



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E CLÍNICA

ANDRÉ EDUARDO ROCHA CÉSAR

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO DA  
HEMAGLUTINAÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE  
NEWCASTLE EM AVESTRUZ (*Struthio camellus*)**

SALVADOR  
2006

**ANDRÉ EDUARDO ROCHA CÉSAR**

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO DA  
HEMAGLUTINAÇÃO PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE  
NEWCASTLE EM AVESTRUZ (*Struthio camellus*)**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Medicina Veterinária, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Lia Muniz Barreto Fernandes

Salvador  
Semestre 2/2006

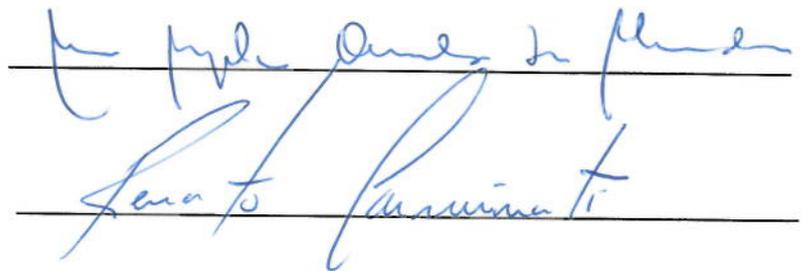
TERMO DE APROVAÇÃO

André Eduardo Rocha César

**Padronização da técnica de Inibição da Hemaglutinação para o diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruz (*Struthio Camellus*)**

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Lia Muniz Barreto Fernandes  
Presidente da Banca



Apresentada em:

## AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial minha mãe e minha avó, pelo constante esforço, amor e dedicação a me tornar o homem que sou.

A minha orientadora, mestra e amiga, Lia Muniz Barreto Fernandes, pelo exemplo de docência, pela sua incansável disposição, atenção, paciência e pelo amor que demonstra pelo que faz.

A minha segunda Família, LASAB, formada por Lia, Isabella, Elen, Priscila, Tatiane e Thaís, pela amizade e pelos inúmeros momentos de trabalho e descontração, que fizeram desse trabalho, mais prazeroso do que ele já foi.

A meus amigos “veterinários” e “não-veterinários”, que fizeram parte dessa minha caminhada e com quem tive o prazer de conviver, viver e amá-los.

E, especialmente a Deus, por ser meu pilar nos momentos de fraqueza e pela luz, que ilumina a minha vida.

A todos vocês, muito obrigado.

## RESUMO

A Doença de Newcastle é uma das enfermidades mais importantes de aves domésticas e silvestres e que traz significativas perdas econômicas para os avicultores brasileiros. Seu diagnóstico, segundo o MAPA e a OIE, deve ser realizado pela prova sorológica de Inibição da Hemaglutinação, utilizando hemácias de galinhas como revelador de animais positivos e negativos. No entanto, a utilização de hemácias específica da espécie a ser testada é recomendada por alguns autores. Foram analisadas 185 amostras de soro de avestruzes provenientes de diversas plantéis dos Estados da Bahia e de São Paulo para o diagnóstico da Doença de Newcastle através da prova de Inibição da Hemaglutinação. Foram utilizados hemácias de galinha, peru e avestruzes como revelador da prova para detecção da doença em avestruzes. Também avaliada a utilização de soros testes inativados com hemácias de galinhas. No ensaio, a utilização de hemácias de galinhas resultou em um grande número de animais negativos enquanto que até 100% das amostras se mostraram positivas utilizando hemácias de avestruz. O uso de hemácias de peru é um meio alternativo a utilização de hemácias de avestruz pela facilidade de manutenção destes animais em locais próximos a laboratórios apresentando grande concordância entre os resultados.

Palavras – Chaves: Doença de Newcastle, Inibição da hemaglutinação, avestruz.

## LISTA DE TERMOS

DN – Doença de Newcastle

NDV – Vírus da Doença de Newcastle

HI – Inibição da Hemaglutinação

AMPV-1 - *Paramyxovirus* aviário tipo 1

VDN – Vírus da doença de Newcastle

SPF - Specific Pathogen Free

OIE - Escritório Internacional de Epizootias

OMC - Organização Mundial do Comércio

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PNSA – Programa Nacional de Sanidade Avícola

UBA – União Brasileira de Avicultura

APMV – Paramixovírus aviários

RNA – Ácido Ribonucléico

HN – Hemaglutinina – neuraminidase

TMME - Tempo médio de morte embrionária

IPIC - Índice de patogenicidade intracerebral

IPIV - Índice de patogenicidade intravenosa (IPIV)

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porcentagem de resultados negativos das análises realizadas com hemácias de diferentes espécies

Figura 2 – Titulação das amostras com hemácias de galinha como revelador da prova sorológica de Inibição da Hemaglutinação.

