinadas e não vacinadas contra a DN;

➤ Detectar, por meio da RT-PCR, a presença de RNA do VDN em órgãos (baço, fígado, pulmão e traquéia) das aves (pombos e galinhas) experimentalmente infectadas;

➤ Avaliar a eficácia da RT-PCR como método de estudo na detecção do VDN em amostras de *swabs* cloacais, desenvolvendo *primers* específicos, capazes de diferenciar o RNA das estirpes de baixa (LaSota) e alta patogenicidade (São João do Meriti), utilizadas na presente investigação;

➤ Padronizar a reação de fixação de complemento (RFC), micro técnica em placas com pequeno consumo de reagentes, técnica 50% de hemólise, no sentido de averiguar o comportamento do soro de pombos em fixar complemento de cobaio, com vista a viabilidade desta técnica como método alternativo de detecção de anticorpos anti-VDN em soros de pombos;

➤ Avaliar comparativamente os resultados obtidos nas reações de Inibição da Hemaglutinação (HI) e FC, no sentido de aquilatar a cinética de duração de anticorpos inibidores da hemaglutinação e fixadores do complemento em pombos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aves Experimentais e Manejo

Para a realização dos modelos experimentais, foram utilizados 55 pombos (*Columba livia*) de vida livre, adultos, clinicamente saudáveis e com a ausência de níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação específicos (Títulos de HI \leq 2). Além dos pombos, foram utilizadas 33 aves, (*Gallus domesticus*), machos, de uma linhagem comercial de postura, SPF (*Specific pathogen free*), mantidos em isolamento, até o momento de início dos modelos experimentais.

Os pombos, procedentes da região de Ribeirão Preto, S.P, foram capturados por meio de armadilhas e, logo após, individualmente identificados. Posteriormente, foram submetidos a um período de adaptação de 60 dias às novas condições ambientais de cativeiro, para que fosse descartada a influência do estresse na resposta imune destes animais. Neste período de adaptação, as aves foram mantidas em gaiolas coletivas, com o fornecimento de ração comercial* e água *ad libidum*, até o início dos modelos experimentais.

Posteriormente, em condições laboratoriais, foi realizada a colheita de sangue, para obtenção do soro para pesquisa de anticorpos anti-VDN, pela Reação de Hemaglutinação e Inibição da Hemaglutinação (HA/HI). O teste de HI foi utilizado como técnica para separação das aves em grupos, que foram utilizadas nos modelos experimentais, avaliando assim a presença de anticorpos anti-VDN e conseqüentemente, a viabilidade de utilização das mesmas nos modelos, tendo em vista que nossas aves devem estar livres de anticorpos anti-VDN. Nenhum dos pombos capturados em vida livre, bem como nenhuma ave SPF era soro-reagente contra o VDN, possibilitando assim, o início da realização das Infecções Experimentais.

Todos os procedimentos com animais foram delineados de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, além da aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas, da Univesridade de São Paulo.

No momento da realização dos modelos experimentais, as aves foram dispostas em dentro de Isoladores Semi Rígidos de Pressão Negativa - Alesco®, seguindo regras e padrões internacionais de biossegurança.

As aves pertencentes aos grupos controle dos quatro modelos experimentais foram inoculadas com solução tampão estéril (PBS pH 7,2) e vacinadas com a estirpe vacinal LaSota, segundo o modelo experimental envolvido. A seguir, tais aves controle, foram mantidas, em gaiolas distintas e em local separado das aves experimentalmente infectadas, porém sendo submetidas ao mesmo manejo experimental. Assim, no modelo experimental 01, tanto os pombos quanto as galinhas foram inoculados com PBS pH 7,2, no D0 do experimento. No modelo experimental 02, o grupo controle foi constituído de 5 pombos vacinados (D0 e 35º DE) e 2 galinhas não vacinadas e não inoculadas com solução tampão. No modelo experimental 03, três galinhas foram vacinadas (D0 e 21º DE), enquanto os pombos e as galinhas restantes deste grupo foram inoculados com solução tampão. No modelo experimental 04, os pombos e galinhas foram vacinados (D0 e 35º DE; D0 e 21º DE, respectivamente) e as duas galinhas remanescentes foram inoculadas com solução tampão.

Os modelos, com seus respectivos cronogramas de execução, estão dispostos nas tabelas a seguir:

MODELO EXPERIMENTAL 01 – 10 Pombos e 05 Galinhas
GRUPO CONTROLE: 5 Pombos e 2 Galinhas SPF

DIA EXPERIMENTAL	PROCEDIMENTO
D 0 (ZERO)	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL / INOCULAÇÃO - SÃO JOÃO DO MERITI (0,2 ML -10 ⁹ DL ₅₀)
D 1 AO D 14	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 15	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 16 AO D 27	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 28	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 29 AO D 40	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 41	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 42 AO D 55	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 56 (EUTANÁSIA)	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ ÓRGÃOS (TRAQUÉIA/ PULMÃO/ FÍGADO/ BAÇO)

MODELO EXPERIMENTAL 02 – 10 Pombos e 05 Galinhas
GRUPO CONTROLE: 5 Pombos Vacinados; 2 Galinhas SPF

DIA EXPERIMENTAL	PROCEDIMENTO
D 0 (ZERO)	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ VACINAÇÃO OCULAR – LA SOTA **APENAS OS POMBOS**
D 35	COLHEITA DE SANGUE / 2ª DOSE DA VACINA LA SOTA **APENAS OS POMBOS**
D 61	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ INOCULAÇÃO - SÃO JOÃO DO MERITI (0,2 ML -10 ⁹ DL ₅₀) **APENAS OS POMBOS**
D 62 AO D 65	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 66	ADIÇÃO DAS GALINHAS SPF
D 67 AO D 84	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 85	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 86 AO D 98	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 99	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 100 AO D 112	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 113	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 114 AO D 127	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 128 (EUTANÁSIA)	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ ÓRGÃOS (TRAQUÉIA/ PULMÃO/ FÍGADO/ BAÇO)

MODELO EXPERIMENTAL 03 – 10 Pombos e 5 Galinhas
CONTROLE: 5 Pombos; 3 Galinhas vacinadas; 2 Galinhas SPF

DIA EXPERIMENTAL	PROCEDIMENTO
D 0 (ZERO)	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ VACINAÇÃO OCULAR – LA SOTA **APENAS 03 GALINHAS**
D 21	COLHEITA DE SANGUE / 2ª DOSE DA VACINA LA SOTA **APENAS 03 GALINHAS**
D 40	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ INOCULAÇÃO - SÃO JOÃO DO MERITI (0,2 ML -10 ⁹ DL ₅₀) **APENAS OS POMBOS (10)**
D 41 AO D 44	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 45	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL /ADIÇÃO DAS GALINHAS VACINADAS (03) E DAS GALINHAS SPF (02)
D 46 AO D 54	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 55	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 56 AO D 67	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 68	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 67 AO D 80	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 81	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 82 AO D 95	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 96 (EUTANÁSIA)	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ ÓRGÃOS (TRAQUÉIA/ PULMÃO/ FÍGADO/ BAÇO)

MODELO EXPERIMENTAL 04 – 8 Pombos e 5 Galinhas
CONTROLE: 5 pombos Vacinados; 2 Galinhas Vacinadas; 2 Galinhas SPF

DIA EXPERIMENTAL	PROCEDIMENTO
D 0 (ZERO)	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ VACINAÇÃO OCULAR – LA SOTA **APENAS 03 GALINHAS**
D 21	COLHEITA DE SANGUE / 2ª DOSE DA VACINA LA SOTA **APENAS 03 GALINHAS**
D 40	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ INOCULAÇÃO - SÃO JOÃO DO MERITI (0,2 ML -10 ⁹ DL ₅₀) **APENAS AS GALINHAS VACINADAS**
D 41 AO D 44	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 45	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL /ADIÇÃO DAS GALINHAS SPF (02) E DOS POMBOS (05)
D 46 AO D 54	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 55	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 56 AO D 67	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 68	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 67 AO D 80	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 81	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL
D 82 AO D 95	COLHEITA DE SWAB CLOACAL
D 96 (EUTANÁSIA)	COLHEITA DE SANGUE / SWAB CLOACAL/ ÓRGÃOS (TRAQUÉIA/ PULMÃO/ FÍGADO/ BAÇO)

Para possibilitar a avaliação da Resposta Imune Humoral (RIH), em todos os modelos experimentais foi realizada a colheita de sangue, consoante ao protocolo anteriormente citado. A colheita foi realizada nas aves (pombos e galinhas) por punção da veia braquial, a qual foi realizada com agulha (0,45 x 13 – 26G) e seringa de 3 mL. O sangue colhido foi acondicionado em tubos de ensaio de vidro, identificados e mantidos à temperatura ambiente por cerca de duas horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 800 x g durante 10 minutos. O soro foi então separado do sangue total, inativado em banho-maria a 56°C durante 30 minutos e armazenados à temperatura de – 20°C em microtubos plásticos estéreis, até o momento de uso.

Ao fim do experimento, após a última colheita de sangue e *swab*, todas as aves pertencentes aos quatro modelos experimentais foram eutanasiadas utilizando-se injeção de 0,2 mL de Lidocaína 2%, aplicada na cavidade do forame magno, ocorrendo morte instantânea. Imediatamente após a morte, foram realizados os procedimentos de necropsia, bem como a colheita de amostras (baço, fígado, pulmão e traquéia), as quais foram dispostas em frascos identificados e armazenadas à temperatura de –70°C.

4.2 Produção de Antígenos

Objetivando a utilização de massa antigênica com altos títulos, para a utilização na Reação de Fixação de Complemento (RFC) e na Inibição da Hemaglutinação (HI), amostra vacinal La Sota foi propagada em ovos embrionados de galinha SPF de 9 a 11 dias de incubação.

Foram utilizados ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free*), incubados à temperatura de 37.5 °C e umidade de 55%. Os ovos foram adquiridos com zero dia de idade, incubados até atingirem 9-11 dias de desenvolvimento, momento no qual foi realizada a inoculação do antígeno vacinal. A inoculação foi realizada injetando 0,1 mL do inóculo diretamente na cavidade alantóide, sendo este previamente tratado com uma solução de 5% de antibióticos e antifúngicos (GIBCO, 10000 µl/ ml de estreptomicina, 10000 U/ml de penicilina e 25 µl/ml de anfotericina), no ponto de inoculação previamente demarcado com o auxílio de um ovoscópio. Os ovos que morreram nas primeiras 48 horas foram descartados. Os ovos contendo embriões mortos, passadas 48 horas da inoculação, e todos aqueles que permanecerem vivos até o período final de incubação (5 dias), foram resfriados a 4°C por no mínimo 8 horas, para se obter uma constrição dos vasos, e o líquido alantóide foi colhido em tubos plásticos do tipo “falcon” de 15 mL. Para a realização do procedimento de colheita, realizou -se a assepsia do ovo com gaze e álcool 70%, e, em seguida, com o auxílio de uma tesoura estéril, foi aberto um orifício na casca do ovo. Com uma pinça cirúrgica também estéril, a membrana cório-alantóica foi rompida, permitindo o acesso ao líquido cório-alantóide. As amostras foram clarificadas por centrifugação a 3000 x g durante 10 minutos e mantidas congeladas até a realização do teste de HA para avaliação da sua atividade hemaglutinante.

Todos os ovos utilizados no experimento foram gentilmente cedidos pela Hy-Line do Brasil

4.3 Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)

O vírus da doença de Newcastle (NDV) possui atividade hemaglutinante, devido à presença da glicoproteína HN, responsável pela sua adesão aos receptores de membrana da célula. Utilizando-se a reação de HA foi

possível quantificar a presença de atividade hemaglutinante no líquido alantóide colhido, correlacionando assim com a presença do vírus e, conseqüentemente, determinar a concentração viral do mesmo, a ser utilizada nos testes de Reação de Fixação de Complemento (RFC) e Reação de Fixação de Complemento (RFC).

O sangue utilizado na padronização suspensão de eritrócitos de galinhas foi coletado de aves através da punção da veia braquial, com uma agulha 0,45 x 13 e seringa de 10 ml já contendo 5 ml de Anticoagulante de Alsever. A solução (hemácias + anticoagulante) foi filtrada com um auxílio de funil e algodão; o filtrado obtido foi lavado com solução salina tamponada com fosfatos, PBS pH 7,2 (Phosphate Buffer Saline- 0.01 M PO₄ = 0.14 M NaCl) e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado novamente com PBS pH 7,2. Este processo foi repetido por três vezes. O sedimento de hemácias resultante foi diluído a 1% em PBS pH 7.2 (0,5 ml de sangue + 50 ml de tampão). Desta solução, 0,5 ml foi lisado em 4,5 ml de água destilada, para possibilitar a leitura a 545 nm em espectrofotômetro. A densidade óptica desejada estava entre 0.33 e 0.35. Essa solução foi colocada sob refrigeração até o momento de uso na reação de HA.

A reação da hemaglutinação foi realizada em microplacas de 96 cavidades em fundo "U". Inicialmente foi colocado 25 µl do diluente (PBS pH 7.2) em todas as cavidades das microplacas utilizadas na reação, e, a seguir, 25µl da suspensão viral correspondente foi adicionado na primeira cavidade (coluna 1). Procedeu-se a diluição seriada, de razão 2, até a penúltima coluna, reservando-se a coluna 12 para o controle das hemácias. A suspensão de hemácias foi homogeneizada, e adicionada a todas as cavidades, no volume de 25µl por cavidade. A leitura da reação foi realizada à temperatura ambiente após um período de 20 minutos. O título viral foi expresso como a maior diluição do vírus, onde se verificou o fenômeno da hemaglutinação por completo. Esta diluição correspondia a uma UHA (Unidade Hemaglutinante).

Em linhas gerais, os soros utilizados na reação, foram previamente inativados a 56°C durante 30 minutos, para a remoção de possíveis inibidores não específicos da HA. Com o auxílio de micropipetas calibradas os soros foram submetidos a diluições seriadas de razão 2, de 1:2 até 1:2048, num volume de 25µL por cavidade da microplaca. As diluições foram realizadas em solução

tampão PBS pH 7,2. Este mesmo tampão também foi utilizado para o ajuste da concentração constante do antígeno viral, ou seja, quatro UHA. Para a realização da reação, 25µL de antígeno foi colocado em contato com as diferentes diluições dos soros e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir foram adicionadas 25µL da suspensão de eritrócitos oriundos de galinhas, previamente padronizada conforme descrita anteriormente. A leitura da reação foi realizada após um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, tempo em ocorria a deposição nítida das hemácias nas cavidades dos controles da reação. O título final do soro foi expresso pela recíproca da maior diluição deste, capaz de inibir completamente a atividade hemaglutinante viral (HA). Obedecendo a padrões e normas da O.I.E., no caso da utilização de antígenos na concentração de 4 UHA, amostras com título igual ou superior a 16 foram consideradas soro reagentes frente ao VDN.

4.4 Reação da Fixação de Complemento (RFC)

Devido à capacidade do soro de pombos fixarem complemento de cobaio no teste convencional de fixação do complemento, apenas amostras provenientes desta espécie aviária foram submetidas a esta técnica, no sentido de averiguar o comportamento do soro de pombos em fixar complemento de cobaio.

Foi coletado sangue de carneiro para obtenção de hemácias a serem utilizadas nas RFC. A sangria dos carneiros foi feita com assepsia, colhendo-se o sangue de cada carneiro em igual volume de solução conservadora de hemácias, que consistia em solução de Alsever submetida a um processo de Tindalização. O sangue colhido foi mantido sob refrigeração em geladeira. No momento de uso as hemácias eram lavadas (três vezes) por centrifugação, com solução tampão (trietanolamina), sendo a seguir misturadas, filtradas em algodão e centrifugadas a 800 x g durante 10 minutos. A partir da papa de hemácias obtida, foi preparada uma suspensão a 5% em solução tampão, padronizada em espectrofotômetro para densidade óptica (DO) entre 0,52 a 0,56.

Como fonte de complemento foi utilizada mistura de soros de 15 cobaios machos, preparados e titulados, segundo técnica 50%. O título de

complemento por nós obtido para uso na RFC foi de 334 U/ml e 300 U/ml, em duas dosagens consecutivas.

Foi utilizado como fonte de antígeno suspensão de líquido alantóide (LA) colhida dos ovos previamente inoculados, conforme descrito anteriormente. Deve ser ressaltado que, na tentativa de obtenção de antígenos com altos títulos hemaglutinantes (HA) e, portanto, com altos títulos fixadores do complemento, houve necessidade de realizar um total de seis passagens em ovos embrionados e, promover uma concentração e purificação da amostra viral pela técnica de Adsorção e Eluição Viral, descrita a seguir.

Para a realização da RFC propriamente dita, foram utilizados 25µL das diferentes diluições dos soros em tampão trietanolamina, distribuídas em cavidades de microplacas contendo fundo em U, a partir da diluição 1: 2 até a diluição de 1:1024; 25 µL do antígeno produzido (em sua dose de reatividade ótima), 50 µL do complemento (2UC 50%), seguido de incubação em câmara úmida à temperatura de geladeira (6°C a 8°C) durante 18 horas. Após este período, foi adicionado a todas as cavidades da microplaca, 25 µL de sistema hemolítico (SH), sistema indicador da reação, seguido de incubação a 37°C por 30 minutos. As microplacas foram centrifugadas a 800xg por 5 minutos e, em seguida, foi realizada a leitura do grau de hemólise, com o auxílio de escala de lise. Em conjunto com a análise das amostras, em cada placa foi realizado o controle do complemento, o controle do antígeno e o controle do sistema hemolítico. Os títulos da RFC foram expressos pela recíproca da maior diluição do soro com 50% de lise.

4.4.1 Determinação da Dose de Reatividade do Antígeno

As doses de reatividade ótimas dos antígenos utilizadas nas RFC foram determinadas por titulação em bloco ("Block titration"). Foram utilizadas na reação, microplacas estéreis contendo 96 cavidades em fundo "U". Em linhas gerais, várias diluições seriadas do antígeno (diluições de 1:8 até 1:256), no volume de 25 µl por cavidade, foram colocadas a reagir frente a várias diluições (1:2 a 1:1024) de dois soros homólogos específicos, previamente escolhidos para tal, também no volume de 25 µl por cavidade, escolhidos por conter altos títulos

de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o VDN (títulos >512). Paralelamente, foram realizados os controles do antígeno, do soro, do sistema hemolítico e complemento. O complemento diluído (2U C 50%) foi adicionado no volume de 25 µL por cavidade, e seguiu-se a incubação em câmara úmida à temperatura de 4° C por 18 horas (primeira fase da reação).

Após 18 horas de incubação foi adicionado o sistema hemolítico (SH) constituído de suspensão de hemácias de carneiro padronizada e sensibilizada pela hemolisina na sua concentração ótima, seguido de nova incubação das microplacas a 37° C por 30 minutos, sob agitação constante nos primeiros 15 minutos. As microplacas foram centrifugadas a 800xg durante 5 minutos e, em seguida, foi feita a leitura final do grau de hemólise, realizada com auxílio de escala de lise, conforme recomenda a técnica.

4.5 Técnica de Adsorção e Eluição Viral

Os segmentos da glicoproteína HN, hemaglutinina e neuraminidase, conferem ao vírus a habilidade de aglutinar eritrócitos, através da ligação do complexo HN com receptores presentes na superfície celular, e promovem à gradual eluição do vírus a partir dos eritrócitos aglutinados, respectivamente, quando submetidos à temperatura de 37° C.

Para a realização da concentração da carga viral e, conseqüentemente uma melhoria da qualidade do antígeno, foi utilizada a técnica de adsorção e eluição viral. Para tal, foi utilizada uma suspensão de eritrócitos de galinha, coletado de aves através da punção da veia braquial, com uma agulha 0,45 x 13 e seringa de 10 ml já contendo 5 ml de Anticoagulante de Alsever. A quantidade colhida (hemácias + anticoagulante) foi filtrada com um auxílio de funil e algodão; o filtrado obtido foi lavado com PBS pH 7,2 e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado novamente com PBS. Este processo foi repetido três vezes. O sedimento de hemácias resultante foi diluído em 15 mL de PBS pH 7,2, a uma temperatura de 4°C, na concentração final de 5% de eritrócitos. A esta suspensão de hemácias, foi adicionado 15 mL de Líquido Alantóide (LA), proveniente de ovos inoculados com o VDN (estirpe La Sota), seguindo-se uma leve homogeneização. A mistura (Líquido Alantóide + Eritrócitos) foi acondicionada em tubos to tipo “falcon” de 50 mL, e, depois de

submetida à incubação a 4° C por 1 h. Após este período, a solução foi centrifugada a 800 x g por 5 minutos, a uma temperatura de 4° C. O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado ressuspenso em 6 mL de solução tampão PBS. A mistura foi novamente submetida à incubação, porém a uma temperatura de 37° C por 30 minutos, para que ocorresse a eluição viral, e, após nova centrifugação a 800 x g por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante obtido, contendo o antígeno concentrado (vírus eluído), foi colhido, acondicionado em microtubos plásticos de 1,5 e congelado, até o momento de sua utilização. O sedimento resultante da centrifugação foi descartado.