Figura 3 – Titulação das amostras com soro inativado com hemácias de galinha.

Figura 4 – Titulação das amostras utilizando hemácias de peru como revelador da prova sorológica de Inibição da Hemaglutinação.

Figura 5 – Titulação das amostras usando hemácias de avestruz como revelador da prova sorológica de Inibição da Hemaglutinação.

Figura 6 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização de hemácias de galinhas e soro teste inativado.

Figura 7 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização de hemácias de galinhas e hemácias de avestruz.

Figura 8 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização de hemácias de galinhas e hemácias de peru.

Figura 9 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização do soro teste inativado e hemácias de peru.

Figura 10 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização do soro teste inativado e hemácias de avestruz.

Figura 11 - Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização de hemácias de peru e hemácias de avestruz.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Porcentagem de amostras positivas e negativas no teste de HI realizado com hemácias (He) de galinhas (Ga), peru (Pe) e avestruz (Avz).

Tabela 2 – Comparação das titulações apresentadas pelas amostras na utilização de hemácias de diferentes espécies como revelador da prova de Inibição da Hemaglutinação.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 Objetivo Geral.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
4.1 Etiologia .....	18
4.2 Hospedeiro .....	20
4.3 Transmissão .....	21
4.4 Sinais Clínicos.....	22
4.5 Lesões macro e microscópicas.....	24
4.6 Diagnóstico.....	25
4.6.1 Isolamento e identificação viral.....	26
4.6.1.1 Testes de patogenicidade .....	27
4.6.2 Testes sorológicos.....	27
4.7 Estratégias de prevenção e controle.....	29
4.7.1 Vacinação contra doença de Newcastle em galinhas.....	31
4.7.2 Vacinação contra a doença de Newcastle em Avestruz.....	33
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
6. RESULTADOS.....	40
7. DISCUSSÃO.....	50
8. CONCLUSÕES.....	54
9. REFERÊNCIAS.....	55

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Newcastle é uma doença viral, altamente contagiosa que representa uma das enfermidades mais importantes para a indústria avícola mundial, sendo identificada na maioria das espécies aviárias silvestres e domésticas (OLIVEIRA JÚNIOR et al, 2005), causando sérios prejuízos diretos na produção de aves devido a sua elevada morbidade, além de barreiras a comercialização de produtos avícolas (ALEXANDER, 2001).

A doença é também conhecida como Pseudopeste aviária, Pseudovogel Pest, Atypische Geflügelpest, Pseudopoultry Plague, Avian Pest, Avian Distemper, Raniket Disease, Tetelo Disease, Korean Fowl Plague, Avian Pneumoencephalitis (ALEXANDER et al, 2002), peste aviária, pneumoencefalite aviária e desordem respiratória-nervosa (HERNANDES et al., 1987), sendo definida como a infecção de aves causada pelo *Paramyxovirus* aviário tipo 1 (AMPV-1) que apresenta índice de patogenicidade intracerebral (IPIC) maior ou igual a 0,7 (indicador de virulência do vírus) em pintos SPF (Specific Pathogen Free) de um dia de idade (PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2000).

A Doença de Newcastle é endêmica em muitos países da África (PFITZER et al, 2000), Ásia (HUA et al, 2005) e da América (KAPCZYNSKI e KING, 2005), incluído no código zoossanitário internacional do Escritório Internacional de Epizootias – OIE, como doença notificável (doença transmissível que apresenta alta patogenicidade e rápida difusão) e a notificação dos focos da doença é compulsória

para os países signatários da Organização Mundial do Comércio (OMC). Infecções pelo *Paramyxovirus* aviário tipo 1 (AMPV-1) foram relatadas em 241 espécies de pássaros, que correspondem a 27 das 50 Ordens de Classe Aves existentes (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2003).

O vírus da Doença de Newcastle pertence à família *Paramyxoviridae*, gênero *Avulavirus*, do qual é o único membro. Os isolados virais encontrados na maioria dos casos pertencem ao mesmo sorotipo (*Avian Paramyxovirus type 1*), porém há uma grande variação entre as amostras no que diz respeito à patogenicidade (ZHUHUI et al, 2004). Os sinais clínicos variam de acordo com a virulência da amostra, as espécies acometidas e com a predileção do vírus pelo sistema respiratório, sistema digestivo ou sistema nervoso central. Devido à grande diferença encontrada na virulência dos isolados, a forma mais simples de classificação das amostras se baseia nos sinais clínicos e nas lesões observadas em galinhas (SWAINE e KING, 2003).

A Doença de Newcastle representa um risco à saúde pública, onde há evidências de que amostras vacinais e amostras de campo podem infectar e causar sinais clínicos no homem, como dores de cabeça, lacrimejamento, conjuntivite e problemas de pálpebras (HERNANDEZ et al, 1987).

A expansão da avicultura elevou a produção de aves e o trânsito de animais entre os países. Atualmente, a África do Sul é o maior exportador de carne de avestruz para países livres da Doença de Newcastle. No entanto, vários países do continente africano, também exportadores de produtos e de animais, notificaram

surtos da enfermidade nos últimos anos e estes na grande maioria dos casos sempre estavam ligados a ocorrência em galinhas (COOPER, 2005). Com isso a atividade passou a ser mais um motivo de apreensão para os sanitaristas, preocupados com a prevenção e o controle da Doença de Newcastle. No Brasil, a atividade teve um grande crescimento no final da última década, e no primeiro momento de expansão da atividade, a distribuição de animais para várias regiões ocorreu sem que as medidas básicas de controle como quarentena, registro de procedência, isolamento das criações e monitoramento de doenças, fossem rigorosamente observadas.

Este trabalho tem como objetivo padronizar uma técnica para o diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes, pela prova de Inibição da Hemaglutinação, observando a ocorrência desta enfermidade nos Estados da Bahia e de São Paulo.

## 2. JUSTIFICATIVA

O Programa Nacional de Sanidade Avícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a OIE, preconizam a utilização da técnica sorológica de Inibição da Hemaglutinação como meio de diagnóstico da Doença de Newcastle em aves domésticas e silvestres. Na técnica de referência, utiliza-se suspensão de hemácias de galinhas como revelador de animais positivos. No entanto, existem relatos de que a utilização de hemácias da própria espécie a ser testada aumenta a sensibilidade e a especificidade do teste. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a concordância entre os resultados nos diferentes tipos de hemácias utilizadas como revelador da técnica, para criar um padrão do tipo de hemácia utilizada no diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruz.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Padronizar a técnica de inibição da Hemaglutinação para o diagnóstico da Doença de Newcastle em Avestruz, observando a ocorrência desta enfermidade nos Estados da Bahia e de São Paulo.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Avaliar os títulos de anticorpos para o vírus da Doença de Newcastle em avestruz utilizando hemácias de galinha, de peru e de avestruz como revelador da técnica de Inibição da hemaglutinação.
  
- Avaliar os títulos de anticorpos para o vírus da Doença de Newcastle em avestruz utilizando as amostras testes inativadas com hemácias de galinhas através da técnica de Inibição da hemaglutinação
  
- Verificar a concordância entre os resultados obtidos da utilização de hemácias de diferentes espécies.

- Buscar meios alternativos na utilização de hemácias de avestruz na prova de Inibição da Hemaglutinação.

#### 4. REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros surtos da Doença de Newcastle (DN) ocorreram em 1926, em Java, Indonésia, e em 1928, em Newcastle-upon-Tyne, Inglaterra, apesar de, em meados do século XIX, existirem relatos de uma enfermidade com sinais clínicos semelhantes, na Ásia e no leste Europeu (ALEXANDER et al, 2002). A partir da primeira descrição, vários países passaram a notificar ocorrências. A doença se difundiu na Ásia e Oriente Médio entre 1926 e 1942 e para a Europa, África e América, a propagação ocorreu um pouco mais tarde, entre 1940 e 1950 (PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2000; AIELLO e MAYS, 2001). Acredita-se que a disseminação mundial da Doença de Newcastle ocorreu pelo fato de que amostras de baixa virulência teria sido veiculada por aves migratórias ou então, através de galinhas que estariam infectadas sem apresentar sintomas (HANSON, 1972).