4.6 Reação em Cadeia pela Polimerase Pós Transcrição Reversa

4.6.1 Extração do RNA Viral

A extração do RNA viral foi realizada a partir das amostras de *swabs* cloacais colhidas de cada ave, bem como das amostras de tecidos, coletadas após a eutanásia dos animais em seus respectivos modelos experimentais.

A colheita de *swabs* foi realizada com o auxílio de hastes estéreis e descartáveis. Os *swabs* colhidos foram acondicionados em microtubos plásticos, contendo 1,0 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS – 0,01 M $\text{PO}_4^{=}$ 0,14 M NaCl, pH 7,2) e em seguida congelados à temperatura de –70 °C. No momento da extração, as amostras foram descongeladas à temperatura de 4°C e homogeneizadas em vórtex por 15 segundos. Para a extração do RNA viral, foi utilizado o Kit de Extração QIAmp® Viral RNA Mini Kit, conforme instruções do fabricante.

Para a extração de RNA viral proveniente das amostras de tecidos (pulmão, fígado, baço e traquéia) foi utilizado o kit de extração Total RNA Extraction Kit (Mini), da Real Genomics®, conforme instruções do fabricante.

Após os procedimentos de extração (*swabs* cloacais e tecidos) as amostras extraídas foram mantidas congeladas à temperatura de -70°C até o momento de uso.

4.6.2 Descrição dos Oligonucleotídeos Iniciadores (“*primers*”)

Os *primers* utilizados na presente investigação já haviam sido previamente descritos (TOYODA et al. 1989) e utilizados (KANT et al., 1997; OBERDÖRFER & WERNER, 1998; DEMÉTRIO, 2002; SOARES, 2002; CARRASCO et al., 2008a), bem como em nosso plano de dissertação de mestrado. Tais *primers* reconhecem uma região do genoma viral que faz parte da porção responsável pela transcrição da proteína F_o, próximo ao sítio de clivagem desta proteína, sendo capaz de identificar todas as estirpes do VDN já conhecidas, independentemente da amostra, da patogenicidade ou do hospedeiro envolvido. A localização de tais *primers* no genoma viral foi descrita por TOYODA et al. (1989). Os produtos finais da RT-PCR são fragmentos de nucleotídeos de 362 pb. Todos os *primers* foram sintetizados pela *Invitrogen*[®], conforme seqüência apresentada no quadro abaixo:

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

4.6.3 Síntese de cDNA – Transcrição Reversa do RNA Viral

Para a síntese de cDNA necessário se fez uma reação de pré transcrição, na qual 4µL do RNA extraído foram adicionados a 5µL do *primer* P1F na concentração de 50 pMol e a 1µL de Água Milli Q autoclavada. A mistura foi submetida ao termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 - Applied Biosystems), com ciclo inicial de 95°C, por 3 minutos, a 50°C por 25 minutos e a 4°C até a amostra ser retirada da máquina. Após a retirada da máquina, foram adicionados os seguintes reagentes para a reação de transcrição reversa: 8,0 µL de *ImProm II 5X reaction buffer* (Promega[®]); 4,0 µL MgCl₂ 25 mM (Promega[®]); 6,0 µL de dNTP 10mM (Biotools[®]); 0,5 µL de RnaseOUT[®] 40U/µL (Invitrogen[®]) e 1 µL de *ImProm II*[®] (Promega[®]). As amostras foram submetidas ao seguinte programa do termociclador: 60 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C e a 4°C até a retirada da máquina. O cDNA, quando não utilizado imediatamente quando

obtido, foi acondicionado à temperatura de -70°C até a realização da seqüência da reação.

4.6.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A amplificação foi efetuada a partir de 5µL de cDNA, adicionado de 2µL do *primer sense* e *anti-sense* (50pMol); 8µL de dNTP 1,25mM (*Biotools*[®]); 1,0 µL de TTH - DNA Polimerase 1U/µL (*Biotools*[®]); 5µL de *Standard Buffer*[®] - 75mM tris HCl; 2 mM MgCl; 50 mM KCl; 20 mM (NH)₄SO₄ (*Biotools*[®]) e 27µL de Água Milli Q[®] autoclavada. A amplificação foi efetuada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems[®]). O programa consta de uma etapa de 94°C por 5' (desnaturação inicial e ativação da enzima), seguida de 35 ciclos de 94°C por 1'00" / 50°C por 1'30" / 72°C por 1' e uma etapa final de 72°C por 5'. Após esta etapa final, a temperatura permaneceu a 4°C até a retirada da amostra.

4.6.5 Detecção do Produto Amplificado

Os fragmentos gerados na PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen[®]). Para tanto, uma mistura de 8,0µL de cada produto amplificado com 2µL de tampão de corrida foi colocada em um poço do gel, preparado a 1,8% (peso/volume) em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de EDTA, pH 8,0), com brometo de etídio numa concentração final de 0,5 µg/mL. O gel era submetido à eletroforese sob voltagem de 100 volts, durante 50 minutos e o produto amplificado (*amplicons*) visualizado por meio de um transiluminador de luz ultravioleta.

4.7 Seqüenciamento das Amostras Padrão

Para uma melhor compreensão dos nossos resultados, realizamos o seqüenciamento dos genes que codificam a proteína F de nossas amostras padrão: a amostra patogênica do VDN São João do Meriti, e a amostra vacinal La Sota.

O seqüenciamento teve como finalidade o desenvolvimento de iniciadores ou “*primers*”, capazes de diferenciar um fragmento do genoma de um vírus patogênico de um fragmento do genoma proveniente do vírus vacinal. Esta parte do nosso projeto foi realizada em parceria com o Laboratório de Virologia Molecular do ICB, USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Edison Luis Durigon.

Para a purificação do produto amplificado, resultante da reação de RT-PCR das amostras virais padrão, foi utilizado o protocolo utilizando o Acetato de Sódio 3M, pH 5,25, que consiste nas etapas abaixo descritas.

Para 80µL do produto amplificado e quantificado, foram somados 20µL de água MilliQ, obtendo-se um volume final de 100µL. Após esta etapa, adicionou-se o acetato de sódio, na proporção de 10% do volume total, ou seja, 10 µL de acetato. A seguir, adicionou-se 220 µL de etanol absoluto, seguido de agitação através do vórtex, permanecendo esta solução, durante 12 horas (*overnight*), a uma temperatura de -20°C. Após este período, a amostra foi centrifugada por 30 minutos, a uma velocidade de 14000 RPM, a uma temperatura de 4°C, sendo que o sobrenadante foi descartado após a centrifugação e o microtubo plástico depositado sobre um papel filtro. A próxima etapa consistiu em adicionar 150 µL de etanol 70% ao microtubo e, novamente, submetê-lo a uma centrifugação de 14000 RPM, a 4°C, durante 10 minutos e novamente o sobrenadante foi descartado. A amostra foi secada em uma centrífuga a vácuo, por 20 minutos a 60°C. O produto resultante foi ressuspenso em 20 µL de água ultrapura.

Após este processo de purificação da amostra, ela foi submetida à reação de seqüenciamento, que consiste na utilização de um *mix*, contendo: 2 µL de Big Dye; 2 µL de Save Money [5x], 1 µL de *primer* (P1F ou P2R - 10 pmol); 3 µL de água ultrapura e finalizando com 2 µL da amostra purificada. A mistura foi submetida a uma amplificação no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems®). O programa consta de 30 ciclos de 96°C por 5’, 96°C por 10’’ e 50°C por 10’’, seguida de 60°C por 4’. Após esta etapa final, a temperatura permaneceu a 4°C até a retirada da amostra. A próxima etapa foi o processo de precipitação da amostra, utilizando-se para esta finalidade, o Isopropanol 100%, seguido do Isopropanol 75%. Finalizada esta etapa, a amostra foi acondicionada no seqüenciador, para o processo de sequenciamento propriamente dito.

Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do programa computacional BioEdit[®] as seqüências posteriormente editadas. Os resultados das edições foram analisadas em uma base de dados *on line* para avaliação das seqüências obtidas (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi), confirmando uma homologia de 98% dos nucleotídeos, com as amostras do Vírus da Doença de Newcastle já depositadas nesta base de dados, confirmando que nossas amostras correspondiam a amostras do VDN.

Ademais, as seqüências obtidas de nossas amostras foram depositadas no Gene Bank[®] e pode ser acessados no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> pelos números EF534701, Amostra São João do Meriti, e EF534702, Amostra La Sota.

A partir das seqüências obtidas, utilizando-se do programa computacional *on line* Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) foram desenhados os *primers* específicos para as amostras La Sota e São João do Meriti do VDN, na objetivando uma diferenciação das mesmas através da RT-PCR.

4.8 Desenho de *Primers* Específicos

Objetivando a tentativa de diferenciar a origem do fragmento de genoma viral eliminado pelas aves vacinadas (amostra La Sota) e posteriormente infectadas (amostra São João do Meriti), foram desenhados *primers* específicos de cada amostra, a partir das seqüências gênicas obtidas na etapa do seqüenciamento das amostras padrão. Em uma segunda etapa, foi realizada a padronização de uma RT-PCR, utilizando-se destes *primers*, sendo possível assim distinguir qual amostra viral a ave eliminou naquele momento da Colheita do *swab* cloacal.

Seguem a seguir os *primers* e suas respectivas seqüências de nucleotídeos:

La Sota	Localização (pb)	Seqüência (5' - 3')	Tamanho do Fragmento (pb)
LS F (Sense)	71-90	CATCATCCCAGACAGGATCA	120
LS R (Anti-Sense)	190-209	GGGTGAGCAAAGTGGTCAAT	

São João do Meriti	Localização (pb)	Seqüência (5' - 3')	Tamaho do Fragmento (pb)
SJM F (Sense)	26-45	GCTGCAGGGATTGTGGTAAC	234
SJM R (Anti-Sense)	259-278	GCGTTTCTGTCTCCTTCCTC	

4.9 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) Específica

A amplificação foi efetuada a partir do cDNA original, tendo em vista que como estes *primers* específicos tiveram a origem no fragmento original (362pb) o qual foi gerado utilizando-se os *primers* P1F e P2R.

A padronização desta reação com os novos *primers* foi realizada em duas etapas. A primeira consistia em avaliar, de forma separada, os diferentes *primers* com suas respectivas amostras originárias. O *primer* La Sota (LS) foi adicionado para amplificar uma amostra vacinal La Sota. Por sua vez, o *primer* São João do Meriti foi adicionado para amplificar a amostra patogênica São João do Meriti (SJM). Com o sucesso desta primeira etapa, existiu a necessidade de avaliação da funcionalidade destes *primers* em amostras contendo as duas estirpes virais em questão (LS e SJM). Para tanto, foi realizado uma mistura do cDNA das duas amostras em concentrações semelhantes, quantificadas pelo Gene Quant[®], da GE Healthcare[®]. A partir desta mistura de cDNA, foi validado a possibilidade de diferenciar, com a utilização de *primers* específicos, as amostras de swabs cloacais positivas pela RT-PCR convencional. Este fato possibilitou a avaliação do genoma eliminado pelas aves, determinando se o mesmo era proveniente da vacina ou da amostra patogênica excretada.

Para a reação de RT-PCR específica (LS ou SJM) foi utilizado 5 µL de cDNA, adicionado de 2µL do *primer sense* e anti-sense (50pMol – LS ou SJM); 8µL de dNTP 1,25mM (*Biotoools*[®]); 1,0 µL de TTH - DNA Polimerase 1U/µL (*Biotoools*[®]); 5µL de *Standard Buffer*[®] - 75mM tris HCl; 2 mM MgCl; 50 mM KCl; 20

mM (NH)₄SO₄ (Biotools[®]) e 27µL de Água Milli Q[®] autoclavada. A amplificação foi efetuada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems[®]). O programa utilizado para a diferenciação das estirpes consta de uma etapa de 94°C por 5' (desnaturação inicial e ativação da enzima), seguida de 35 ciclos de 94°C por 1'00" / 55°C por 1'00" / 72°C por 1' e uma etapa final de 72°C por 5'. Após esta etapa final, a temperatura permaneceu a 4°C até a retirada da amostra.

Cada amostra positiva pelos *primers* P1F e P2R foi testada mais duas vezes, sendo uma para cada *primer* específico.

4.10 Detecção do Produto Amplificado Específico

Em face dos diferentes tamanhos de fragmentos gerados pelos *primers* específicos (La Sota 120pb e São João do Meriti 234 pb), foi possível a diferenciação das estirpes virais pela visualização dos fragmentos compatíveis, obtidos pela PCR. Estes foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen[®]). Para tanto, uma mistura de 8,0µL de cada produto amplificado com 2µL de tampão de corrida foi colocada em um poço do gel, preparado a 1,8% (peso/volume) em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de EDTA, pH 8,0), com brometo de etídio numa concentração final de 0,5 µg/mL. O gel era submetido à eletroforese sob voltagem de 100 volts, durante 50 minutos e o produto amplificado (*amplicons*) visualizado por meio de um transiluminador de luz ultravioleta.

5 RESULTADOS

5.1 Reação de Inibição da Hemaglutinação

Os resultados da avaliação dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação dos soros das aves submetidas aos quatro modelos experimentais, expressos em função logarítmica de base 2 (Log_2X), estão sumariados nas tabelas 1 a 4 e figuras 1 a 7. Os resultados dos testes sorológicos das aves pertencentes aos grupos controles, estão dispostos somente sob a forma de tabela.

No modelo experimental 01, realizado com o propósito de avaliar a patogenicidade da estirpe São João do Meriti (SJM), pombos e galinhas não imunizadas foram experimentalmente infectados. Conseqüentemente, apesar de permanecerem clinicamente saudáveis durante todo o experimento, a produção de anticorpo nos pombos foi imediata, alcançando títulos elevados de anticorpos inibidores da hemaglutinação a partir do 15º DE, persistindo até o 56º DE (Tabela 1 e Figura 1). Entretanto, todas as cinco galinhas (G7 a G11) vieram a óbito no sétimo dia após a inoculação viral (7º DE). As aves (pombos e galinhas) pertencentes ao grupo controle permaneceram soro-negativas durante todo o experimento, confirmando que não ocorreu a circulação do agente (Tabela 1).

Nos pombos submetidos ao modelo experimental 2 (pombos vacinados ao 0 DE e revacinados aos 35º DE e, posteriormente infectados aos 61º DE), os títulos de anticorpos atingiram níveis elevados antes mesmo da infecção experimental, realizada aos 61º DE. Após a infecção experimental, títulos mais elevados de anticorpos inibidores da hemaglutinação foram detectados no 85º DE, mantendo-se praticamente estável até o final do experimento, aos 128º DE (Tabela 2 e Figura 2). Nas galinhas sentinelas do modelo experimental 2, que foram colocadas em contatos com os pombos infectados no 66º DE, não foi observada soro-conversão, assim como sinal clínico compatível com a DN. Nos pombos vacinados do grupo controle (P 41 a P 45), título mais elevado de anticorpos, foi observado a partir do 61º DE, persistindo até o 85º DE, declinando posteriormente de forma gradual, em face da não estimulação do sistema imune pela infecção experimental. Já as galinhas do grupo controle (G 23 e G 24),

permaneceram sorologicamente negativas durante todo o experimento (Tabela 2 e Figura 3).

Com relação aos resultados dos experimentos das aves submetidas ao modelo experimental 3 (galinhas vacinadas e não vacinadas, em contato com pombos infectados), no momento em que foram colocadas em contato com os pombos infectados, fato que ocorreu no 45º DE, as galinhas vacinadas já apresentavam elevados níveis de anticorpos (Tabela 3 e Figura 5). Da análise dos dados da tabela 3 e figura 4, observa-se que nas galinhas não vacinadas (sentinelas), soro-conversão somente foi observada no 81º DE, enquanto que, nos pombos experimentalmente infectados, títulos elevados de anticorpos foram detectados a partir do 55º DE, ou seja, 15 dias após a inoculação da estirpe SJM. Por outro lado, as aves do grupo controle (galinhas G 27 e G 28 e pombos P 46 a P 50), inoculadas com solução salina tamponada estéril (PBS pH 7,2), permaneceram soronegativas durante todo o período. Por sua vez, as galinhas vacinadas (G 25 e G 26), do mesmo grupo controle, apresentaram títulos mais elevados de anticorpos no 45º DE, os quais decaíram gradativamente (Tabela 3).

No modelo experimental 4 (galinhas vacinadas e infectadas experimentalmente, no 40º DE, com a estirpe SJM, em contato com pombos e galinhas sentinelas), observa-se que as galinhas vacinadas apresentaram altos títulos de anticorpos. O nível mais alto de tais anticorpos ocorreu por volta do 55º DE, em decorrência da infecção experimental realizada após a vacinação (Tabela 4 e Figura 7). Da análise de tal tabela é possível inferir que os pombos sentinelas pertencentes a este modelo, desenvolveram soro-conversão, apesar de não apresentarem altos títulos de anticorpos (Tabela 4). De modo semelhante, conforme observado nas galinhas vacinadas, títulos mais altos de anticorpos nos pombos foi observado no 55º DE. Entretanto, nas galinhas sentinelas (Tabela 4 e Figura 7) não foi detectado anticorpos durante todo modelo experimental. Os pombos e galinhas não infectados não apresentaram anticorpos específicos anti VDN. Já nas galinhas vacinadas pertencentes a este grupo (G 29 e G 30), o nível mais alto de anticorpos foi observado no 40º DE (Tabela 4).

Tabela 1: Resultados dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de pombos experimentalmente infectados e de aves (pombos e galinhas) pertencentes ao grupo controle, submetidos ao Modelo Experimental 1.

GRUPO	Identificação da ave* (Número)		DIA EXPERIMENTAL				
			0 ^a	15	28	41	56
EXPERIMENTAL	01	Pombo	2	2	3	2	2
	02	Pombo	2	2	2	3	1
	03	Pombo	0	4	4	2	2
	04	Pombo	2	3	3	3	3
	05	Pombo	0	5	2	2	3
	06	Pombo	0	4	2	2	4
	07	Pombo	2	3	5	5	4
	08	Pombo	0	4	3	2	3
	09	Pombo	1	4	2	1	1
	10	Pombo	1	3	3	3	2
MÉDIA			1	3,4	2,9	2,5	2,5
CONTROLE	36	Pombo	1	1	0	0	0
	37	Pombo	0	0	0	1	0
	38	Pombo	0	0	0	0	0
	39	Pombo	1	0	0	1	0
	40	Pombo	0	0	0	0	0
	MÉDIA			0,4	0,2	0	0,4
	21	Galinha	0	0	0	0	0
	22	Galinha	0	0	0	0	0
MÉDIA			0	0	0	0	0

^a =Dia da realização da Infecção Experimental

*As galinhas experimentalmente infectadas pertencentes a este grupo vieram a óbito no 5ºDE. Desta forma, não foi realizada a sorologia nestas aves.