Após a primeira identificação da doença de Newcastle ocorreram três panzootias no qual a primeira se originou no sudoeste asiático e estaria relacionado com os surtos iniciais da doença, levando cerca de 30 anos para se espalhar pelo mundo, tendo maior importância no início da década de 60 (ALEXANDER et al., 1997). Acredita-se que a Segunda Guerra Mundial ajudou na difusão da primeira panzootia na Europa. A segunda panzootia teria surgido no final da década de 60 no Oriente Médio, e até 1973 alcançou a maioria dos países, se disseminando mais rapidamente devido ao crescimento da avicultura industrial e a intensificação da comercialização de produtos avícolas. Devido ao risco que essa doença oferecia ao desenvolvimento da indústria avícola, esta passou a ser controlada por vacinação e

uma rigorosa fiscalização de aves importadas. Além disso, a criação de pombos para corrida, demonstrações e alimentação, principalmente na Europa, foram ignorados como potencial disseminador do vírus, originando a terceira panzootia que também atingiu o Oriente Médio, no final da década de 70 e chegou a Europa em 1981 se espalhando mundialmente. Logo, a história indica que, de tempos em tempos, amostras do vírus da Doença de Newcastle (VDN) surgem de fontes desconhecidas, por motivos incertos, e que estas têm a capacidade de se disseminar por todo o mundo através de aves susceptíveis. (PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2000; AIELLO e MAYS, 2001).

O primeiro surto da Doença de Newcastle na América do Sul, ocorreu na Venezuela, entre 1949 e 1950, com elevada mortalidade dos animais infectados (LANCASTER, 1976). No Brasil, o primeiro caso reportou em 1953, na cidade de Macapá, devido a importação de carne de frango congelada dos Estados Unidos (CUNHA E SILVA, 1955). A partir desta data a enfermidade passou a ser verificada em todo território nacional (OLIVEIRA JÚNIOR, 2005). Em 1996, no Estado de Pernambuco foram detectados seis surtos em pequenas criações de poedeiras e frangos; no município de Japeri – RJ, um outro surto foi encontrado em galinhas de quintal em 1999 e novamente em 2000; três surtos foram detectados em lotes de frango no município de São José do Vale do Rio Preto no Estado do Rio de Janeiro. Em 2001, três surtos surgiram em criações caipiras no município de Nova Roma, no Estado de Goiás (SANTOS, 2006). O último surto que aconteceu no país surgiu no ano de 2006 no interior do estado do Rio Grande do Sul, em uma criação de galinha de quintal sendo rapidamente controlada pela defesa sanitária da região.

O primeiro relato da Doença de Newcastle em avestruzes foi na década de 50, em animais mantidos em zoológicos. Os sinais observados foram depressão e envolvimento do sistema nervoso central (ALEXANDER, 2000). Em Israel, ocorreu um surto em criação de avestruzes próximos a um plantel comercial de galinhas (SAMBERG et al., 1989). A ocorrência de epizootia de Doença de Newcastle em várias espécies de aves domésticas em países do Sul da África, entre 1993 e 1995, levou ao registro de casos em criações de avestruzes (ALLWRIGH, 1996).

Na década de 90, houve um crescimento da estrutiocultura, intensificando a comercialização internacional de avestruzes, gerando preocupação das autoridades sanitárias no mundo e levando a maioria dos países a criarem legislações específicas relacionadas ao assunto. As avestruzes passaram a ser classificadas como aves de criação comercial, sendo enquadradas nas mesmas normas dos programas da avicultura industrial. No entanto, diferenças consideráveis entre galinhas e avestruzes levaram à sugestão de que as normas sejam específicas para comercialização desta espécie. Pelo fato do fortalecimento da comercialização ter acontecido justamente no momento em que a epizootia ocorria na África pode ter favorecido a propagação da Doença de Newcastle para vários países importadores destes animais (ALEXANDER, 2000).

No Brasil, a importação de animais infectados com o vírus da Doença de Newcastle (NDV), em 1997, levou ao sacrifício de diversos animais e ao embargo nas importações (D'ÁVILA, 2005).

#### 4.1 Etiologia

O vírus da Doença de Newcastle pertence à Ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae* e gênero *Avulavirus*. Existem nove sorotipos de paramyxovirus aviários (APMV), encontrados em diversas espécies aviárias, sendo o sorotipo 1 (APMV-1), o causador da Doença de Newcastle (MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS, 2004).

Os Paramyxovirus são compostos por uma molécula de RNA fita simples, não segmentado de polaridade negativa e com disposição tridimensional helicoidal. Os vírus são envolvidos por um envelope lipoprotéico e possuem projeções glicoprotéicas típicas que recobrem toda a superfície que está inserida dentro do envelope, e são importantes para a identificação e comportamento do vírus. Estas projeções são denominadas de hemaglutinina-neuraminidase (HN), que forma as maiores projeções do envelope e as de fusão (F), que correspondem às projeções menores (SANTOS et al., 1996). A fração hemaglutinante da HN é responsável pela adsorção do vírus aos receptores das células hospedeiras e pela atividade hemaglutinante do vírus. A glicoproteína F tem um papel importante na patogenicidade da doença, pois esta associada à habilidade do envelope viral em fundir-se às membranas celulares do hospedeiro, seguindo a introdução do material genético viral na célula e causando a fusão das células infectadas, resultando no característico efeito citopático – formação de sincício. Estas duas glicoproteínas exercem importante papel no desencadeamento da resposta imune protetora

induzida pelo VDN, nas aves. (SANTOS et al., 1996; FOREIGN ANIMAL DISEASE, 1998).

A proteína F é sintetizada como um precursor, a F0, e tem a capacidade de fusão após a clivagem em dois polipeptídeos: F1 e F2. Entretanto, além da clivagem de F0, ainda é fundamental a ação de HN para que ocorra a fusão (LEEUNW et al, 2005).

O envelope viral se constitui de uma membrana celular modificada formada do brotamento viral da célula do hospedeiro no momento da multiplicação. Este envelope produz um meio ambiente instável à oxidação e ao pH sendo sensível a maioria dos agentes químicos à temperatura ambiente como: fenol 3%, lisol 1%, álcool etílico 70%, tintura de iodo 1%, soda cáustica 2%, acetona 50% e permanganato de potássio diluído a 1:5000. Elevadas temperaturas e radiação solar auxiliam na inativação do VDN pelos agentes químicos, enquanto baixas temperaturas interrompem a sua inativação. O cozimento de produtos cárneos a 80°C destrói o vírus, enquanto carcaças de aves congeladas a -20 °C e na superfície de ovos por um período de 126 dias o VDN possui uma grande resistência e conserva o seu poder infectante (HERNANDES et al., 1987).

A replicação do vírus da Doença de Newcastle se inicia a partir da ligação do vírus aos receptores na célula-alvo, por meio da ação do polipeptídeo HN. Quando a proteína HN se liga ao receptor uma mudança conformacional acontece, resultando na exposição da proteína de fusão na membrana da célula (STONE-HULSLANDER e MORRISON, 1997). A seguir, a proteína F promove a fusão da

membrana do vírus com a membrana da célula do hospedeiro, possibilitando a entrada do nucleocapsídeo. A replicação intracelular ocorre no citoplasma da célula invadida. A transcrição ocorre por meio da ação da polimerase (transcriptase), que produzirá moléculas capazes de atuarem com RNA mensageiros e utilizarem os mecanismos da própria célula para tradução das proteínas e do genoma viral. As proteínas sintetizadas em uma célula infectada são transportadas para a membrana celular, que se modifica. O alinhamento do nucleocapsídeo próximo a essas regiões modificadas culmina na liberação de novas partículas virais a partir da superfície da célula (PEEPLES, 1988).

#### **4.5 Hospedeiro**

Todas as espécies de aves são potencialmente susceptíveis à infecção pelo VDN. Até o momento 241 espécies tiveram infecção pelo vírus registrada, dentre elas, aves domésticas não vacinadas, canários, pardais, papagaios, gansos, pombos, patos, cisnes, faisões, pavões, perdizes, corvos, avestruzes, emas, aves migratórias, pássaros aquáticos, aves silvestres livres ou em cativeiro (PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2000; SOUSA et al., 2000; KOMMERS et al., 2003; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2005; ALEXANDER, 1995; KUMANAN et al., 2003), apresentando grande variação na apresentação dos sinais clínicos (KALETA e BALDAUF, 1988).

Apesar da comprovação de que as amostras introduzidas por aves silvestres geralmente são de baixa virulência podem ajudar a disseminar amostras virulentas

que estejam presentes em criações domésticas (DEGEFA et al., 2004; WOBESER et al, 1993). A superlotação e a localização de plantéis em áreas de concentração de aves silvestres têm sido apontadas como responsável por aumento da transmissão da Doença de Newcastle (VERWOERD, 1995), pois estas aves servem de reservatórios do vírus (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2005).

Além das espécies aviárias, a infecção pelo vírus da Doença de Newcastle tem sido descrita também em outras espécies, incluindo répteis e o homem. Aparentemente a replicação do vírus nestes hospedeiros não tem importância epidemiológica para a doença em aves (SPREADBROW, 1999).