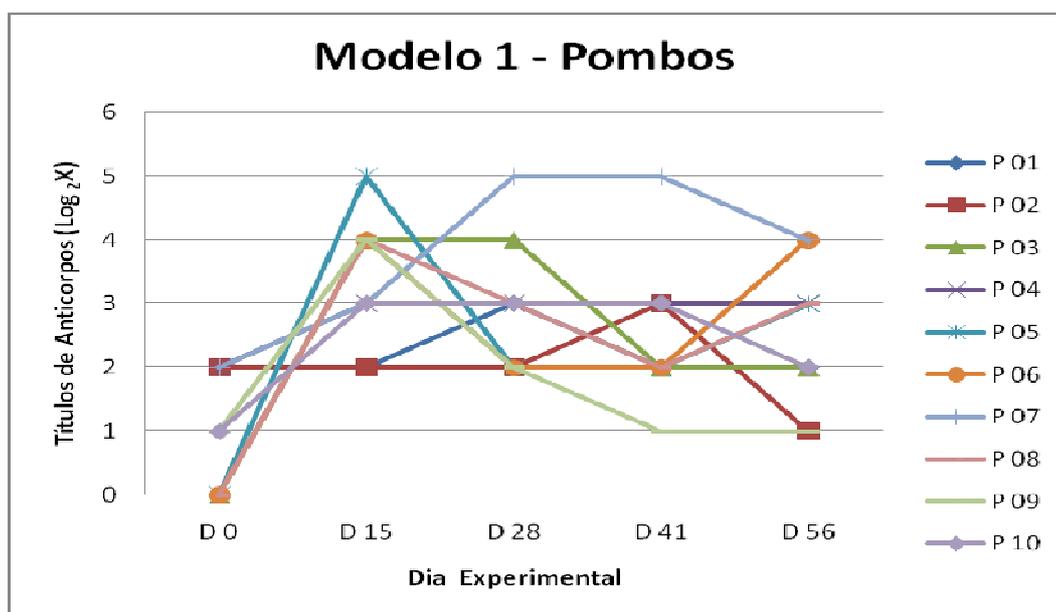


Figura 1: Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de pombos experimentalmente infectados (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1.

Tabela 2: Resultados dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de pombos vacinados e experimentalmente infectados, em contato com galinhas sentinelas e de aves (pombos e galinhas) pertencentes ao grupo controle, submetidos ao Modelo Experimental 2.

GRUPO	Identificação da ave (Número)		DIA EXPERIMENTAL							
			0 ^a	35 ^b	61 ^c	66 ^d	85	99	113	128
EXPERIMENTAL	29	Pombo	1	2	4	Ø	5	4	4	4
	30	Pombo	2	2	2	Ø	3	4	4	2
	31	Pombo	0	0	4	Ø	3	2	2	2
	32	Pombo	2	2	4	Ø	6	5	5	4
	34	Pombo	2	2	4	Ø	5	5	5	4
	35	Pombo	2	3	5	Ø	6	4	3	3
	36	Pombo	2	2	4	Ø	4	3	3	3
	37	Pombo	2	2	4	Ø	7	7	5	7
	38	Pombo	1	5	3	Ø	5	5	4	3
		MÉDIA		1,6	2,3	3,8	Ø	4,9	4,4	3,9
	16	Galinha ^f	Ø	Ø	Ø	0	0	0	0	0
	17	Galinha ^f	Ø	Ø	Ø	1	1	0	1	0
	18	Galinha ^f	Ø	Ø	Ø	0	1	0	0	0
	19	Galinha ^f	Ø	Ø	Ø	0	0	0	0	0
	MÉDIA		Ø	Ø	Ø	0,25	0,5	0	0,25	0
CONTROLE	P 41	Pombo ^e	1	2	3	Ø	3	2	2	2
	P 42	Pombo ^e	0	2	2	Ø	3	2	2	2
	P 43	Pombo ^e	0	2	3	Ø	3	3	2	2
	P 44	Pombo ^e	1	1	2	Ø	2	1	2	1
	P 45	Pombo ^e	0	3	3	Ø	2	3	1	1
		MÉDIA		0,4	2	2,6	Ø	2,6	2,2	1,8
	G 23	Galinha ^f	Ø	Ø	Ø	0	0	0	0	0
	G 24	Galinha ^f	Ø	Ø	Ø	0	0	0	0	0
	MÉDIA		Ø	Ø	Ø	0	0	0	0	0

Ø = Não foi realizado teste de HI nesta amostra

^a = Primeira dose de vacina nos Pombos

^b = Segunda dose de vacina nos Pombos

^c = Realização da infecção experimental nos Pombos vacinados

^d = Adição das Galinhas sentinelas

^e = Pombo vacinado

^f = Galinha não vacinada

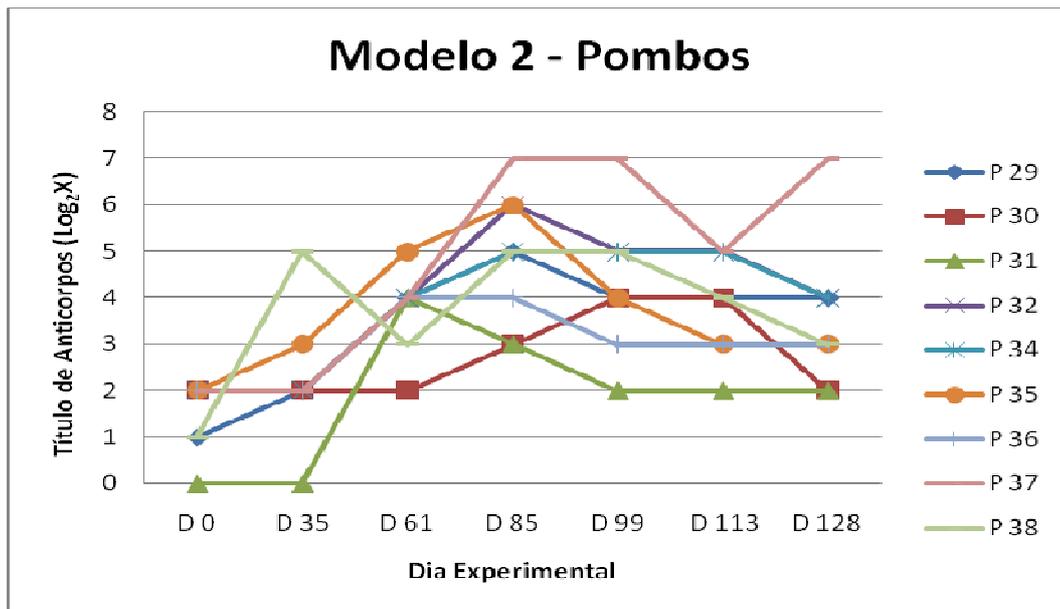


Figura 2: Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de pombos vacinados (D0 e 35^o DE) e experimentalmente infectados (61^o DE), submetidos ao Modelo Experimental 2.

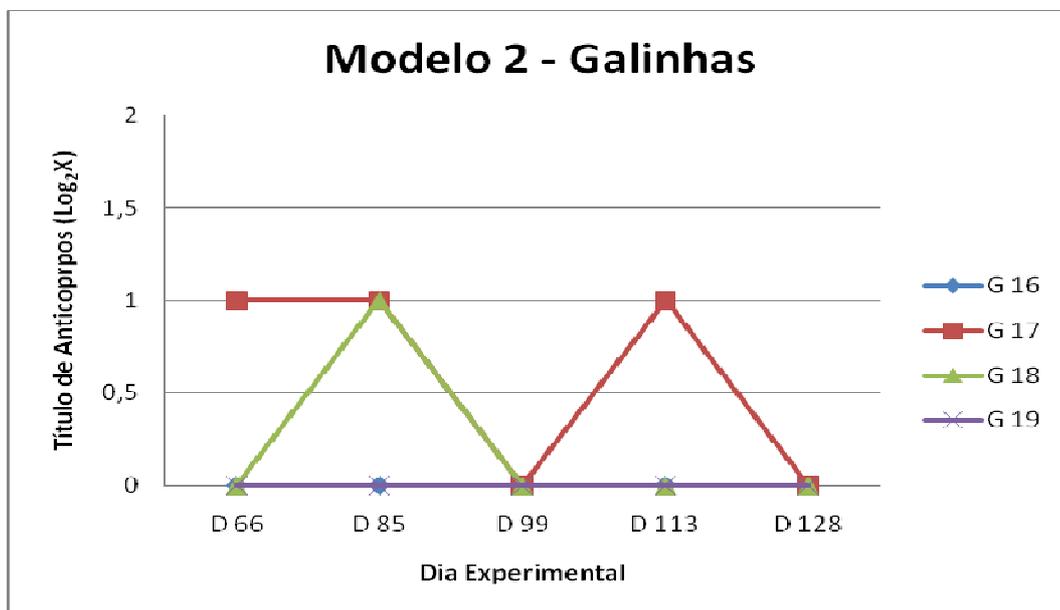


Figura 3: Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de galinhas sentinelas, submetidas ao Modelo Experimental 2

Tabela 3: Resultados dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de pombos experimentalmente infectados em contato com galinhas (vacinadas e sentinelas) e de aves (pombos e galinhas) pertencentes ao grupo controle, submetidos ao Modelo Experimental 3.

GRUPO	Identificação da ave (Número)		DIA EXPERIMENTAL								
			0 ^c	21 ^d	40 ^e	45 ^f	55	68	81	96	
EXPERIMENTAL	11	Pombo	0	0	Ø	Ø	2	3	3	2	
	12	Pombo	2	1	Ø	Ø	2	4	3	2	
	13	Pombo	2	1	Ø	Ø	3	4	2	2	
	14	Pombo	2	2	Ø	Ø	2	2	1	1	
	15	Pombo	1	1	Ø	Ø	5	5	3	1	
	16	Pombo	1	0	Ø	Ø	4	4	3	2	
	17	Pombo	1	0	Ø	Ø	4	4	2	3	
	18	Pombo	1	1	Ø	Ø	4	3	3	4	
	19	Pombo	0	0	Ø	Ø	3	3	3	3	
	20	Pombo	0	0	Ø	Ø	3	3	3	3	
	MÉDIA		1	0,6	Ø	Ø	3,2	3,5	3	2,3	
	04	Galinha ^a	0	5	Ø	6	5	5	5	5	
	05	Galinha ^a	0	5	Ø	6	5	5	5	5	
	06	Galinha ^a	0	4	Ø	4	4	4	3	3	
	MÉDIA		0	4,7	Ø	5,4	4,7	4,7	4,4	4,4	
	12	Galinha ^b	0	0	Ø	0	0	0	4	4	
	13	Galinha ^b	0	0	Ø	0	0	0	5	4	
	MÉDIA		0	0	Ø	0	0	0	4,5	4	
	CONTROLE	46	Pombo ^g	1	1	Ø	Ø	0	0	0	0
		47	Pombo ^g	0	0	Ø	Ø	0	0	0	0
48		Pombo ^g	0	0	Ø	Ø	0	0	0	0	
49		Pombo ^g	0	1	Ø	Ø	1	1	0	0	
50		Pombo ^g	0	1	Ø	Ø	1	1	1	1	
MÉDIA		0,2	0,6	Ø	Ø	0	0,4	0,2	0,2		
25		Galinha ^a	0	4	Ø	6	5	5	4	4	
26		Galinha ^a	0	3	Ø	5	5	5	5	4	
MÉDIA		0	3,5	Ø	5,5	5	5	4,5	4		
27		Galinha ^b	0	0	Ø	0	0	0	0	0	
28	Galinha ^b	0	0	Ø	0	0	0	0	0		
MÉDIA		0	0	0	0	0	0	0	0		

Ø = Não foi realizado teste de HI nesta amostra

^a = Galinha vacinada

^b = Galinha não vacinada

^c = Primeira dose de vacina nas Galinhas

^d = Segunda dose de vacina nas Galinhas

^e = Realização da infecção experimental nos Pombos

^f = Adição das Galinhas sentinelas

^g = Pombo não vacinado

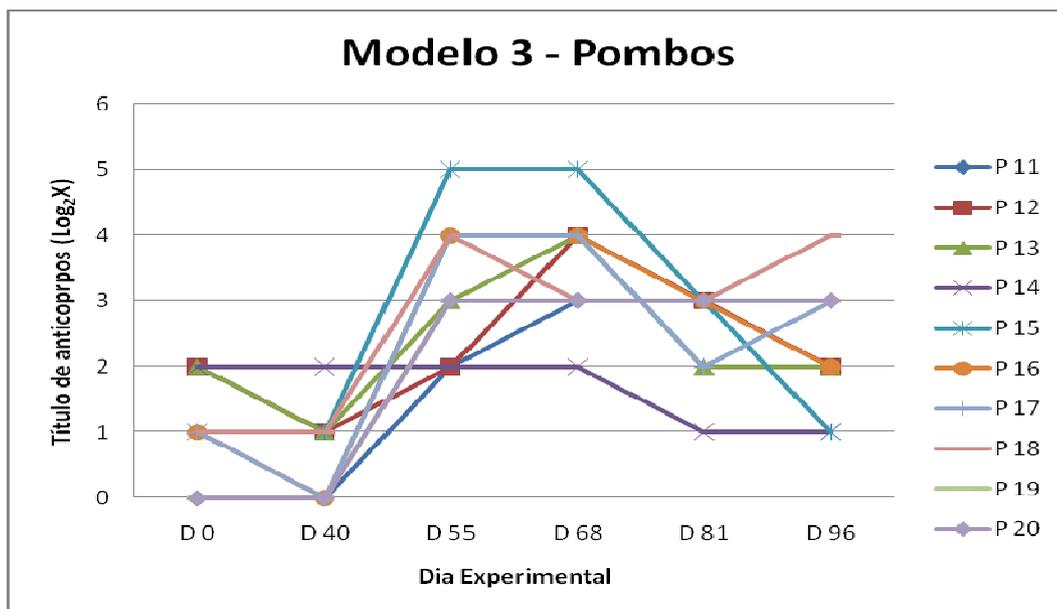


Figura 4: Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de pombos experimentalmente infectados (40^{a} DE), submetidos ao Modelo Experimental 3.

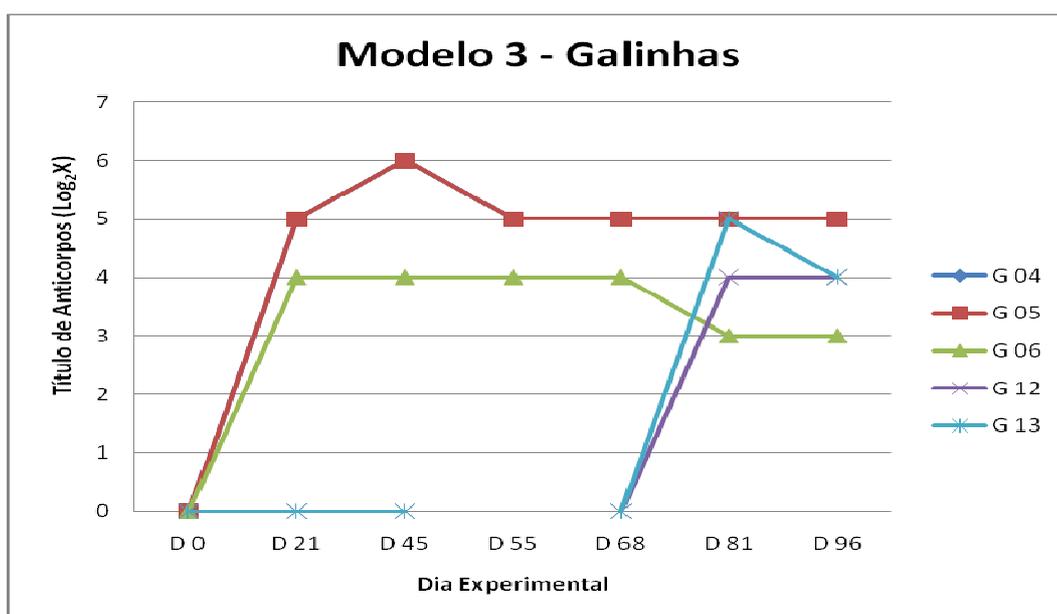


Figura 5: Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros de galinhas vacinadas (D_0 e 21^{a} DE) e sentinelas, submetidas ao Modelo Experimental 3.

Tabela 4: Resultados dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X) dos soros de galinhas vacinadas e experimentalmente infectadas, em contato com pombos e galinhas sentinelas e de aves (pombos e galinhas) pertencentes ao grupo controle, submetidos ao Modelo Experimental 4.

GRUPO	Identificação da ave (Número)		DIA EXPERIMENTAL							
			0 ^c	21 ^d	40 ^e	45 ^f	55	68	81	96
EXPERIMENTAL	21	Pombo	0	Ø	Ø	0	3	3	1	1
	22	Pombo	2	Ø	Ø	1	2	2	2	1
	23	Pombo	2	Ø	Ø	1	3	2	1	0
	24	Pombo	2	Ø	Ø	2	2	2	2	2
	25	Pombo	1	Ø	Ø	0	2	2	1	1
	26	Pombo	1	Ø	Ø	1	3	3	1	1
	27	Pombo	0	Ø	Ø	0	4	2	1	1
	28	Pombo	1	Ø	Ø	1	3	1	0	0
		MÉDIA	1,1	Ø	Ø	0,8	2,8	2,1	1,1	0,9
	01	Galinha ^a	0	5	5	Ø	7	7	7	6
	02	Galinha ^a	0	5	5	Ø	8	7	5	5
03	Galinha ^a	0	5	5	Ø	7	6	6	5	
	MÉDIA	0	5	5	Ø	7,4	6,7	6	5,4	
14	Galinha ^b	0	0	0	Ø	0	0	0	0	
15	Galinha ^b	0	0	0	Ø	0	0	0	0	
	MÉDIA	0	0	0	Ø	Ø	0	0	0	
CONTROLE	51	Pombo ^g	1	Ø	1	Ø	0	0	0	0
	52	Pombo ^g	0	Ø	0	Ø	0	0	0	0
	53	Pombo ^g	0	Ø	0	Ø	0	0	0	0
	54	Pombo ^g	0	Ø	1	Ø	1	1	1	0
	55	Pombo ^g	1	Ø	1	Ø	0	1	1	1
		MÉDIA	0,4	Ø	0,6	Ø	0	0,4	0,4	0,2
	29	Galinha ^a	0	4	6	Ø	5	5	4	4
	30	Galinha ^a	0	3	5	Ø	5	5	5	4
		MÉDIA	0	3,5	5,5	Ø	5	5	4,5	4
	31	Galinha ^b	0	0	0	Ø	0	0	0	0
32	Galinha ^b	0	0	0	Ø	0	0	0	0	
	MÉDIA	0	0	0	Ø	0	0	0	0	

Ø – Não foi realizado teste de HI nesta amostra

^a = Galinha vacinada

^b = Galinha não vacinada

^c = Primeira dose de vacina nas Galinhas

^d = Segunda dose de vacina nas Galinhas

^e = Realização da Infecção experimental nas Galinhas vacinadas

^f = Adição dos Pombos sentinelas

^g = Pombos não vacinados

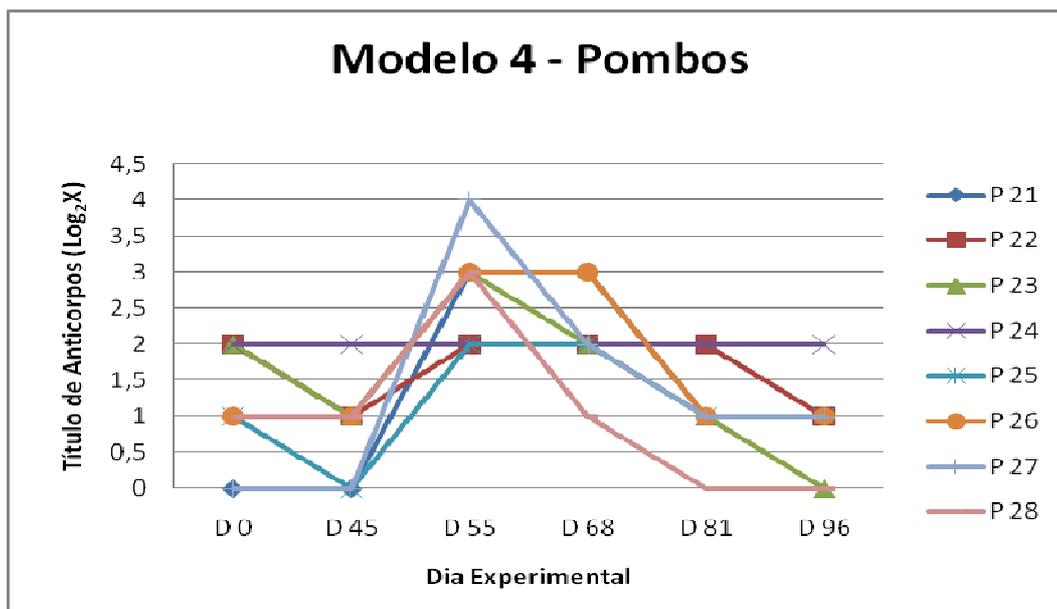


Figura 6: Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros dos pombos sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4.