#### **4.3 Transmissão**

O VDN é eliminado durante a incubação, durante o estágio clínico e por um período variável, porém limitado, na convalescença. A principal forma de transmissão da Doença de Newcastle se dá através da inalação ou ingestão de partículas virais, especialmente por meio de secreções respiratórias na forma de aerossóis ou fezes contaminadas (AIELLO e MAYS, 2001). Para isto, é necessário que haja condições ambientais favoráveis, tais como temperatura, umidade e concentração de aves para assegurar a permanência do vírus viável no ambiente (MCFERRAN, 1989).

A transmissão mecânica do VDN pode ser feito através de insetos, roedores, artrópodes ou até mesmo pela circulação de pessoas de uma localidade para outra que carregam o vírus nos cabelos, roupas, calçados, fômites, ração, cama e veículos (ALEXANDER, 1995).

#### **4.4 Sinais Clínicos**

Os sinais clínicos observados em animais infectados com o vírus da Doença de Newcastle não são específicos dessa doença, sendo comumente observados em outras enfermidades infecciosas. As manifestações clínicas da doença dependem de fatores relacionados ao hospedeiro (espécie, idade e estado imune), à reação do vírus (patogenicidade, via de exposição e dose de inoculo), tempo de manifestação dos sinais clínicos, pela predileção dos patótipos do VDN pelos sistemas digestivo, respiratório e/ou nervoso; e ao estresse ambiental ou densidade populacional que pode influenciar na severidade e no curso da doença quanto na ocorrência e na distribuição das lesões (KOMMERS et al., 2003).

O VDN é agrupado em cinco patótipos ou estirpes. Essa classificação das amostras foi criada em 1983, por Beard e Hanson, e é dada de acordo com a severidade e apresentação dos sinais clínicos produzidos em aves infectadas (LEEJUN et al, 2005). O patótipo avirulento é denominado lentogênico, vacinal ou forma de Hitchner, e se caracteriza por apresentar sinais respiratórios bastante suaves ou subclínica; o com virulência intermediária é conhecido como mesogênico

focos linfóides, como: as placas de Payer do intestino, tonsilas cecais e outros agregados focais do tecido linfóide. No sistema reprodutivo os ovários podem estar edematosos, hemorrágicos ou degenerados podendo ocorrer hemorragia e a descoloração dos outros órgãos reprodutivos. (ALEXANDER et al., 1997; FOREIGN ANIMAL DISEASE, 1998).

A histopatologia possui pequeno valor no diagnóstico da doença de Newcastle. Na mucosa do trato respiratório superior observa congestão e exsudato mucóides com aumento de células acinares, perda de cílios, proliferação de células epiteliais, infiltrados celulares, edema, inflamação, hemorragia por toda a extensão da traquéia e até necrose. Opacidade e espessamento dos sacos aéreos e ocasionalmente lesões proliferativas e exsudativas nos pulmões. Em amostras velogênicas observa-se pneumonia hemorrágica, exsudação fibrinosa em brônquios e parabrônquios, necrose e edemas locais, ainda vacuolização epitelial e proliferação epitelial. Em amostra lentogênica reações linfocíticas e heterofílicas em submucosa, com presença de exsudato, inclusive em sacos aéreos (AIELLO e MAYS, 2001; NUNES et al., 2002).

#### **4.6 Diagnóstico**

A realização de exames laboratoriais complementares é fundamental para a confirmação da ocorrência da doença e elaborar um plano de controle para barrar o surto. O diagnóstico definitivo deve ser realizado por meio do isolamento e

identificação viral (ALEXANDER et al., 2002). Outro meio diagnóstico é a determinação de títulos de anticorpos presentes em amostras de soro através da sorologia, além de técnicas moleculares, pela reação em cadeia de polimerase (MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS, 2004).

#### **4.6.1 Isolamento e identificação viral**

Além de ser o método de diagnóstico considerado como definitivo para a detecção da Doença de Newcastle permite também a caracterização biológica da patogenicidade do sorotipo infectante (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2005; CARDOSO, 2006). As amostras são obtidas por meio das fezes, swabs cloacal e traqueal ou correspondem a isolados ou em "pool" de determinados órgãos obtidas após a necropsia, como: intestino, proventrículo, baço, cérebro, coração, fígado, pulmão, rins, sacos aéreos, humor aquoso, swab oro - nasal e as tonsilas cecais. Contudo, amostras como proventrículo e intestinos são processadas separadamente dos outros materiais (MAPA 2002, PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2000).

Na técnica, esse material suspeito, tratado com antibióticos, é inoculado na cavidade alantóica de ovos embrionados SPF com nove a 11 dias de incubação para verificar a ocorrência de morte embrionária de 12 em 12 horas. Fluido cório-alantóico é coletado dos ovos com embriões mortos e a atividade hemaglutinante testada. Em caso de reação positiva, realiza-se a prova de inibição da

hemaglutinação com soro positivo padrão para determinação da especificidade. Se o VDN é encontrado, a identificação do isolado pode ser efetuada por meio da técnica de vírus-neutralização e a caracterização obtida por meio de testes de patogenicidade (CUNNINGHAM, 1966; HANSON, 1980; ALEXANDER et al., 2002).

#### **4.6.1.1 Testes de patogenicidade**

Esses testes servem para avaliar os índices de patogenicidade da estirpe isolada e só pode ser realizada por isolamento viral. Estes, atualmente correspondem a três “testes em vivo” que são utilizados com a finalidade de diagnóstico VDN e são denominados, como: Tempo Médio de Morte Embrionária (TMME) nos ovos; Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC) em pintos de 1 dia; Índice de Patogenicidade Intravenosa (IPIV) em galinhas com seis semanas de idade (MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS, 2004).

#### **4.6.2 Testes sorológicos**

Diversos testes sorológicos foram desenvolvidos para detectar anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle, entre estes a imunodifusão radial, hemólise radial, neutralização em placa, a inibição da hemaglutinação (HI) e o ensaio

prévio do soro procurando evitar reações inespecíficas na HI. Dentre elas a pré-adsorção da amostra teste com hemácias de galinha (OIE, 1996) tem-se mostrado uma alternativa interessante. Uma outra alternativa é submeter as amostras de soro a um pré-tratamento, aquecendo a 56°C e incubando posteriormente com kaolin, porém nesse tipo de tratamento se verificou perdas na sensibilidade do teste (WILLIAMS et al, 1997; CADMAN et al, 1997).

Atualmente não existe no mercado nenhum kit de ELISA comercial ou conjugado produzido por empresas de imunoreagentes para uso em avestruzes.

#### **4.7 Estratégias de prevenção e controle**

Os custos com prevenção e controle são extremamente elevados (ALEXANDRE, 2001) e para o caso da Doença de Newcastle este é feito através de programas de vacinação, biossegurança e aplicação de legislação específica (SANTOS, 2006). A biossegurança é um conjunto de procedimentos técnicos que visam prevenir ou controlar a infecção dos plantéis por agentes de doenças infecciosas que possam ter impacto na produtividade dos rebanhos. As políticas nacionais de controle são dirigidas na prevenção da introdução do vírus da Doença de Newcastle e na sua disseminação dentro do país (SESTI, 2006).

No Brasil, em 1994, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) incluiu entre seus programas sanitários, o Programa Nacional de Sanidade

Avícola (PNSA) que prioriza o vírus da Doença de Newcastle, como o principal agente patogênico para frangos de corte e realiza estudos de vigilância epidemiológica oficial (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2005).

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) consiste no monitoramento dos plantéis, através da vigilância sanitária nos principais pólos de produção por meio de notificação obrigatória, assistência aos focos, medidas de biossegurança, desinfecção e sacrifício. Além disso, indica a realização de análises laboratoriais em rede de laboratórios oficiais e credenciados, por meio de testes sorológicos, em materiais biológicos, e análise epidemiológica das condições de saúde das aves alojadas em um estabelecimento avícola e interpretação adequada dos resultados. (MAPA, 2002). Em 2003, foi publicada a Instrução Normativa Nº 2, onde consta as Normas para Criação de Avestruzes (D'ÁVILA, 2005).

A confirmação de um foco leva à adoção de medidas de controle e erradicação. Para que as indústrias avícolas brasileiras possam exportar seus produtos para os países consumidores, têm que seguir normas que comprovem que os produtos comercializados não sejam oriundos de área onde ocorreu a doença ou tenham a presença de aves doentes com VDN (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2003).

As criações de galinhas caipiras são uma ameaça permanente à prevenção e ao controle da Doença de Newcastle apesar do intenso investimento da indústria avícola neste setor, uma vez que esse tipo de atividade vem crescendo a cada dia a partir de investimentos governamentais como uma alternativa de geração de renda e as formas de controle dessa enfermidade e de tantas outras importantes para a

indústria avícola estão sendo negligenciadas por órgãos oficiais (SANTOS, 2006; JORGE et al., 2000).