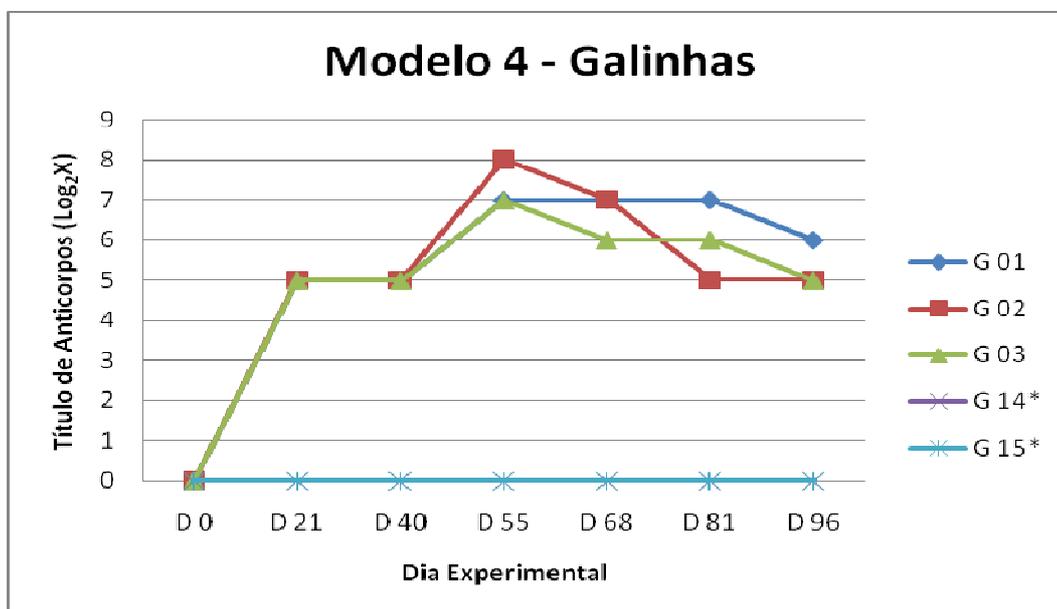


Figura 7: Representação gráfica dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (Log_2X), dos soros das galinhas vacinadas (D 0 e 21^o DE) e experimentalmente infectadas (40^o DE) em contato com galinhas sentinelas, submetidas ao Modelo Experimental 4.

5.2 Reação de Fixação de Complemento

Os resultados da avaliação dos títulos de anticorpos fixadores do complemento dos soros dos pombos submetidos aos quatro modelos experimentais, expressos em função logarítmica de base 2 (Log_2X), estão sumariados nas Tabelas de 5 a 8. Conforme pode ser denotado da análise de tais tabelas, ao contrário da reação de HI, na qual é possível observar uniformidade na resposta imune humoral, os títulos dos anticorpos fixadores do complemento não apresentaram a mesma uniformidade de resposta imune, mesmo quando avaliados individualmente, resultados obtidos de um mesmo indivíduo.

Assim, no modelo experimental 1, constituído por pombos infectados com a estirpe SJM, em dois indivíduos (P 05 e P 06) não foram detectados anticorpos fixadores do complemento. Nos demais pombos do grupo, observaram-se ocorrência de reações positivas e negativas (Tabela 5 e Figura 8). Entretanto, na ave P 03, anticorpo fixador do complemento foi detectado em apenas uma ocasião.

No modelo experimental 2, (pombos vacinados e posteriormente submetidos à infecção) a RFC não se mostrou eficaz para a mensuração da resposta imune humoral. Em uma ave (P 35) anticorpo fixador do complemento foi detectado apenas no início (35º DE), enquanto que, em outros (P 32; P 34; P 37 e P 38), só mais tardiamente, ou seja, no 85º DE (Tabela 6). Ademais, em três animais (P 30; P 31 e P 36), não foi detectado anticorpo fixador do complemento.

No modelo experimental 3, à semelhança do ocorrido no modelo experimental 1, em apenas uma ave (P 16) não foi detectado anticorpo por meio da RFC durante todo experimento. Por outro lado, anticorpos fixadores do complemento foram observados em apenas uma amostra em alguns pombos (P 11, P 15, P 18, P 19 e P 20), enquanto em outros (P 12; P 13; P14 e P 17), em duas ou mais amostras (Tabela 7).

No modelo experimental 4 anticorpos fixadores do complemento só foram detectados no 68º DE, em seis dos oito pombos (P 22, P 23, P 24, P 25, P 26 e P 28) e, no 81º DE em um deles (P 21), enquanto outro (P 27) permaneceu negativo durante todo o modelo experimental (Tabela 8 e Figura 11).

Tabela 5: Resultados dos títulos dos anticorpos fixadores do complemento (Log_2X) dos soros de pombos experimentalmente infectados (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1.

POMBOS	D 0	15º DE	28º DE	41º DE	56º DE
P 01	0	0	3	0	3
P 02	0	3	6	4	3
P 03	0	0	3	0	0
P 04	0	5	7	6	6
P 05	0	0	0	0	0
P 06	0	0	0	0	0
P 07	0	3	0	3	0
P 08	0	3	0	3	0
P 09	0	3	0	3	0
P 10	0	5	3	4	0

DE = Dia Experimental
D 0 = Dia Zero do Experimento
P = Pombo

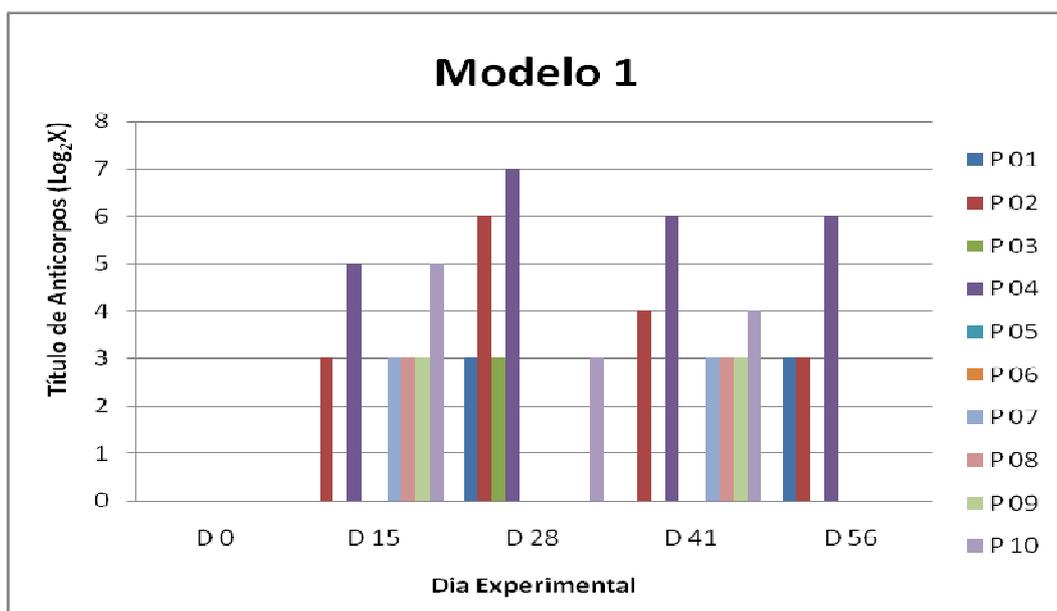


Figura 8: Representação gráfica dos títulos de anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), de soros de pombos experimentalmente infectados (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1.

Tabela 6: Resultados dos títulos dos anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos vacinados (D0 e 35^oDE) e experimentalmente infectados (61^oDE), submetidos ao Modelo Experimental 2.

POMBOS	D 0	35 ^o DE	66 ^o DE	85 ^o DE	99 ^o DE	113 ^o DE	128 ^o DE
P 29	0	0	3	5	3	3	3
P 30	0	0	0	0	0	0	0
P 31	0	0	0	0	0	0	0
P 32	0	0	0	7	0	0	0
P 34	0	0	0	6	0	0	0
P 35	0	3	0	0	0	0	0
P 36	0	0	0	0	0	0	0
P 37	0	0	0	9	7	7	6
P 38	0	0	0	6	4	3	0

DE = Dia Experimental
D 0 = Dia Zero do Experimento
P = Pombo

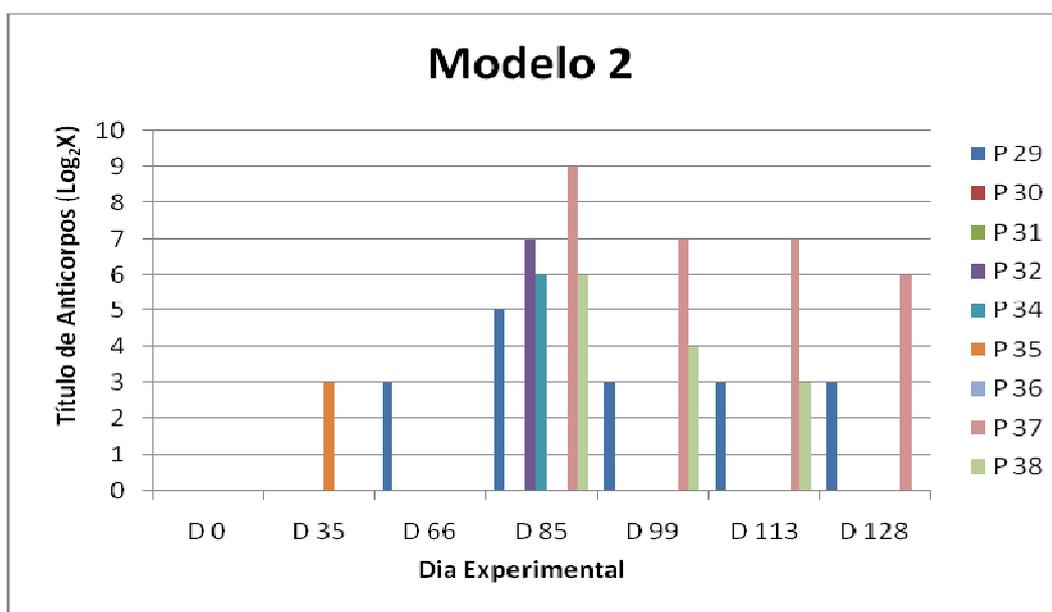


Figura 9: Representação gráfica dos títulos de anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos vacinados (D0 e 35^o DE) e experimentalmente infectados (61^o DE), submetidos ao Modelo Experimental 2.

Tabela 7: Resultados dos títulos dos anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos experimentalmente infectados (40^oDE), submetidos ao Modelo Experimental 3.

POMBOS	D 0	40 ^o DE	55 ^o DE	68 ^o DE	81 ^o DE	96 ^o DE
P 11	0	0	0	0	0	4
P 12	0	0	7	5	0	0
P 13	0	0	4	0	3	0
P 14	0	0	0	0	3	3
P 15	0	0	4	0	0	0
P 16	0	0	0	0	0	0
P 17	0	0	3	4	4	0
P 18	0	0	0	0	0	3
P 19	0	0	0	3	0	0
P 20	0	0	0	3	0	0

DE = Dia Experimental
D 0 = Dia Zero do Experimento
P = Pombo

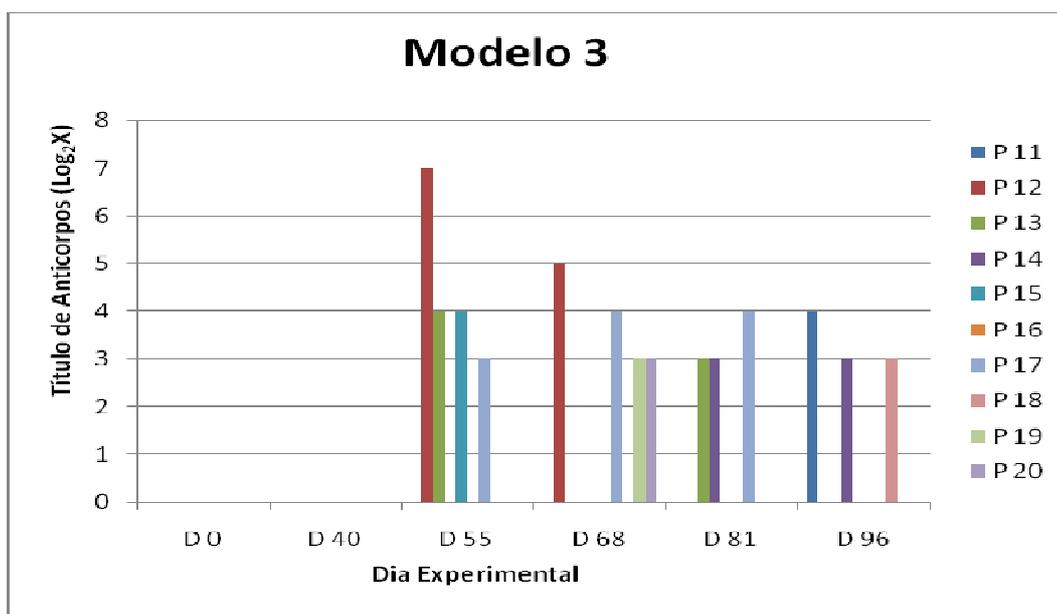


Figura 10: Representação gráfica dos títulos de anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos experimentalmente infectados (40^o DE), submetidos ao Modelo Experimental 3.

Tabela 8: Resultados dos títulos dos anticorpos fixadores do complemento (Log_2X), dos soros de pombos sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4.

POMBOS	D 0	45° DE	55° DE	68° DE	81° DE	96° DE
P 21	0	0	0	0	3	0
P 22	0	0	0	3	0	0
P 23	0	0	0	3	0	0
P 24	0	0	0	3	0	0
P 25	0	0	0	3	0	0
P 26	0	0	0	3	0	0
P 27	0	0	0	0	0	0
P 28	0	0	0	3	0	0

DE = Dia Experimental
D 0 = Dia Zero do Experimento
P = Pombo

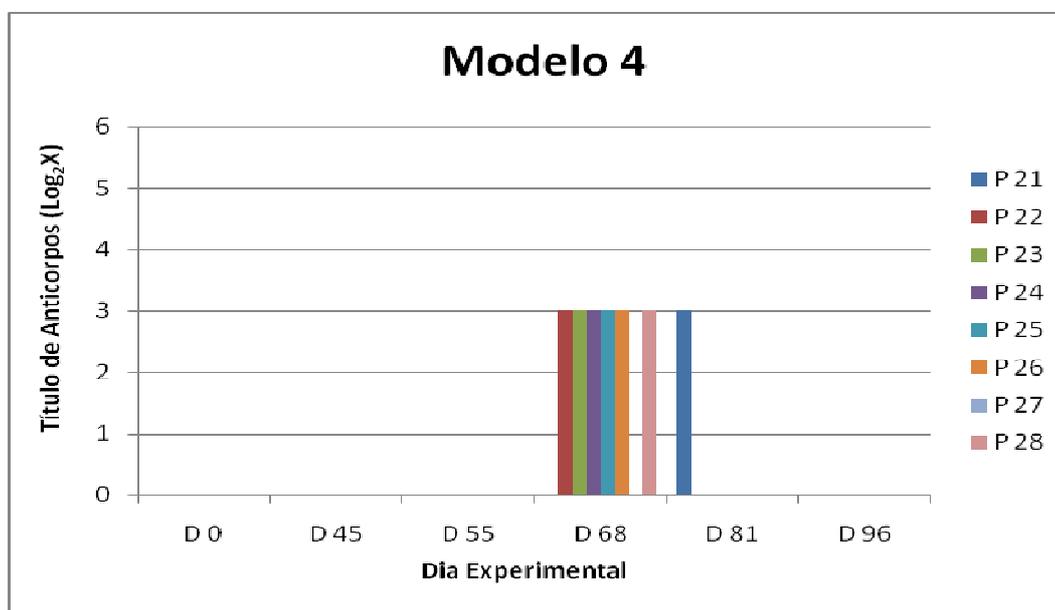


Figura 11: Representação gráfica dos títulos de anticorpos fixadores do complemento (Log_2X) dos soros de pombos sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4.

5.3 Avaliação da Eliminação do Genoma Viral

Nas Tabelas de 9 a 16 estão anotados os resultados obtidos nos experimentos de avaliação da eliminação do genoma viral, mensurados pela Reação em Cadeia pela Polimerase Pós Transcrição Reversa (RT-PCR) das aves (pombos e galinhas) submetidas aos quatro modelos experimentais. Estão também inclusos os resultados referentes à detecção dos genomas virais obtidos dos tecidos (Pulmão; Fígado; Baço e Traquéia) das aves infectadas, distribuídos segundo seus respectivos modelos experimentais. Nas aves do grupo controle,

conforme esperado, não foi detectado qualquer indício de presença de genoma viral.

Nas aves pertencentes ao modelo experimental 1 (pombos e galinhas infectados no D0), genoma do VDN foi detectado em amostras cloacais colhidas logo após as primeiras 24 horas da infecção experimental (Tabela 9). Assim, genoma do VDN foi detectado em todas as galinhas no 4º e 5º DE e também em todos os pombos, no 7º DE. Ademais, todas as galinhas vieram a óbito no 7º DE. Nos pombos houve eliminação esporádica e intermitente de genoma viral a partir do 5º DE, persistindo até o 22º DE, não havendo, contudo, ocorrência de óbito (Tabela 9).

Na tabela 10 estão anotados os resultados obtidos das aves submetidas ao Modelo Experimental 2 (pombos vacinados e desafiados no 61º DE), colocados em contato com galinhas não vacinadas). Observa-se da análise desta tabela a ocorrência, a partir do 68º DE, de uma baixa frequência de detecção do genoma viral nos pombos, a qual persistiu por apenas dois dias. Por seu turno, das quatro galinhas não vacinadas (sentinelas), em três (G 17, G 18 e G 19), ocorreu excreção de genoma viral. Observa-se ainda que a excreção viral nas galinhas teve início após o fim da eliminação viral pelos pombos experimentalmente infectados, ou seja, no 71º DE (Tabela 10).

A Tabela 11 registra os resultados obtidos no modelo experimental 3 (pombos desafiados (40º DE), em contato com galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e não vacinadas). Observa-se nos pombos desafiados ocorrência de eliminação de genoma viral 24 horas após o desafio, de modo semelhante àquela também observada no modelo experimental 1 (Tabela 11). Embora de curta duração, a maior quantidade de pombos excretando genoma viral ocorreu no 47º DE, ou seja, sete dias após a infecção inicial, tendo persistido em apenas duas aves (P 14 e P 16) até o 51º DE. As duas galinhas não vacinadas (G 12 e G 13) foram as que apresentaram maior frequência de eliminação de genoma viral, quando avaliadas comparativamente às galinhas vacinadas (G 4, G 5 e G 6), das quais em apenas uma (G 6), não foi detectado genoma viral (Tabela 11).

Na Tabela 12 estão sumariados os resultados das aves submetidas ao Modelo Experimental 4, constituído de três galinhas vacinadas e desafiadas (G 1, G 2 e G 3), em contato com oito pombos (P 21 a P 28) e duas galinhas sentinelas (G 14 e G 15). Genoma viral foi detectado tanto nas galinhas vacinadas, quanto

nas não vacinadas, mas não nos pombos sentinelas. Nas galinhas vacinadas, a eliminação de genoma viral teve início no 42º DE, ou seja, 48 horas após a infecção experimental das três galinhas vacinadas e desafiadas. Nas três galinhas vacinadas (G 1, G 2 e G 3), eliminação de genoma ocorreu de forma fugaz, não ultrapassando três dias alternados de eliminação. Por sua vez, as duas galinhas sentinelas (G 14 e G 15) eliminaram genoma viral durante quatro dias, contudo, sem ir a óbito. Nos pombos não foi observada eliminação do agente.

Tabela 9: Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, em pombos e galinhas experimentalmente infectados (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1.

DE	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	G7	G8	G9	G10	G11
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	¥	¥
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	¥	¥	¥	¥	¥
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
10	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	¥	¥	¥	¥	¥
11	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	¥	¥	¥	¥	¥
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
14	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
15	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
16	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	¥	¥	¥	¥	¥
17	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
19	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	¥	¥	¥	¥	¥
22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥

DE = Dia Experimental
 ¥ = Óbito
 (-) = Negativo
 (+) = Positivo
 P = Pombo
 G = Galinha

Tabela 10: Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, em pombos vacinados (D0 e 35º DE) e experimentalmente infectados (61º DE) em contato com galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 2.

DE	P 29	P 30	P 31	P 32	P 34	P 35	P 36	P 37	P 38	G 16	G 17	G 18	G 19
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
107	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DE = Dia Experimental
P = Pombo
G = Galinha
(-) = Negativo
(+) = Positivo

Tabela 11: Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, em pombos experimentalmente infectados (40º DE) em contato com galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 3.

DE	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	G4*	G5*	G6*	G12**	G13**
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
42	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
43	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
44	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
48	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
49	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
50	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
51	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DE = Dia Experimental
 (-) = Negativo
 (+) = Positivo
 P = Pombo
 G = Galinha
 * = Galinhas Vacinadas
 ** = Galinhas Sentinelas

Tabela 12: Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, em galinhas vacinadas (D0 e 21^o DE) e experimentalmente infectadas (40^o DE), em contato com pombos e galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4.

DE	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	G1*	G2*	G3*	G14**	G15**
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DE = Dia Experimental
 (-) = Negativo
 (+) = Positivo
 P = Pombo
 G = Galinha
 * = Galinhas Vacinadas
 ** = Galinhas Sentinelas

No que tange a avaliação da presença de genoma viral nos tecidos analisados, não se observou uniformidade de detecção entre os quatro modelos experimentais estudados (Tabelas de 13 a 16). Das 37 amostras de órgãos colhidas, genoma viral foi detectado no baço em 29,73% (11/37), no fígado em 16,22% (6/37), no pulmão em 10,81% (4/37) e na traquéia, em 2,7% (1/37). Em apenas um exemplar, pertencente ao Modelo Experimental 2 (Tabela 14), foi detectado genoma viral em todas as amostras de tecidos

Nas galinhas, a distribuição de amostras teciduais positivas dentro de cada modelo experimental também foi desigual. Entretanto, quando comparados em conjunto os resultados obtidos nos quatro modelos experimentais, observaram-se alguns resultados coincidentes nesta distribuição, ou seja, as frequências de positividade observada em baço, fígado e pulmão foram de 42,1% (8/19), 36,85% (7/19) e 31,5% (6/19), respectivamente. Em comparação, a positividade em amostras de traquéia foi inferior, ficando em 5,26% (1/19).

Tabela 13: Detecção do genoma do VDN, aferida pela RT-PCR, em amostras de tecidos de pombos e galinhas experimentalmente infectadas (D0), submetidos ao Modelo Experimental 1.

TECIDO	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	G7	G8	G9	G10	G11
BAÇO	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
FÍGADO	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PULMÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
TRAQUÉIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

P = Pombos
G = Galinhas
(-) = Negativo
(+) = Positivo

Tabela 14: Detecção do genoma do VDN, aferida pela RT-PCR, em amostras de tecidos de pombos vacinados (D0 e 35^o DE) e experimentalmente infectados (61^o DE) em contato com galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 2.

TECIDO	P29	P30	P31	P32	P34	P35	P36	P37	P38	G16	G17	G18	G19
BAÇO	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
FÍGADO	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
PULMÃO	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRAQUÉIA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

P = Pombos
G = Galinhas
(-) = Negativo
(+) = Positivo

Tabela 15: Detecção do genoma do VDN, aferida pela RT-PCR, em amostras de tecidos de pombos experimentalmente infectados (40º DE) em contato com galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 3.

TECIDOS	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	G4	G5	G6	G12	G13
BAÇO	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
FÍGADO	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
PULMÃO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRAQUÉIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

P = Pombos
G = Galinhas
(-) = Negativo
(+) = Positivo

Tabela 16: Detecção do genoma do VDN, aferida pela RT-PCR, em amostras de tecidos de galinhas vacinadas (D0 e 21º DE) e experimentalmente infectadas (40º DE), em contato com pombos e galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4.

TECIDOS	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	G1	G2	G3	G14	G15
BAÇO	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
FÍGADO	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PULMÃO	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
TRAQUÉIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

P = Pombos
G = Galinhas
(-) = Negativo
(+) = Positivo

5.4 Diferenciação Molecular (RT-PCR) entre as Estirpes Virais LaSota e São João do Meriti Eliminadas

Com o intuito de desenvolver oligonucleotídeos capazes de diferenciar a estirpe viral eliminada nas fezes, fez-se necessário em um primeiro momento o sequenciamento das duas estirpes virais utilizadas no presente estudo (LaSota - LS e São João do Meriti - SJM). Para tanto, foram desenhados os oligonucleotídeos, assim como padronizada a técnica de RT-PCR, conforme descritos no item 4.8. Desta forma, com base no tamanho do produto da RT-PCR, foi possível determinar a estirpe viral eliminada, conforme apresentado na figura 13.

As seqüências obtidas, a partir dos genes que codificam a proteína F das estirpes La Sota e SJM, utilizadas para a diferenciação molecular (RT-PCR) entre tais estirpes virais, encontram-se descritas a seguir:

Estirpe LaSota:

ATTTGATGGCAGGGCCTCTTGCAGCTGCAGGAATTGTGGTTACAGGAGACAA
AGCCGTCTACATATACACCATCATCCCAGACAGGATCAATCATAGTTAAGCTC
CTCCCGAATCTGCCCAAGGATAAGGAGGCATGTGCGAAAGCCCCCTTGGAT
GCATACAACAGGACATTGACCACTTTGCTCACCCCCCTTGGTGACTCTATCC
GTAGGATACAAGAGTCTGTGACTACATCTGGAGGGGGGAGACAGGGGGCGCC
TTATAGGCGCCATTATTGGCGGTGTGGCTCTTGGGGTTGCAACTGCCGCACA
AATAACAGCGGCCGCAGCTCTGATACAAGCCAAACAAAATGCTGCCCAACA

Estirpe São João do Meriti:

TTTTTGATGGGCAAGGGCCTTTGCAGCTGCAGGGATTGTGGTAACGGGAGAT
AAAGCAGTCAATATACACTTCATCTCAAACAGGGTTCGATCATAGTCAAGTT
ACTCCCAAATATGCCTAAGGATAAAGAGGCGTGCGCAAAGCCCCATTGGAA
GCATACAATAGAACACTGACTACTTTACTCACCCCTCTTGGTGACTCCATCCG
CAGGATACAAGGGTCTGTGAATACATCTGGAGGAAGGAGACAGAAACGCTTT
GTAGGTGCCATTATCGGCAGTGTAGCTCTTGGGGTTGCAACAGCTGCGCAGA
TAACAAGCGGCCGCGGTTCTGATACAAGCCAACCAGAATGCTGCCAAA

Os resultados da diferenciação dos fragmentos do genoma das duas estirpes virais (LaSota e SJM) eliminadas pelas aves, por meio dos oligonucleotídeos estirpe-específicos anteriormente citados, encontram-se sumariados nas Tabelas 17 a 20, para os quatro modelos experimentais.

Como pode ser observado, o produto (fragmentos de 234pb) dos genomas de VDN detectados nas amostras cloacais eliminadas, por ser compatível com fragmentos de tamanho esperado para a estirpe SJM, confirma os resultados obtidos no presente estudo. Na utilização do par de oligonucleotídeos específico para a estirpe LaSota, não foi encontrada nenhuma amostra positiva. Desta forma, sempre que foi detectada uma amostra cloacal positiva, utilizando-se o par de oligonucleotídeos “genéricos”, o fragmento de genoma detectado era compatível com a estirpe SJM. (Tabelas 17 a 20). Por isso, os resultados provenientes da utilização do par de oligonucleotídeos SJM estão dispostos na forma de tabela.

Tabela 17: Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos **São João do Meriti (SJM)**, em aves experimentalmente infectadas (D0), submetidas ao Modelo Experimental 1.

DE	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	G7	G8	G9	G10	G11
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	¥	¥
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	¥	¥	¥	¥	¥
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
10	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	¥	¥	¥	¥	¥
11	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	¥	¥	¥	¥	¥
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
14	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
15	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
16	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	¥	¥	¥	¥	¥
17	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
19	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	¥	¥	¥	¥	¥
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	¥	¥	¥	¥	¥
22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	¥	¥	¥	¥	¥

DE = Dia Experimental
 ¥ = Óbito
 (-) = Negativo
 (+) = Positivo
 P = Pombos
 G = Galinhas

Tabela 18: Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos **São João do Meriti (SJM)**, em pombos vacinados (D0 e 35^o DE) e experimentalmente infectados (61^o DE) em contato com galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 2.

DE	P29	P30	P31	P32	P34	P35	P36	P37	P38	G16	G17	G18	G19
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

DE = Dia Experimental
 (-) = Negativo
 (+) = Positivo
 P = Pombos
 G = Galinhas

Tabela 19: Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos **São João do Meriti (SJM)**, em pombos experimentalmente infectados (40^o DE) em contato com galinhas vacinadas (D0 e 21^o DE) e sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 3.

DE	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	G4*	G5*	G6*	G12**	G13**
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
42	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
43	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
44	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
46	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
48	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
49	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
50	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
51	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

DE = Dia Experimental

(-) = Negativo

(+) = Positivo

P = Pombos

G* = Galinhas Vacinadas

G** = Galinhas Sentinelas

Tabela 20: Eliminação do genoma do VDN pela cloaca, aferida pela RT-PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos **São João do Meriti (SJM)**, em galinhas vacinadas (D0 e 21^o DE) e experimentalmente infectadas (40^o DE), em contato com pombos e galinhas sentinelas, submetidos ao Modelo Experimental 4.

DE	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	G1*	G2*	G3*	G14**	G15**
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

DE = Dia Experimental

(-) = Negativo

(+) = Positivo

P = Pombos

G* = Galinhas Vacinadas

G** = Galinhas Sentinelas

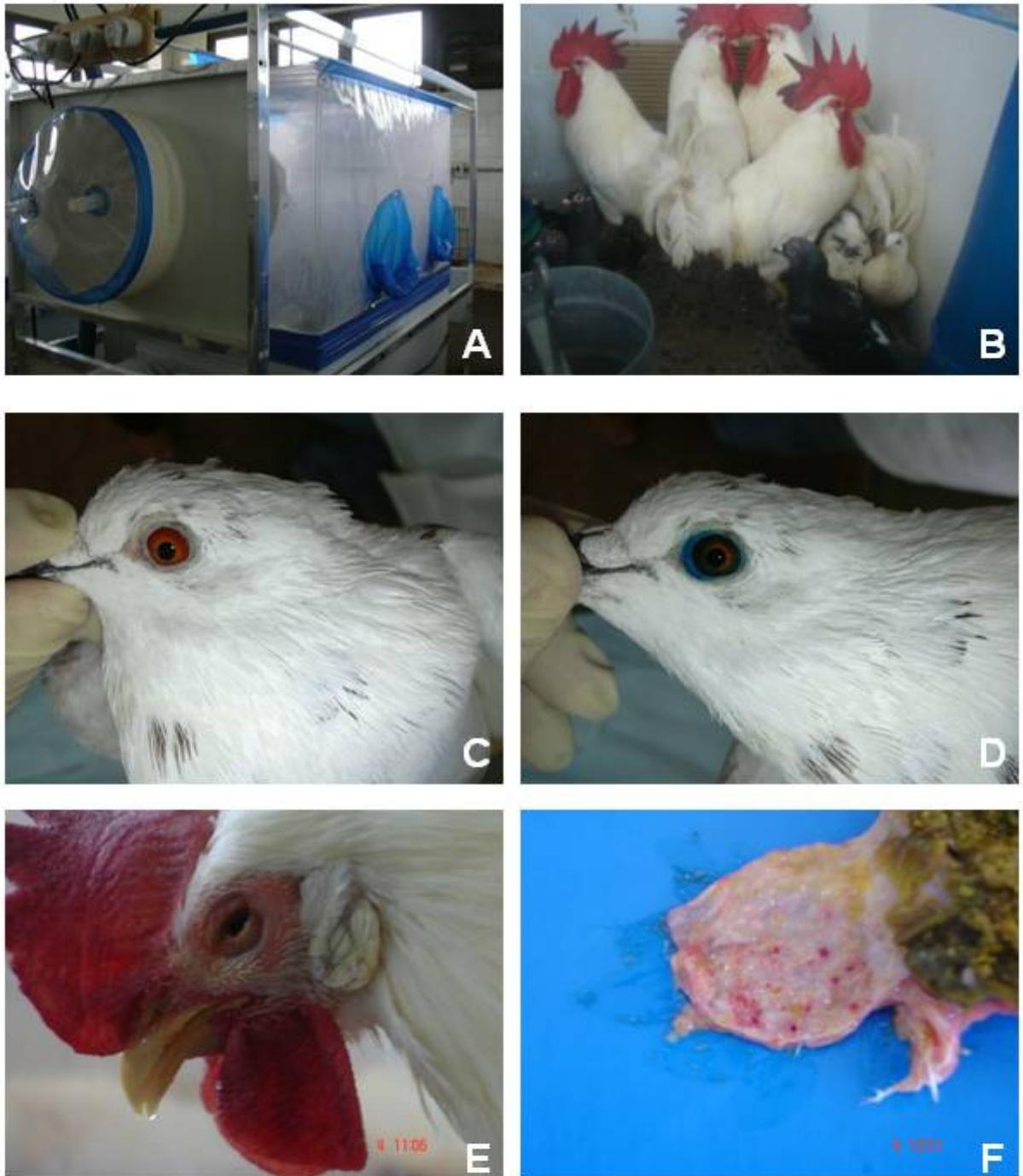


Figura 12: Ilustração e caracterização geral dos modelos experimentais: **A-** Isolador de pressão negativa, utilizado para a infecção experimental ; **B –** Galinhas e pombos compartilhando o mesmo ambiente dentro do isolador; **C-** Pombo no momento anterior à vacinação; **D -** Pombo imediatamente após a vacinação; **E-** Galinha experimentalmente infectada apresentando secreção em cavidade oral; **F-** Petéquias hemorrágicas em pró-ventrículo de galinha experimentalmente infectada.

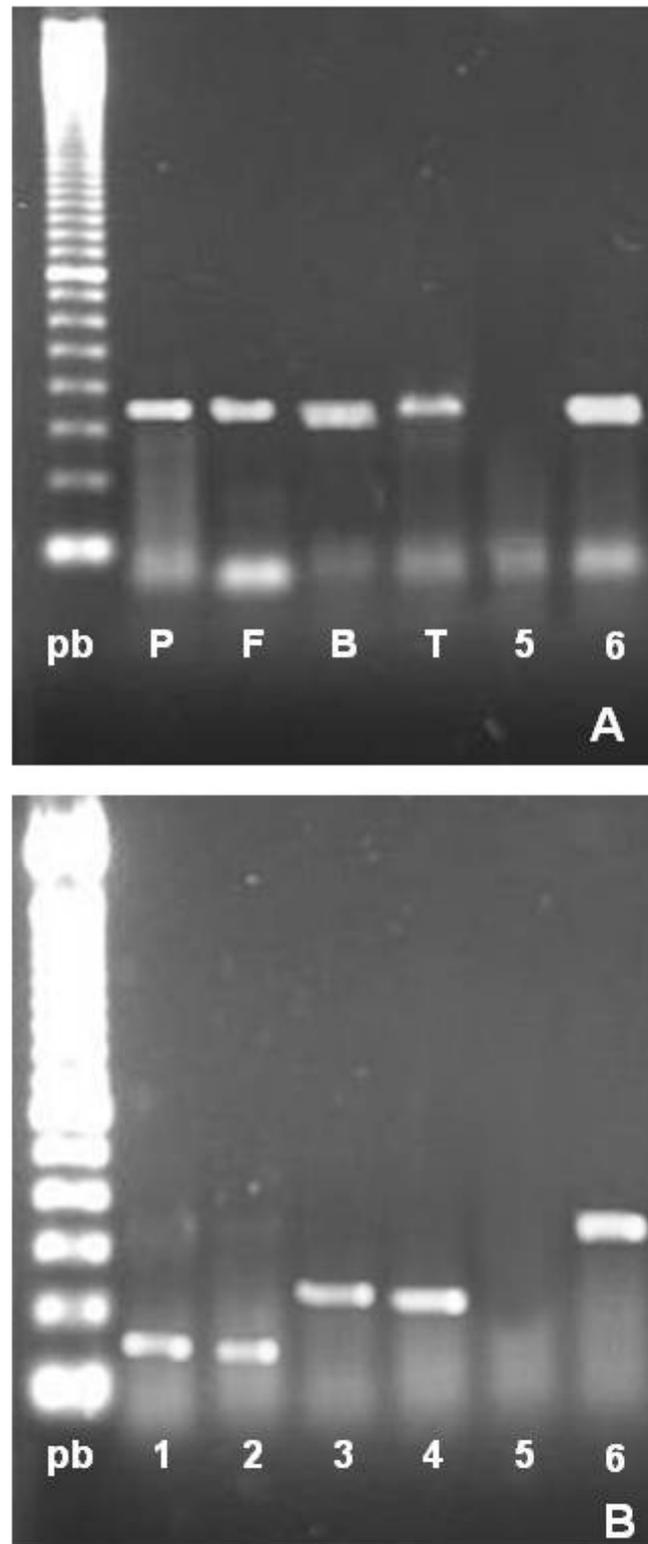


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1,2% com os produtos da RT-PCR: **A**- Amostras provenientes de tecidos (Pulmão – P; Fígado – F; Baço – B; Traquéia – T) do pombo P30, pertencente ao Modelo Experimental 2. Coluna 5 controle negativo; coluna 6 controle positivo (362pb); pb – marcador de peso molecular 100pb. **B** - Amostras provenientes de reação utilizando *primers* específicos. Colunas 1 e 2 controle positivo (*primer* LS – 120 pb) ; colunas 3 e 4 amostras positivas (*primer* SJM – 234 pb); coluna 5 controle negativo; coluna 6 controle positivo (*primer* genérico – 362 pb); pb – marcador de peso molecular 100pb.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho procurou-se efetuar um estudo no sentido de agregar o maior número de informações que as condições experimentais utilizadas permitissem no sentido de melhor conhecer as inter-relações do vírus da doença de Newcastle (VDN) com pombos e galinhas conviventes, mormente no que tange a disseminação da doença de pombos para galinhas. Conseqüentemente, reunir informações que permitam melhor avaliar os fatores envolvidos na cadeia epidemiológica da doença de Newcastle (DN), com vistas a um melhor controle desta enfermidade, tanto em plantéis de aves comerciais, quanto em aves de vida livre, no caso particular da presente pesquisa, em pombos.

De um modo geral, a literatura compulsada (ALEXANDER, 1997; ALDOUS e ALEXANDER, 2001) tem mostrado que, com exceção de estudos realizados em aves comerciais, nas demais espécies aviárias, particularmente as de vida livre, pouco tem sido descrito sobre a transmissão e o comportamento do VDN. Nesse aspecto, particularmente no que diz respeito à forma pela qual a doença tem início em um plantel avícola, não existe consenso formado entre os vários autores (ALEXANDER, 1997; ALDOUS e ALEXANDER, 2001; BARBEZANGE e JESTIN, 2005b). Assim sendo, estudos experimentais que correlacionem aspectos relacionados à vacinação e a infecção experimental, procedimentos de uso rotineiro no estudo da patogenia da DN (BEARD e BRUGH, 1975; ALEXANDER et al., 1984a; ALEXANDER et al., 1984b; ALEXANDER e PARSONS, 1984c; ALEXANDER, 1997), quando se trata de avaliação da resposta comportamental de pombos e galinhas frente a uma estirpe patogênica do VDN, certamente fornecerão informações de extremo valor para um melhor entendimento da resposta imune das aves.

Em linhas gerais, tem sido aceito que a disseminação do VDN entre pombos e galinhas ocorre por contato natural entre tais espécies ou de forma iatrogênica (UJVARI et al., 2003). Dentro de tais contextos, modelos experimentais de infecção sob condições experimentais controladas, permitem uma melhor avaliação da infectividade e transmissibilidade do vírus, assim como permite avaliar o comportamento de vacinas, particularmente com relação à

ocorrência de mortalidade, o surgimento de sinais clínicos da doença além da prevenção ou redução da excreção viral.

Assim, no que diz respeito aos resultados decorrentes do modelo experimental 1, como já era esperado, todas as galinhas vieram a óbito no 6º DE (Dia Experimental), confirmando, conforme já demonstrado (CARRASCO, 2005; CARRASCO et al., 2008a; CARRASCO et al. 2009), que a estirpe São João do Meriti (SJM) possui alta patogenicidade para esta espécie aviária e, ademais, validando os resultados obtidos nos demais modelos experimentais (modelos 2, 3 e 4), realizados na presente investigação. De um modo geral, nas galinhas que vieram a óbito foram observados sinais respiratórios e, de forma secundária, sinais nervosos, ambos compatíveis com a DN. Entretanto, conforme já observado em trabalho anterior (CARRASCO et al., 2008), durante todo período experimental, os pombos infectados não apresentaram qualquer sinal clínico passível de levantar suspeita de DN.

Do ponto de vista sorológico, analisado em conjunto, os níveis de anticorpos detectados por meio da Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI) apresentaram comportamento usualmente observado nesta doença, tendo seu ponto máximo ocorrido por volta do 15º DE (Tabela 1 e Figura 1), declinando posteriormente de forma gradual. Quanto aos resultados obtidos pela Reação de Fixação do Complemento (RFC), os títulos dos anticorpos (Tabela 5 e Figura 8), apenas foram significativos em 8 dos 10 pombos pertencentes ao grupo e, mesmo assim, não adequadamente reprodutíveis. De um modo geral, tais resultados, particularmente no que tange a reprodutibilidade da reação, quando analisados comparativamente aos obtidos pela reação de HI, estão compatíveis aos resultados obtidos por Wilcox e Consigli (1972). Segundo demonstraram esses autores, anticorpos fixadores do complemento são detectados mais tardiamente, quando comparados aos anticorpos inibidores da hemaglutinação. Ademais, tais anticorpos são dependentes da dose infectante do vírus viável, desencadeando diferentes respostas observadas nesta reação, impossibilitando, desta forma, a obtenção de resultados reprodutíveis, quando da interpretação dos dados obtidos. Daí, concluir-se que a RFC não deva ser a técnica mais adequada para o estudo sorológico da DN, conforme recomendado no passado para tal espécie aviária (RICE, 1961), particularmente diante dos recursos sorológicos atuais e da excelente relação custo x benefício da técnica de HI. Comportamento

semelhante, quando analisados comparativamente os dados obtidos na RFC com os de HI, também foi observado na avaliação sorológica dos demais modelos experimentais (Tabelas 6 a 8; Figuras 9 a 11).

No que diz respeito à pesquisa de genoma viral (Tabela 9), avaliado por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR), ficou demonstrado que pombos eliminam genoma viral a partir do primeiro DE, persistindo até o 22º DE, sempre na ausência de sinais clínicos. O máximo de eliminação viral observado ocorreu no 6º e 7º DE, momento em que foi possível detectar genoma viral nas amostras de *swabs* cloacais colhidas de todos os pombos. Nas galinhas que vieram a óbito até o 6º DE foi detectado genoma viral nas amostras colhidas a partir do primeiro DE, assim como em todas as aves no 4º e 5º DE, até o momento da morte das aves. Nesse aspecto, tais achados diferem daqueles obtidos anteriormente (CARRASCO et al. 2008), nos quais pombos submetidos às mesmas condições experimentais da presente pesquisa, iniciaram a eliminação de genoma viral por volta do 5º DE, permanecendo eliminando vírus até o 24º DE. Possivelmente, a divergência entre esses resultados possa ser atribuída à maior concentração viral utilizada no presente estudo, ou seja, 0,2 mL da estirpe patogênica SJM (Título infectante igual a $10^{9,0} \text{L}_{50} / 0,1 \text{ ml}$) na sua concentração original padrão, sem qualquer diluição, quando comparadas às utilizadas no estudo anterior (CARRASCO, 2005; CARRASCO et al., 2008), no qual foi utilizada a diluição de $10^{7,0} \text{L}_{50} / 0,1 \text{ ml}$ a partir da amostra original ($10^{9,0} \text{DL}_{50} / 0,1 \text{ ml}$), ou seja, muito menos concentrada. Por outro lado é oportuno enfatizar que os resultados obtidos na presente pesquisa contrastam com os achados de Erickson et al. (1980), provavelmente devido à divergência de patogenicidade das estirpes de VDN utilizadas nas diferentes pesquisas. Diferentemente da estirpe SJM, altamente patogênica para galinhas, mas não para pombos, a estirpe de VDN utilizada por esses autores era patogênica para galinhas e também para pombos. E ainda, no estudo realizado por esses autores, também houve necessidade de uma dose viral 10.000 vezes maior para induzir a doença em pombos, comparativamente à dose necessária para provocar a doença em galinhas. Sobre esse aspecto, a ampla variedade individual existente entre as diversas estirpes de VDN isoladas mundialmente, as quais apresentam diferentes níveis de patogenicidade

(ALEXANDER et al., 1985; ALEXANDER, 1997; PANSHIN et al., 2002), seria a hipótese mais plausível para explicar a discordância entre os resultados das pesquisas realizadas. Daí, a importância de estudos realizados com estipes autóctones do VDN para uma melhor compreensão da dinâmica da doença numa determinada região ou país.

Outro aspecto a ser ponderado na presente pesquisa diz respeito à escolha da cloaca como fonte para a colheita de amostras com vistas à detecção da eliminação viral. A escolha dessa via foi feita com o propósito de melhor simular as condições naturais envolvidas quando da ocorrência da enfermidade, principalmente aquelas relacionadas à porta de entrada e a via de eliminação do agente. Na presente investigação, o fato da infecção experimental ter sido realizada pela via óculo-nasal, tornaria questionável a utilização da traquéia, reconhecidamente um dos principais sítios iniciais de replicação do VDN, como local ideal de colheita de amostras, apesar de ser esta a via de eleição usada por diversos pesquisadores (VICKERS e HANSON, 1980; ALEXANDER et al., 1984b; BARBEZANGE e JESTIN, 2003a; BARBEZANGE e JESTIN, 2005b). Nestas condições, seria dificultoso analisar os dados resultantes da eliminação traqueal do vírus, devido à impossibilidade de afirmar categoricamente se o vírus detectado na traquéia seria decorrente do processo de replicação local, da patogenia do agente, ou seria resquício da estirpe viral inoculada por esta via. Dentro deste enfoque, merece especial atenção o fato de que amostras colhidas da cloaca permitem uma melhor reprodução dos fatores epidemiológicos envolvidos durante a ocorrência natural de um surto da doença, em condições de campo. Portanto, em se tratando de colheita de amostras em aves naturalmente infectadas, ou em procedimento de monitoramento de populações aviárias, esta seria, sem sombra de dúvida, uma importante fonte de material, seja para isolamento viral, seja para técnicas moleculares (ZANETTI et al., 2005). É importante enfatizar também que, nas condições de alta carga viral resultante da inoculação por via óculo-oral, conforme utilizado no presente trabalho, não se deve descartar a possibilidade da ocorrência de passagem de partículas virais diretamente pelo trato gastrointestinal. Nestas condições, devido à alta concentração viral, provavelmente haveria uma exacerbação da enfermidade, fato que poderia melhor explicar o rápido aparecimento de genoma nas fezes,

conforme detectado pela RT-PCR. Embora seja impossível avaliar em condições de campo, a dose viral necessária para dar início ao processo da doença, é usualmente aceito que a carga viral utilizada em infecções experimentais seja substancialmente bem maior que aquela observada em surtos espontâneos da doença, fato que deve ser considerado no momento da interpretação dos resultados, consoante revelam Kapczynski et al., 2006. Contudo, os resultados do tempo de eliminação viral, resultante da infecção experimental em pombos, obtidos no presente trabalho, são compatíveis com os encontrados por outros autores (BIANCIFIORI e FIORONI, 1983; ALEXANDER et al., 1985; ALEXANDER e PARSONS, 1986; ALEXANDER, 1997; PANSHIN et al., 2002).

Outro aspecto a ser ponderado diz respeito à influência da idade sobre a susceptibilidade de uma espécie aviária ao VDN. Conforme relatado na literatura compulsada (BEARD e BRUGH, 1975; ERICKSON et al., 1980; KAPCZYNSKI et al., 2006), aves jovens são mais susceptíveis ao VDN do que as adultas, assim como eliminam VDN por um período maior de tempo (KAPCZYNSKI et al., 2006). Ademais, aves de diferentes idades e, conseqüentemente apresentando diferentes níveis de imunidade, desempenham importante papel para manutenção do vírus em uma população (BARBEZANGE e JESTIN, 2005a; MILLER et al., 2007; LI et al., 2008). Na presente investigação foram utilizados pombos adultos de vida livre que, apesar de experimentalmente infectados, não apresentaram sinais clínicos da DN, assim como anticorpos anti-VDN, indícios de que, no momento da captura, não havia circulação do VDN. Diante dessas considerações iniciais, na presente investigação procurou-se simular experimentalmente, o mais próximo possível, as condições e fatores envolvidos quando da ocorrência natural da DN. Assim sendo, foi utilizada a via óculo-oral para inoculação do VDN, por ser esta a porta de entrada natural do agente, quando da ocorrência de um surto em condições de campo. Nestas condições, os achados obtidos na presente investigação estão compatíveis com os resultados encontrados por Alexander et al.(1984b) os quais, utilizando uma estirpe proveniente de pombos para realização de infecção experimental, também não conseguiram levar a óbito pombos inoculados pela via intranasal. Contudo, quando utilizaram a via intravenosa, 100% dos pombos infectados vieram a óbito, apesar de não ser esta a porta de entrada natural do VDN, fato este não eximir

sua relevância. E ainda, durante o decurso desse experimento (ALEXANDER et al., 1984b), galinhas SPF mantidas em contato com pombos inoculados por via intranasal apresentaram soro-conversão, eliminação viral, porém nenhum sinal clínico da doença.

Comportamento antagônico de uma estirpe do VDN, quando inoculada em hospedeiros diferentes, também foi observado na presente investigação, uma vez que 100% das galinhas vieram a óbito em um curto intervalo de tempo, enquanto pombos em contato, ou experimentalmente infectados, permaneceram saudáveis. Ademais, nenhum pombo inoculado com a estirpe SJM, apresentou sinal clínico compatível com a DN, ou seja, diarréia; dificuldade respiratória; ataxia e sinais neurológicos, entre outros. Corroborando a este fato, galinhas infectadas pela via óculo-oral com uma estirpe do APMV-1 patogênica para pombos, também não apresentaram sinal clínico da DN (BARBEZANGE e JESTIN, 2005b). E ainda, tais achados vêm confirmar os resultados obtidos por estes mesmos autores, os quais relataram que galinhas de quatro semanas de idades infectadas com uma estirpe do PPMV-1 de alta patogenicidade para pombos, permaneceram clinicamente saudáveis após o desafio (BARBEZANGE e JESTIN, 2003a).

Este comportamento díspar do VDN, de promover rapidamente o óbito em algumas espécies aviárias, enquanto outras não apresentam quaisquer sinais clínicos, tem sido alvo de inúmeras pesquisas e algumas hipóteses já foram aventadas acerca deste tema. Dentro do contexto molecular da patogenia dos Paramyxovirus, a virulência é o resultado de uma relação complexa entre o vírus e seu hospedeiro, no qual a capacidade de uma estirpe viral em provocar doença está intimamente relacionada, dentre vários outros fatores, com a capacidade das proteases do hospedeiro ter ou não em clivar certas estruturas polipeptídicas virais. (ALEXANDER et al., 1984). Em assim sendo, é bem provável que a especificidade das proteases dos pombos seja diferente da especificidade das proteases das galinhas, o que poderia explicar em parte os resultados obtidos na presente pesquisa. Contudo, a seleção de estirpes virais susceptíveis a proteases de um hospedeiro, não necessariamente exclui a possibilidade de ocorrer, de forma simultânea, susceptibilidade a proteases de outro hospedeiro (ALEXANDER et al., 1984). Sobre esse aspecto, tem sido relatado que estirpes virais isoladas de aves selvagens necessitam de algumas passagens em galinhas, para que ocorra primeiramente adaptação a esta espécie e,

conseqüentemente, aumento de patogenicidade (KOMMERS et al., 2003). Portanto, é válido inferir que, em condições naturais de campo, a possibilidade da ocorrência de surtos de DN é passível de ocorrer, caso uma estirpe patogênica seja introduzida em uma nova área, até então com um baixo desafio (ALEXANDER, 1995).

Além dos fatores relacionados à proteína F, mutações relacionadas à proteína HN também são determinantes de patogenicidade. Mutações em níveis desta proteína potencializam mutações que ocorrem na proteína F. Assim, galinhas inoculadas com E.G.M. (estirpes geneticamente modificadas), alteradas tanto na proteína F quanto na proteína HN apresentaram acréscimo na severidade dos sinais clínicos apresentados, quando comparadas àquelas que foram inoculadas com E.G.M. apenas com mutações na proteína F (WAKAMATSU et al., 2006).

A técnica de RT-PCR, realizada com seqüências de oligonucleotídeos (OBERDÖRFER E WERNER, 1998) previamente descritas por Toyoda et al. (1989), foi utilizada no presente trabalho. Em síntese, confirmando estudos anteriores (KANT et al., 1997; SOARES, 2002; CARRASCO, 2005; CARRASCO et al., 2008; LI et al., 2008; CARRASCO et al. 2009), a amplificação do VDN, utilizando seqüências de oligonucleotídeos, se constitui em um método prático, rápido e seguro a ser utilizado no diagnóstico da DN. Ressalte-se que a RT-PCR, realizada em apenas uma etapa, reduz a possibilidade de reação cruzada, além de permitir a obtenção de resultados dentro de 24-36 horas após a recepção das amostras (CREELAN et al., 2002), conforme comprovado no presente trabalho, no qual todas as etapas de detecção molecular da eliminação viral, desde a colheita das amostras até o resultado final, não ultrapassaram 24 horas. E, ademais, ocorre independentemente da estirpe, da patogenicidade e da espécie hospedeira infectada (OBERDÖRFER e WERNER, 1998).

Em relação aos resultados obtidos no Modelo Experimental 2, constituído por pombos imunizados com duas doses da vacina LaSota, antes de serem infectados com a estirpe viral patogênica SJM, como já esperado, houve soro-conversão apreciável, com título máximo de anticorpos ocorrendo por volta do 85º DE (Dia Experimental) (Tabela 2 e Figura 2). Da análise da tabela 2 e

figura 3 verifica-se que as galinhas (sentinelas) colocadas em contato no 66º DE, ou seja, no quinto dia após a infecção dos pombos com a estirpe SJM, permaneceram soro negativas durante todo o experimento. Atribui-se tal resultado a proteção vacinal inicialmente adquirida pelos pombos, a qual teria impedido a eliminação viral e, conseqüentemente, a infecção das galinhas sentinelas. Embora tenha ocorrido proteção vacinal, genoma viral foi detectado nas fezes de 4 dos 10 pombos vacinados, ainda que somente no 3º e 4º DE, ou seja, em uma constancia de eliminação significativamente menor, quando comparada aos pombos não vacinados do Modelo Experimental 01 (Tabela 9). Ademais, merece ser enfatizado o fato de 3 das 4 galinhas em contato, terem eliminado genoma do VDN, sem contudo terem apresentado soro-conversão e, tampouco, qualquer sinal clínico da enfermidade.

Algumas hipóteses poderiam ser levantadas para explicar tal resultado. Uma delas poderia ser atribuída à alteração da infectividade da estirpe patogênica, com a conseqüente eliminação de partículas virais defectivas ou modificadas induzidas pela vacinação. Nestas condições, a estirpe viral modificada seria incapaz de estimular o sistema imune da ave, conforme ficou comprovado pela ausência de anticorpos, assim como de manifestações clínicas da enfermidade. Outras hipóteses estariam relacionadas à baixa fidelidade da RNA polimerase, bem como a possibilidade da produção de novas partículas virais, intimamente relacionadas, porém distintas, denominadas de *quasispecies* (DOMINGO, 2002; BARBEZANGE e JESTIN, 2005a). Dentro de tal contexto, o conceito de *quasispecies* oferece uma interessante perspectiva para explicação da patogenia e evolução dos vírus de RNA (BARBEZANGE e JESTIN, 2005a), cuja variabilidade está baseada em três pontos principais: mutação; recombinação e rearranjo genômico (COMAS et al., 2005).

Desta forma, infecções experimentais realizadas com o PPMV-1 em pombos, revelaram que, após seis passagens realizadas pelo contato entre aves infectadas e não infectadas, há o surgimento de *quasispecies*, fato comprovado pelo sequenciamento das amostras colhidas a partir de *swabs* cloacais (BARBEZANGE e JESTIN, 2005a). Todavia, tais variantes encontradas, não apresentaram modificações no Índice de Patogenicidade Intracerebral (ICPI), nem no sítio de clivagem F, mas apenas no genótipo, sugerindo que nem sempre as variantes induzem alteração na patogenicidade viral. Ademais, conforme

experimentalmente demonstrado, após passagens em séries em pombos, embora a estirpe inicial ainda fosse do PPMV-1, foram detectados fragmentos da proteína F compatíveis com estirpes do APMV-1 (BARBEZANGE e JESTIN, 2005a). A grande dificuldade de um melhor estabelecimento de um padrão no que diz respeito a *quasispecies* é que, além de muitas vezes os experimentos realizados *in vitro* não reproduzem exatamente o que ocorre *in vivo*, este fenômeno é extremamente difícil de ser previsto e/ou controlado (BARBEZANGE e JESTIN, 2005b).

A principal hipótese aventada em literatura tem sido uma recombinação de uma estirpe vacinal com uma estirpe virulenta (*quasispecies*), considerando que genotipicamente a estirpe viral em questão apresenta ambas as características. 22º DE Em síntese, o fenômeno de recombinação descrito no estudo em tela, já havia sido descrito anteriormente para o APMV-1 (BARBEZANGE e JESTIN, 2005b). Fato que chamou a atenção destes pesquisadores foi que os pombos dos quais foi isolada esta amostra de APMV-1 não haviam sido vacinados previamente (BARBEZANGE e JESTIN, 2005a; BARBEZANGE e JESTIN, 2005b). Contudo, conforme anteriormente relatado (CARRASCO et al. 2009), o simples contato de pombos com galinhas vacinadas contra a DN com a estirpe vacinal viva (LaSota ou Ulster) já é capaz de induzir resposta imune humoral e , posteriormente a eliminação viral. Desta forma, estudos epidemiológicos objetivando o monitoramento de populações de aves de vida livre de uma maneira geral, devem ser realizados de forma constante (ALEXANDER et al., 1984; WOBESER et al., 1993; PANSWIN et al., 2002).

Dentro deste contexto, é importante salientar que a técnica de RT-PCR permite a detecção de fragmentos do genoma do agente, mas não a detecção do vírion. Dessa forma, nas condições experimentais do presente estudo, as galinhas sentinelas seguramente teriam entrado em contato com fragmentos do genoma do VDN, os quais são incapazes de promover a doença e, conseqüentemente, desencadear resposta imune da ave. Nestas condições, fragmentos do genoma do VDN seriam detectados por uma técnica de alta sensibilidade analítica, como a RT-PCR. Tal característica apresentada por técnicas moleculares é um dos grandes diferenciais da referida técnica, particularmente quando comparado ao isolamento viral, já que amostras que perderam sua infectividade podem ser detectadas pela RT-PCR, conforme já relatado por Kho et al., (2000).

Portanto, o surgimento destas *quasispecies*, acrescido ao papel desempenhado pelas proteases do hospedeiro citadas anteriormente, poderá agregar informações para a explicação desta resposta díspar, qual seja, de duas espécies aviárias (pombos e galinhas), frente a uma estirpe viral, reconhecidamente de alta patogenicidade.

O Modelo Experimental 3 diz respeito a galinhas vacinadas e não vacinadas colocadas em contato com pombos infectados. Nenhuma ave (galinhas e pombos) apresentou qualquer sinal clínico da DN, nem mesmo as sentinelas. Esta proteção, quantificada pela presença de altos títulos de anticorpos na técnica de HI (Tabela 3; Figuras 4 e 5), se deve possivelmente nas proteínas HN e F da amostra vacinal, que induzem uma excelente proteção, fato já amplamente descrito em galinhas (MAAS et al., 2003; MILLER et al., 2007). Ainda neste modelo, as galinhas sentinelas também apresentaram soro-conversão apreciável ao fim do período experimental (81^o DE), conseqüentemente decorrente do estímulo ao sistema imune da ave, evidenciando a circulação do agente (Tabela 3 e Figura 5). Neste grupo, os pombos infectados apresentaram um período intenso de eliminação do genoma viral, fato que possibilitou a infecção e estimulação do sistema imune das aves, confirmando a imunogenicidade do VDN. Tal tipo de transmissão por contato direto já havia sido previamente descrita entre patos e galinhas, assim como a contaminação do ambiente pelo vírus excretado nas fezes (ONAPA et al., 2006).

Todavia, mesmo diante desta grande eliminação viral (Tabela 11), a estirpe eliminada pelos pombos foi incapaz de causar a doença nas aves SPF, ainda que estas também eliminassem o genoma do VDN durante 16 dias, mesmo que de forma intermitente. Este fato possivelmente encontre explicação na adaptação da estirpe SJM, reconhecidamente altamente patogênica para galinha, a um novo hospedeiro (pombo) e, ainda, a possibilidade de tal adaptação ter promovido atenuação da estirpe viral a seu hospedeiro original (galinha), possivelmente devido ao fenômeno de *quasispecies*.

O Modelo Experimental 4, constituído por galinhas vacinadas, desafiadas e, a seguir colocadas em contato com pombos e galinhas não vacinados, deixa claro a proteção promovida pela estirpe vacinal LaSota, comprovada pela presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação e ao fato

de nenhuma ave infectada ter apresentado sinal clínico da DN. Ademais, nem pombos e galinhas apresentaram soro-conversão (Tabela 4; Figuras 6 e 7). Os pombos mantiveram níveis inespecíficos de anticorpos (Títulos de Anticorpos $\leq 2^2$) e nas galinhas, sequer foram detectados anticorpos. Em síntese, conforme já observado no Modelo Experimental 2, as aves vacinadas e desafiadas apresentaram altos títulos de anticorpos, e eliminação do genoma viral (Tabelas 4 e 12). Contudo, o genoma viral eliminado, não foi suficiente para deflagrar resposta imune, tanto nos pombos, como nas galinhas sentinelas. Desta forma, foi possível detectar nas galinhas, genoma viral em amostras de swabs cloacais, mesmo na ausência de anticorpos detectáveis pela técnica de HI, conforme anteriormente relatado no Modelo Experimental 2. Entretanto, nos pombos sentinelas não foi detectada resposta imune, assim como, eliminação do genoma viral.

No que diz respeito a medidas profiláticas utilizada no combate a DN a vacinação seja é prática indispensável e rotineiramente aplicada na agroindústria avícola. Assim sendo, no delineamento do presente estudo, foi escolhida a estirpe vacinal LaSota por ser esta a mais utilizada para imunização de aves comerciais, face sua capacidade em induzir bom nível de proteção, independente da estirpe patogênica envolvida (JEON et al., 2008). Contudo, há relatos de falhas em programas de imunização, quando na ocorrência de surtos, nos quais estão envolvidas estirpes altamente virulentas. (PANSKIN, et al., 2002; MILLER et al., 2007). Entretanto, tal fato não foi observado no presente estudo, no qual a estirpe LaSota foi capaz de impedir a ocorrência de sinais clínicos em galinhas experimentalmente infectadas com uma amostras de alta patogenicidade (SJM), sendo que estas estirpes são geneticamente distintas.

Dentre os principais fatores que devem ser levados em consideração para adoção de um programa de vacinação contra a DN estão: capacidade da vacina em induzir proteção efetiva contra estirpes virais de alta patogenicidade; apresentar segurança para uso; não ser patogênica e, não apresentar reversão de patogenicidade (GALLILI e BEN-NATHAN, 1998). No presente trabalho, todos estes preceitos foram observados uma vez que nenhuma ave (pombos ou galinhas) apresentou qualquer reação adversa frente a vacina, além de terem produzido altos níveis de anticorpos (Tabelas 2 a 4), capazes de protegerem

frente ao desafio. Deste modo, o monitoramento dos níveis de anticorpos se apresenta de suma importância, para garantir o sucesso de um programa de vacinação (EZEMA et al., 2008).

De fato, existe uma correspondência entre altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação e a resistência da ave ao desafio, frente a uma estirpe virulenta do VDN, assim como altos títulos em HI podem produzir proteção de até seis meses (OWOLODUN e AJYBOIE, 1975; RICHTZENHAIN, 1988; RICHTZENHAIN, et al., 1993). Desta forma, a porcentagem de aves sobreviventes a um desafio está diretamente relacionada aos níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação e, ademais, a técnica de HI se mostra eficaz na avaliação de um programa de vacinação (MONTENEGRO, 1978; MAAS et al., 2003; KAPCZYNSKI e KING, 2005; EZEMA et al., 2008). Nesta ordem de idéias, no trabalho em tela, títulos de anticorpos mensurados pela técnica de HI superiores a 64 foram capazes de proteger frente ao desafio, conforme demonstrado nos Modelos 3 e 4 (Tabela 3 e 4). Consoante revelam Kapczynski e King, (2005), aves com altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação ($\geq 2^8$), dispensam aumento de doses vacinais, pois a proteção frente ao desafio se torna semelhante, inclusive no aspecto de eliminação viral. Por outro lado, aves com baixos níveis de anticorpos vacinais podem continuar susceptíveis a uma infecção pelo VDN, hipótese passível de explicar a ocorrência de surtos, mesmo em locais onde a vacinação é prática rotineira (JEON et al., 2008). Todavia, tal fato não foi observado no presente estudo, uma vez que todas as aves vacinadas atingiram altos níveis de anticorpos. Não obstante, na presença de fatores imunossupressores (infecciosos ou não), pode haver decréscimo dos níveis de anticorpos, e, conseqüentemente, surgimento de surtos da enfermidade (PANSWIN et al., 2002).

Embora a estirpe vacinal utilizada tenha induzido produção de altos títulos de anticorpos e a conseqüente proteção da ave frente ao aparecimento da doença, a vacina não foi capaz de impedir a eliminação do genoma viral, conforme já observado nos modelos experimentais 2, 3 e 4, independente da espécie vacinada (pombos ou galinhas) (Tabelas 10 a 12). Contudo, mesmo na ocorrência de eliminação viral, esta foi significativamente menor, quando comparada à eliminação pelas aves não vacinadas (Tabela 9 e 11). Corroborando com estes dados, as estirpes vacinais LaSota e Ulster se mostraram eficientes na

proteção à infecção experimental, frente a mortalidade ou mesmo ao surgimentos de sinais clínicos. Entretanto, a eliminação viral quantificada por isolamento, revelou que aves vacinadas continuaram a apresentar a eliminação viral, contudo, com níveis menores daqueles apresentados pelas aves não vacinadas (JEON et al., 2008). Por outro lado, utilizando metodologia diferente, Kapczynski e King, (2005), demonstraram que galinhas imunizadas com vacinas vivas, submetidas a IE, apresentaram, também apresentaram diminuição na eliminação viral, quando comparadas àquelas imunizadas com vacinas inativadas, embora os dois grupos de aves apresentassem títulos de anticorpos semelhantes, medidos pelas técnicas de HI e Elisa. A hipótese mais plausível para tal explicação seria a imunidade local induzida pela vacina viva, que potencializa a ação dos anticorpos circulantes, aumentando a eficácia de um programa de vacinação (KAPCZYNSKI e KING, 2005). De fato, este acréscimo da proteção conferido por vacinas vivas aplicadas pela via ocular, foi observado no presente estudo (Tabelas 10 a 12). Outro ponto observado no estudo em questão e que deve ser ressaltado é o fato das mucosas serem o sítio inicial de replicação viral. No caso particular do VDN a resposta imune local possivelmente reduziu os danos de uma infecção sistêmica, além de, possivelmente estar envolvido na redução da eliminação viral, conforme já demonstrado em estudos anteriores (TAKADA e KIDA, 1996).

A persistência de eliminação viral, mesmo em animais imunizados pode sugerir que, aves vacinadas podem permanecer como reservatórios ou fontes de infecção, especialmente através da fezes e/ou materiais contaminados (MILLER et al., 2007; JEON et al., 2008). Em contrapartida, autores relacionam que, em determinadas situações de surtos da DN, a redução da eliminação viral é de crucial importância para controle de uma maior disseminação do agente, ou seja, a vacina protege frente a um quadro de doença, contudo não impede a infecção e a consequente eliminação viral (KAPCZYNSKI e KING, 2005; MILLER et al., 2007).

No que diz respeito ao delineamento de um programa de vacinação, com vistas a imunização de pombos, fica evidente no presente trabalho que a aplicação de duas doses vacinais ao D0 e 35^o DE, são suficientes para produção de níveis satisfatórios de anticorpos, assim como para reduzir significativamente a eliminação de VDN. E ainda, com relação a proteção frente a ocorrência de sinais clínicos o estudo não obteve respostas conclusivas, em virtude dos pombos não

se mostraram susceptíveis a estirpe de alta patogenicidade (SJM), mesmo na ausência de vacinação

A partir do momento em que exista a tentativa de se delinear um programa de vacinação contra a DN, principalmente em animais jovens, devem ser levados em consideração: a imunidade materna e a presença de agentes imunossupressores (GALILI e BEN-NATHAN, 1998). Nesse sentido, a presença de anticorpos na gema de ovos, assim como, de agentes patogênicos bacterianos ou virais podem interferir no sucesso um programa de vacinação, deixando as aves, principalmente as jovens, desprotegidas (KAPCZYNSKI e KING, 2005; JEON et al., 2008). Nestas condições, torna-se laborioso a elaboração de um programa de vacinação padrão, necessitando portanto da adaptação do programa para cada região específica, levando-se em consideração o histórico vacinal, o desafio naquela região, o sistema de produção, o programa de sanidade aplicado, entre outros fatores. Este fato requer ainda mais atenção, quando o programa será aplicado em aves de vida livre, como no presente trabalho, no qual, a ausência de histórico das aves se torna um agente dificultador. Ademais, um programa de vacinação aplicado de forma isolada, sem medidas adequadas de biossegurança, pode ser ineficaz na prevenção e controle de surtos da DN (EZEMA et al., 2008).

Na avaliação da presença do genoma viral em amostras de tecidos, não foi observada uniformidade quanto a presença de genoma do agente nos diferentes órgãos (Tabelas de 13 a 16). De um modo geral, houve uma maior frequência de detecção de genoma viral nas amostras oriundas do baço, seguida do fígado, pulmão e traquéia. Fato isolado ocorreu em um indivíduo (P 30) do Modelo Experimental 2, no qual foi possível detectar genoma viral em todos os órgãos analisados (Tabela 14). Nas galinhas, a distribuição de amostras positivas dentro de cada modelo também foi desigual, contudo, quando analisados em conjunto observou-se alguns resultados coincidentes. Desta forma, em ordem decrescente de frequência de detecção foi observada no baço, fígado, pulmão e traquéia. Entretanto, algumas particularidades, como por exemplo, as galinhas do Modelo Experimental 1 (Tabela 13). Nestas, fígado e pulmão foram os principais locais de detecção viral. Em linhas gerais, tal ausência de padrão na distribuição de amostras teciduais positivas pode ser atribuída a não infecção dos tecidos

avaliados no momento da colheita, ou ainda, a ação da resposta imune nos diversos órgãos afetados. Tais achados vão ao encontro daqueles obtidos anteriormente por Kho et al., (2000).

A maior frequência de positividade no baço, encontrada no estudo em questão, corroboram os resultados obtidos por Wakamatsu et al. (2006), indicando o baço como principal órgão alvo afetado. Em concordância, pombos infectados experimentalmente com estirpes do PPMV-1 apresentaram a maior taxa de detecção do VDN em baço, pulmão, tonsilas cecais e rins, quando avaliados pela RT-PCR (BARBEZANGE e JESTIN, 2003b). Desta forma, os autores recomendam que estes órgãos sejam considerados de eleição para a detecção do VDN. A propósito, Kant et al. (1997), Kho et al.(2000) e Barbezange e Jestin (2002) observaram que a RT-PCR foi capaz de detectar o genoma viral em amostras de cérebro, pulmão traquéia e baço, em igual frequência nos órgãos citados.

Em oposição, Creelan et al. (2002) observaram que a detecção do VDN em amostras teciduais não deve ser o principal foco de uma tentativa de diagnóstico, devido ao fato do tropismo tecidual não seguir um padrão, frente às diversas estirpes virais. Desta forma, na avaliação de amostras clínicas, *swabs* cloacais e de traquéia são possivelmente a melhor opção, embora deva ser considerada a possível presença de alguns inibidores da PCR em amostras fecais (CREELAN et al., 2002).

Em relação ao tamanho dos fragmentos de órgãos utilizados no presente trabalho, deve-se ressaltar que o uso de pequenos fragmentos facilita a homogeneização e processamento posterior dos mesmos, permitindo a detecção do agente. Este procedimento também pode reduzir a possibilidade de contaminações cruzadas, fato observado no presente estudo e também descrito previamente por Barbezange e Jestin, (2002). Ademais, a utilização de “Kits comerciais” para extração do genoma viral dos tecidos aumenta a confiabilidade e a qualidade dos resultados, bem como reduzem o tempo de execução da técnica, proporcionando uma melhor reprodutibilidade (BARBEZANGE e JESTIN, 2002). Em verdade, o “Kit comercial” de extração utilizado no presente estudo, face ao grande número de amostras extraídas e processadas, proporcionou a otimização do diagnóstico em termos de tempo e praticidade.

Estudos envolvendo a utilização de amostras teciduais são de extrema importância para a melhor compreensão da distribuição do agente viral nos órgãos infectados, bem como da capacidade de proteção tecidual de uma vacina, ou ainda da patogenicidade da amostra (BARBEZANGE e JESTIN, 2002; BARBEZANGE e JESTIN, 2005a). Comparada à técnica usual de isolamento viral em ovos embrionados, a RT-*nested* PCR se mostrou mais eficiente em termos de redução no tempo para a determinação de resultados conclusivos, e equivalência quanto à sensibilidade e especificidade nos estágios iniciais e intermediários da infecção, conforme destacam Barbezange e Jestin (2002) e Creelan et al. (2002). Além disso, a diferenciação entre estirpes vacinais e patogênicas, particularmente durante a excreção do agente, exige maiores estudos para a otimização de procedimentos técnicos, visando a obtenção mais rápida das respostas diagnósticas. Nesse sentido, a utilização de técnicas moleculares insere-se adequadamente em tais requisitos.

Para a realização da RT-PCR, conforme aplicada na presente investigação, o par de oligonucleotídeos descritos inicialmente por Toyoda et al. (1989), podem ser compreendidos como *primers* “genéricos”, uma vez que são capazes de detectar todas as estirpes circulantes do VDN, tanto as de alta como aquelas de baixa patogenicidade. Em contrapartida, com base no seqüenciamento genômico das estirpes-padrão utilizadas neste estudo (SJM e LS), foi possível o desenvolvimento de oligonucleotídeos capazes de diferenciar a eliminação viral das referidas estirpes pela técnica de RT-PCR, podendo ser denominados como *primers* “específicos”. Tal conjunto de primers permitiu que apenas as amostras inicialmente consideradas positivas na RT-PCR, realizada com os oligonucleotídeos “genéricos”, fossem novamente submetidas à amplificação a partir do cDNA original, diferenciando desta forma o genoma viral eliminado nas fezes. Assim, foi possível verificar que em amostras de todas as aves (pombos e galinhas) onde fragmento do genoma viral foi detectado, a partir de swabs cloacais, o produto obtido era compatível com fragmento de tamanho esperado para a estirpe São João do Meriti, indicando desta forma a provável eliminação viral de estirpe de alta patogenicidade (Tabelas 17 a 20).

Outrossim, surtos da DN acarretam o sacrifício de uma grande quantidade de aves, na intenção de se conter o avanço da enfermidade. Desta

forma, o sucesso obtido neste estudo, através da diferenciação molecular de estirpes virais vacinais e patogênicas, possibilita uma considerável agilidade na adoção de medidas de profilaxia e controle. Em verdade, a utilização de *primers* capazes de diferenciar amostras patogênicas de amostras vacinais é de grande importância, tendo em vista a redução do tempo de diagnóstico, quando comparado ao isolamento e caracterização viral, consoante destacam Tiwari et al. (2004), em concordância com os resultados encontrados no presente trabalho. Nesse contexto, salienta-se a utilidade da RT-PCR para o rápido diagnóstico laboratorial da DN, conforme previamente verificado (KANT et al., 1997; SOARES, 2002; CARRASCO et al., 2008; CARRASCO et al. 2009).

Adicionalmente, devido à capacidade de aves de vida livre entrar em contato com estirpes virais vacinais provenientes de granjas, a diferenciação entre estirpes torna-se de extrema importância, determinando, desta forma, o real papel de aves de vida livre na disseminação da DN. Em verdade, a possibilidade de tal diferenciação genômica já foi descrita para 12 estirpes virais, agrupando-as em patogênicas e não-patogênicas, por meio de oligonucleotídeos estirpe-específicos (TIWARI et al., 2004). Kant et al., (1997), também utilizando *primers* estirpe-específicos, conseguiram a detecção de amostras virulentas, porém o resultado não foi tão significativo para detecção de amostras avirulentas, apresentando algumas reações falso-positivas. Desta forma, embora alguns países ainda exijam o isolamento viral e a avaliação do IPIC, técnicas baseadas em análises genômicas demonstram confiabilidade na diferenciação de estirpes do VDN de alta e baixa patogenicidade (CREELAN et al., 2002).

Inúmeras diferenças tem sido observadas nas estirpes virais isoladas de diversas espécies de aves, principalmente aves de vida livre, em diferentes locais, por todo o planeta. Estas estirpes circulam nestas populações geralmente sem causar doença, tendo em vista que no momento em que uma amostra permanece estável numa população, gera-se um equilíbrio parasita versus hospedeiro. Esta é uma importante particularidade, pois estas aves de vida livre podem vir a entrar em contato com aves comerciais, possibilitando a ocorrência de surtos e, conseqüentemente, gerando grande prejuízos para países produtores e exportadores de aves e seus subprodutos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos idealizados com o objetivo de ampliar os conhecimentos a respeito das inter-relações do vírus da doença de Newcastle (VDN) com pombos e galinhas conviventes, conforme delineado nos quatro modelos experimentais utilizados, particularmente no que diz respeito ao estado imunitário, à perpetuação (reservatório) e disseminação do vírus de pombos para galinhas, depois de analisados e discutidos em confronto com a literatura compulsada, permitem as seguintes conclusões:

1) Fragmentos genômicos do VDN foram detectados em pombos a partir do primeiro dia da inoculação da estirpe viral patogênica São João do Meriti (SJM), persistindo até o 22º dia do experimento, sempre na ausência de sinais clínicos da doença. O máximo de eliminação viral observado ocorreu no 6º e 7º dia do experimento, ocasião em que foram detectados fragmentos genômicos nas amostras de swabs cloacais colhidas de todos os pombos;

2) Galinhas imunizadas com a estirpe vacinal LaSota do VDN desenvolveram proteção ao desafio contra a estirpe patogênica SJM. Entretanto, nas aves sentinelas (galinhas e pombos), mantidas em contato, não foram observados indícios de infecção, apesar dos pombos sentinelas desenvolverem soro-conversão;

3) Galinhas imunizadas com a estirpe vacinal LaSota, submetidas à infecção pelo VDN, eliminaram fragmentos genômicos, os quais foram detectados nas fezes de galinhas sentinelas em contato, embora em frequência significativamente menor do que em galinhas não vacinadas. Nos pombos sentinelas, mantidos nas mesmas condições experimentais, não foram detectados fragmentos de genoma do VDN;

4) Pombos submetidos à estirpe vacinal LaSota e posteriormente submetido à infecção experimental, desenvolveram altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação, assim como significativa redução de eliminação de partículas virais. Por conseguinte, o contato das galinhas sentinelas com tais pombos vacinados e infectados, redundou em excreção viral, sem, contudo, promover o surgimento de sinais clínicos da doença, bem como em resposta imune humoral detectável nas galinhas sentinelas;

5) Ficou demonstrado que galinhas sentinelas em contato com pombos infectados (reservatórios) desenvolvem soro-conversão apreciável, apesar de não apresentarem aparente manifestação de sinais clínicos da doença, indício de possível atenuação viral, após passagem em espécie aviária distinta;

6) Galinhas (vacinadas e sentinelas) mantidas em contato com pombos experimentalmente infectados eliminaram fragmentos genômicos virais, os quais foram menos intensos e de curta duração nas aves vacinadas, indício de proteção vacinal;

7) A Reação de Fixação do Complemento não apresentou reprodutibilidade suficiente para ser utilizada na detecção de anticorpos anti-VDN em soros de pombos;

8) A técnica de RT-PCR aqui utilizada permitiu a detecção de fragmentos genômicos do VDN em amostras de tecidos de aves experimentalmente infectadas, sendo o baço o órgão onde a frequência de detecção foi maior;

9) A utilização de oligonucleotídeos homólogos (*primers* específicos) utilizados nos ensaios de RT-PCR permitiu a diferenciação da estirpe de VDN de alta patogenicidade (SJM) da estirpe de baixa patogenicidade (LaSota), eliminadas pela cloaca das aves. Deve ser ressaltado que, nas condições experimentais estudadas, somente fragmentos genômicos compatíveis com a estirpe SJM foram detectados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

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

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

ALEXANDER, D.J. Newcastle Disease and other Avian Paramyxoviridae infections In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; MCDUGALD, L.R. (Ed), **Diseases of Poultry**, 10th ed. Ames, Iowa, Iowa State University Press, 1997. p.541-569.

ALEXANDER, D.J.; PARSONS, G.; MARSHALL, R. Infection of fowls with Newcastle Disease virus by food contaminated with pigeon faeces. **Veterinary Record**, v.115, p.601-602, 1984a.

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

ALEXANDER, D.J.; PARSONS, G. Avian Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 2 Pathogenicity experiments in pigeons and chickens. **Veterinary Record**, v.114, p.466-469, 1984.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e Documentação: Referências Bibliográficas: Elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

ALEXANDER, D. J.; RUSSEL, P. H.; PARSONS, G.; ABU ELZEIN, E. M. E.; BALLOUH, A.; CERNIK, K.; ENGSTROM, B.; FEVEREIRO, M.; FLEURY, H. J. A.; GUITTET, M.; KALETA, E. F.; KIHM, U.; KOSTERS, J.; LOMNICZI, B.; MEISTER, J.; MEULEMANS, G.; NEROME, K.; PETEK, M.; POKOMUNSKI, S.; POLTEN, B.; PRIP, M.; RICHTER, R.; SAGHY, E.; SAMBERG, Y.; SPANOGHE, L.; TUOVA, B. Antigenic and biological characterization of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeon – an international collaborative study. **Avian Pathology**, v.14, p.365-376, 1985.

ALEXANDER, D. J.; PARSONS, G. Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-1985. **Avian Pathology**, v.15, p.487-493, 1986.

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

ALEXANDER, D.J.; MANVELL, R.J.; FROST, K.M.; POLLITT, W.J.; WELCHMAN, D.; PERRY, K. Newcastle disease in pheasants in Great Britain in may 1996. **Veterinary Record**, v.140, p.20-22, 1997.

ANDERS, E. M.; HARTLEY, C. A.; JACKSON, D. C. Bovine and mouse serum beta inhibitors of influenza A viruses are mannose-binding lectins. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 87, p. 4485–4489, 1990.

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

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

BARBEZANGE, C.; JESTIN, V. Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals. **Journal of Virological Methods**, v.106, p.197-207, 2002.

BARBEZANGE, C.; JESTIN, V. Molecular characterization of three avian paramyxovirus type 1 isolated from pigeons in France. **Virus Genes**, v.26, n.2, p.175-183, 2003a.

BARBEZANGE, C.; JESTIN, V. Monitoring of pigeon paramyxovirus type-1 in organs of pigeons naturally infected with *Salmonella* Typhimurium. **Avian Pathology**, v.32, n.3, p.277-283, 2003b.

BARBEZANGE, C.; JESTIN, V. Molecular study of the quasispecies evolution of a typical pigeon paramyxovirus type 1 after serial passages in pigeons by contact. **Avian Pathology**, v.34, n.2, p.111-122, 2005a.

BARBEZANGE, C.; JESTIN, V. Quasispecies nature of an usual avian paramyxovirus type-1 isolated from pigeons. **Virus Genes**, v.30, n. 3, p.363-370, 2005b.

BEARD, W.; BRUGH, M. Immunity to Newcastle Disease. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.4, p.509-512, 1975.

BEARD, C. W.; HANSON, R. P. Newcastle Disease. In: HOFSTAD, B.W.; CALNECK, W.M.; REID, H.W.; YODER, JR. (Ed). **Disease of Poultry**, 8^a ed., Iowa, 1984. p.452-468.

BELLUCI, M. S. P.; VIANNA, J. S. M.; POTZ, C.; OLIVEIRA JR., J. G.; FEDULLO, L. P. L.; MAZUR, C.; ANDRADE, C. M. Avaliação sorológica do vírus da doença de Newcastle em aves silvestres. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.6, n.2, p.66-68, 1999.

BIANCIFIORI, F.; FIORONI, A. An occurrence of Newcastle Disease in pigeons: virological and serological studies in isolates. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v.6, n.3, p.,247-252, 1983.

BRIONES, C.; VICENTE, A.; MOLINA-PARIS, C.; DOMINGO, E. Minority memory genomes can influence the evolution of HIV-1 quasispecies *in vivo*. **Gene**, v.384, p. 129-138, 2006.

BRUGH, M.; BEARD, C. W. Atypical Disease Produced in Chickens by Newcastle Disease Virus Isolated from Exotic Birds. **Avian Diseases**, v.28, n.2, p.482-488, 1984.

CAMENISCH, G.; BANDLI, R.; HOOP, R. Monitoring of wild birds for Newcastle disease virus in Switzerland using real time RT-PCR. **Journal of Wildlife Diseases**, v.44, n.3, p.772-776, 2008.

CARRASCO, A. O. T. **Infecção experimental de pombos com estirpes do vírus da doença de Newcastle de baixa e alta patogenicidade.** 71f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 2005.

CARRASCO, A. O. T.; SEKI, M. C.; RASO, T. F.; PAULILLO, A. C.; PINTO, A. A. Experimental infection of Newcastle Disease virus in pigeons (*Columba livia*): Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. **Veterinary Microbiology**, v.129, n.1-2, p. 89-96, 2008a.

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

CARRASCO, A. O. T.; SEKI, M. C.; SOUSA, R. L. M.; RASO, T. F.; PINTO, A. A. Protection levels of vaccinated pigeons (*Columba livia*) against a highly pathogenic Newcastle Disease Virus strain. **Tropical Animal Health and Production**, DOI 10.1007/s11250-009-9318-7, 2009.

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

CHO, S.; KWON, H.; KIM, T.; KIM, J.; YOO, H.; PARK, M.; PARK, Y.; KIM, S. Characterization of a recombinant Newcastle 1 disease vaccine strain. **Clinical and Vaccine Immunology** doi:10.1128/CVI.00156-08, 2008.

CLAVIJO, A.; ROBINSON, Y.; BOOTH, T.; MUNROE, F. Velogenic Newcastle disease in imported caged birds. **Canadian Veterinary Journal**, v.41, p.404-406, 2000.

COMAS, I.; MOYA, A.; GONZALEZ-CANDELAS, F. Validating viral quasispecies with digital organisms: a re-examination of the critical mutation rate. **BMC Evolutionary Biology**, v. 5, n. 5, doi:10.1186/1471-2148-5-5, 2005.

COUCEIRO, J. N.; MACHADO, R. D.; COUCEIRO, E. S.; CABRAL, M. C. Prevalência do vírus da Doença de Newcastle em uma comunidade de aves ornamentais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.10, p.31-33, 1990.

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, p. 493-499, 2002.

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

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

DEMÉTRIO, C. **Levantamento sorológico e pesquisa do vírus da doença de Newcastle em Irerês migratórios, *Dendrocygna viduata* (Anseriformes: Anatidae), na cidade de São Paulo, Brasil.** 62f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

DOMINGO, E. Quasispecies theory in virology. **Journal of Virology**, v. 76, p. 463-465, 2002.

EISA, M.; OMER, E. A. A natural outbreak of Newcastle Disease in pigeons in the Sudan. **Veterinary Record**, v.114, p.297, 1984.

ELZEIN, E. M. E. A.; MANVELL, R.; ALEXANDER, D. J.; ALAFALEQ, A. I. Pigeon paramyxovirus-1 (P-group) as the cause of severe outbreaks in fancy *Columba livia* in Saudi Arabia. **Journal of Veterinary Medicine**, v.46, p.689-692, 1999.

ERICKSON, G. A.; MARE, C. J.; GUSTAFSON, G. A.; MILLER, L. D.; PROCTOR, S. J.; CARBREY, E. A. Interactions between viscerotropic velogenic Newcastle Disease virus and pet birds of six species. I. Clinical and serologic responses, and viral excretion. **Avian Diseases**, v.21, n.4, p.642-655, 1978.

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

EZEMA, W. S.; OKOYE, J. O. A.; NWANTA, J. A. LaSota vaccination may not protect against the lesions of velogenic Newcastle disease in chickens, **Tropical Animal Health and Production**, DOI 10.1007/s11250-008-9210-x, 2008.

FLORES, M. L.; SEGABINAZI, S. D.; SANTOS, H. F.; BASSAN, J. D. L. Epidemiologia da Doença de Newcastle – Revisão Bibliográfica. **A Hora Veterinária**, v.26, n. 153, p. 57-61, 2006.

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

GELB, J. JR; FRIES, P. A.; PETERSON, F. S. Pathogenicity and Cross-Protection of pigeon paramyxovirus-1 and Newcastle Disease Virus in young chickens. **Avian Diseases**, v.31, p.601-606, 1987.

HOVI, T. Nonspecific inhibitors of coronavirus OC43 haemagglutination in human sera. **Medical Microbiology Immunology**, v. 166, p. 173-176, 1978.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES ICTVdb Index of Viruses: Family 01.048. *Paramyxoviridae*. 2002. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ITCVdb/Ictv/fs_param.htm> Acesso em dez. 2008.

JEON, W.; LEE, E.; LEE, Y.; JEONG, O.; KIM, Y.; KWON, J.; CHOI, K. Protective efficacy of commercial inactivated Newcastle disease virus vaccines in chickens against a recent Korean epizootic strain. **Journal of Veterinary Science**, v.9, n.3, p. 295-300, 2008.

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

KALETA, E. F.; ALEXANDER, D. J.; RUSSELL, P. H. The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? **Avian Pathology**, v.14, p.553-557, 1985.

KALETA, E.F.; BALDAUF, C. Newcastle disease in free-living pet birds. *In* : *Alexander, D. J., editor. Newcastle Disease*, Boston: Kluwer Academic, p.197-246, 1998.

KAMP, C. A quasispecies approach to viral evolution in the context of an adaptative immune system. **Microbes and Infection**, v.5, p. 1397-1405, 2003.

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

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

KAPCZYNSKI, D. R.; WISE, M. G.; KING, D. J. Susceptibility and protection of naïve and vaccinated racing pigeons (*Columba livia*) against exotic Newcastle Disease virus from California 2002-2003 outbreak. **Avian Diseases**, v.50, n.336, p.336-341, 2006.

KE, G. M.; LIU, H. J.; LIN, M. Y.; CHEN, J. H.; TSAI, S. S.; CHANG, P. C. Molecular characterization of Newcastle Disease viruses isolated from recent outbreaks in Taiwan. **Journal of Virological Methods**, v.97, p.1-11, 2001.

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

KIM, L. M.; KING, D. J.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; ROSA, A. P. A. T.; BUENO JR, R.; DENNETT, J. A.; AFONSO, C. L. Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild North American pigeons and doves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.10, p. 3303-3310, 2008.

KINDE, H.; HULLINGER, P. J.; CHARLTON, B.; MCFARLAND, M.; HIETALA, S. K.; VELEZ, V.; CASE, J. T.; GARBER, L.; WAINWRIGHT, S. H.; MIKOLON, A. B.; BREITMEYER, R. E.; ARDANS, A. A. The isolation of exotic Newcastle Disease (END) virus from nonpoultry avian species associated with the epidemic of end in chickens in southern California: 2002–2003. **Avian Disease**, v.49, p.195-198, 2005.

KING, D. J.; SEAL, B. S. Biological and molecular characterization of Newcastle Disease virus isolates from surveillance of live birds markets in the northeastern United States. **Avian Diseases**, v.41, p.683-689, 1997.

KOMMERS, G. D.; KING, D. J.; SEAL, B. S.; BROWN, C. C. Virulence of pigeon-origin Newcastle Disease virus isolates for domestic chickens. **Avian Diseases**, v.45, p.906-921, 2001.

KOMMERS, G. D.; KING, D. J.; SEAL, B. S.; BROWN, C. C. Virulence of six heterogeneous-origin Newcastle Disease virus isolates before and after sequential passages in domestic chickens. **Avian Pathology**, v.32, p. 81-93, 2003.

KOWUENHOVEN, B. Newcastle Disease. In: MCFERRAN, J.B.; MCNULTY, M.S. (Ed.). **Virus Infection in Birds**. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1993. p.341-361.

KUIKEN, T.; LEIGHTON, F. A.; WOBESER, G.; DANESIK, K. L.; RIVA, J.; HECKERT, R. A. An epidemic of Newcastle Disease in double-crested cormorants from Saskatchewan. **Journal of Wildlife Diseases**, v.34, n.3, p.457-471, 1998.

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

LEE, J.; SUNG, W.; CHOI, J.; LEE, E.; YOON, H.; KIM, J.; SONG, C. Protection of chickens from Newcastle Disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins. **Journal of Veterinary Science**, v.9, n.3, p.301-308, 2008.

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

LI, X.; CHAI, T.; WANG, Z.; SONG, C.; CAO, H.; LIU, J.; ZHANG, X.; WANG, W.; YAO, M.; MIAO, Z. Occurrence and transmission of Newcastle Disease virus aerosol originating from infected chickens under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, doi:10.1016/j.vetmic.2008.11.002, 2008.

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

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**, 5th ed. Paris: O.I.E. 2004.

MAAS, R. A.; KOMEN, M.; VAN DIEPEN, M.; OEI, I. L.; CLAASSEN, L. L. T. M. Correlation of haemagglutinin-neuraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunization with inactivated Newcastle Disease vaccines. **Vaccine**, v.21, p. 3137-3142, 2003.

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

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

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

MILLER, P. J.; KING, D. J.; AFONSO, C. L.; SUAREZ, D. L.; Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. **Vaccine**, v. 25, p. 7238-7246, 2007.

MONNE, I.; BEATO, M. S.; CAPUA, I.; MANDOLA, M. L. Pigeon paramyxovirus isolated from a robin in Italy. **The Veterinary Record**, v.18, p.384, 2006.

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

NANTHAKUMAR, T.; KATARIA, R. S.; TIWARI, A. K.; KATARIA, J. M. Pathotyping of Newcastle Disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. **Veterinary Research Communications**, v.24, p.275-286, 2000.

OBERDÖRFER, A.; WERNER, O. Newcastle Disease virus: detection and characterization differing in pathogenicity. **Avian Pathology**, v.27, p.237-243, 1998.

ONAPA, M. O.; CHRISTENSEN, H.; MUKIIBI, G. M.; BISGAARD, M. A preliminary study of the role of ducks in the transmission of Newcastle Disease virus to in-contact rural free-range chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, p.285-289, 2006.

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

PANIGRAHY, B.; SENNE, D. A.; PEARSON, J. E.; MIXSON, M. A.; CASSIDY, D. R. Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle Disease in pet and exotic birds in 1991. **Avian Diseases**, v.37, p.254-258, 1993.

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

PERALES, C.; MARTIN, V.; RUIZ-JARABO, C. M.; DOMINGO, E. Monitoring sequence space as test for the target of selection viruses. **Journal of Molecular Biology**, v.345, p. 451-459, 2005.

PEARSON, J. E.; SENNE, D. A.; ALEXANDER, D. J.; TAYLOR, W. D.; PETERSON, L. A.; RUSSEL, P. H. Characterization of Newcastle Disease virus (Avian paramyxovirus - 1) isolated from pigeons. **Avian Diseases**, v.31, p.05-111, 1987.

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

RICE, E.C.; Use of CF test in study and diagnosis of viral diseases in man and animals. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 25, n. 6, p. 151, 1961.

RICHTZENHAIN, L. J. **Doença de Newcastle: Estudo comparativo das reações de ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay") e da inibição da hemaglutinação na quantificação da resposta imune humoral e na estimativa da imunidade de poedeiras frente ao desafio experimental.** 100f. Tese (Doutorado), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

RICHTZENHAIN, L. J.; PAULILLO, A. C.; PINTO, A. A.; KRONKA, S. N. Relation between the hemagglutination inhibition test and the indirect Elisa in the serologic monitoring of laying hens submitted to different systems of vaccination against Newcastle Disease. **Revista de Microbiologia**, v.24, n.3, p.187-191, 1993.

SANTOS, J. A.; SILVA, R. A.; BRADA, W.; MARINHO, E.; CUNHA, R. G. Sobre a Doença de Newcastle no Brasil (nota prévia). **Revista de Medicina Veterinária**, v.14, p.9-11, 1954.

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

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

SEAL, B. S.; KING, D. J.; LOCKE, D. P.; SENNE, D. A.; JACKWOOD, M. W. Phylogenetic relationship among high virulent NDV isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1141-1145, 1998.

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

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**, 2^a ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1992. 912 p.

SNOECK, C. J.; DUCATEZ, M. F.; OWOADE, A. A.; FALEKE, O. O.; ALKALI, B. A.; TAHITA, M. C.; TARNAGDA, Z.; OUEDRAOGO, J.; MAIKANO, I.; MBAH, P. O.; KREMER, J. R.; MULLER, C. P. Newcastle Disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. **Archives of Virology**, DOI: 10.1007/s00705-008-0269-5, 2008.

SOARES, P. B. M. **Padronização da RT-PCR dúplex para detecção dos vírus da Influenza A e doença de Newcastle em aves migratórias**. 69 f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2002.

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

TANGREDI, B.P. Avian Paramyxovirus Type 1 infections in pigeons: recent changes in clinical observation. **Avian Diseases**, v.32, p. 839-841, 1988.

TERREGINO, C.; CATTOLI, G.; GROSSELE, B.; BERTOLI, E.; TISATO, E.; CAPUA, I. Characterization of Newcastle Disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. **Avian Pathology**, v.32, p. 63-68, 2003.

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

TIWARI, A. K.; KATARIA, R. S.; NANTHAKUMAR, T.; DASH, B. B.; DESAI, G. Differential detection of Newcastle Disease virus strains by degenerate primers based RT-PCR. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, p.163-169, 2004.

TORO, H., HOERR, F. J., FARMER, K., DYKSTRA, C. C., ROBERTS, S. R., PERDUE, M. Pigeon Paramyxovirus: Association with common avian pathogens in chickens and serologic survey in wild birds. **Avian Diseases**, v.49, p.92-98, 2005.

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

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

TAI, H. J.; SAIF, Y. M.; NESTOR, K. E.; EMMERSON, D. A.; PATTERSON, R. A. Genetic variation in resistance of turkeys to experimental infection with Newcastle Disease virus. **Avian Diseases**, v.36, p. 561-565, 1992.

UJVARI, D.; WEHMANN, E.; KALETA, E. F.; WERNER, O.; SAVIC, V.; NAGY, E.; CZIFRA, G.; LOMNICZI, B. Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. **Virus Research**, v.96, p.63-73, 2003.

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

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

WAKAMATSU, N.; KING, D. J.; SEAL, B. S.; SAMAL, S. K.; BROWN, C. C. The pathogenesis of Newcastle Disease: A comparison of selected Newcastle disease virus wild-type strains and their infectious clones. **Virology**, v. 353, p. 333-343, 2006.

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

WILCOX, G.E.; CONSIGLI, R.A. Complement-Fixation test for detection of viral antibodies in chicken serum. II. Immunologic response in chickens following experimental infection with Newcastle disease virus. **Avian Diseases**, v.6, 1019-1028, 1972.

WOBESER, G.; LEIGHTON, M.; NORMAN, R.; MYERS, D. J.; ONDERKA, D.; PYBUS, M. J.; NEUFELD, J. L.; FOX, G. A.; ALEXANDER, D. J. Newcastle Disease in wild water birds in Western Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v.34, p.353-359, 1993.

YANG, C. Y.; SHIEH, H. K.; LIN, Y. L.; CHANG, P. C. Newcastle Disease virus isolated from recent outbreaks in Taiwan phylogenetically related to viruses (Genotype VII) from recent outbreaks in Western Europe. **Avian Diseases**, v.43, p.125-130, 1999.

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

ZANETTI, F.; MATTIELLO, R.; GARBINO, C.; KALOGHLIAN, A.; TERRERA, M. V.; BOVIEZ, J.; PALMA, E.; CARRILLO, E.; BERINSTEIN, A. Biological and molecular characterization of a pigeon Paramyxovirus Type-1 isolate found in Argentina. **Avian Diseases**, v.45, p.567-571, 2001.

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