#### **4.7.1 Vacinação contra doença de Newcastle em galinhas**

Os órgãos de defesa sanitária animal são os principais responsáveis pela elaboração e regulamentação dos programas de vacinação aplicados a plantéis comerciais e são planejados diante da avaliação da situação da doença no país. A análise de fatores como presença da imunidade passiva materna; persistência de imunidade; via de aplicação mais eficiente; estado nutricional das aves; interferência de outros agentes infecciosos; tamanho dos lotes; condições climáticas; histórico e custo da vacinação é fundamental para que seja elaborado um programa de vacinação. Sendo assim, o esquema de vacinação deve se adequar às diferentes situações de desafio sanitário em determinada região, além de ser específico para cada situação e maleável para atender às demandas existentes durante o período de produção. Este fator impossibilita a aplicação de um programa único de vacinação que atenda de maneira geral às diferentes situações de desafios de campo (JAENISCH, 2003).

Existem no mercado vacinas vivas e vacinas inativadas indicadas para situações diferentes, apresentando vantagens e desvantagens para a sua aplicação. As vacinas vivas podem ser divididas em mesogênicas e lentogênicas e quanto maior a

resposta imune provocado por estas, maior a probabilidade de reações vacinais indesejáveis (ALEXANDER et al., 2002).

Além disso, a utilização de vacinas vivas nas criações comerciais dificulta os estudos de distribuição da enfermidade. Como apenas a forma aguda da doença é notificada e registrada pelo Escritório Internacional de Saúde Animal (OIE) e pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), os dados obtidos por estas organizações podem não representar a real ocorrência da enfermidade (ALEXANDER, 2001).

As vacinas inativadas são preparadas por amostras patogênicas inativadas por multiplicação. Para melhorar a sua imunogenicidade esse tipo de vacina vem acompanhada de um adjuvante oleoso para causar uma reação local, surtindo um efeito negativo, e são aplicadas por via intramuscular ou subcutâneo, por isso são raramente utilizadas. Apesar dessa dificuldade, quando aplicada em pintos de um dia não são inativados pela imunidade materna. Possuem outras vantagens, como são mais fáceis de armazenar do que as vacinas vivas; causarem baixas reações adversas nas aves vacinadas; apresentarem vários antígenos em uma dose de vacina e poderem estimular a produção de elevados títulos de anticorpos protetores por longos períodos. Têm como desvantagens o elevado custo na sua aplicação e produção, por serem aplicadas individualmente, ou seja, ave por ave (LICATA et al., 2005; BACK, 2003; ALEXANDER et al., 1997; AIELLO e MAYS, 2001).

A via de aplicação de predileção para a vacinação contra a Doença de Newcastle é através da água de beber das aves por ser em método de fácil

aplicação, baixo custo e imunização de um grande número de animais. Nele, se suspende o fornecimento de água dos animais por algumas horas e se administra a vacina na água fresca, sem cloro juntamente com leite em pó para aumentar o tempo de viabilidade das vacinas vivas. Um outro método de fácil aplicação é através do uso de aerossóis (ALEXANDER et al., 1997; BACK, 2003).

O sucesso do programa de vacinação de um plantel de aves é constatado por testes sorológicos para monitorar títulos de anticorpos importantes para a imunidade protetora e resultante da administração da vacina no plantel (LAMBRECHT et al., 2004; JAENISCH, 2003).

#### **4.7.2 Vacinação contra a doença de Newcastle em Avestruz**

O risco de disseminação da Doença de Newcastle através da exportação de carne de avestruz de áreas endêmicas intensificou as pesquisas em busca de um programa ideal de vacinação para esses animais. No entanto, três fatores causam limitações no sucesso da vacinação em avestruz: o longo ciclo produtivo, a forma de criação e o tamanho dos animais (ALEXANDER, 2000).

A maioria dos casos relatados da doença de Newcastle em avestruz teve origem provável em aves domésticas (MANVELL et al., 1996). Não existem relatos até o momento de situações em que as avestruzes tenham introduzido o vírus, servindo como fonte de infecção para galinhas (ALEXANDER, 2000).

Experimentos demonstraram que a utilização da vacina La Sota viva, aplicada via ocular, ou a vacina La Sota inativada, aplicada por via subcutânea, são bem toleradas pelas aves (BLIGNAUT et al., 2000).

De acordo com a Instrução Normativa número dois do Programa Nacional de Sanidade Avícola, a vacinação sistemática contra a Doença de Newcastle é facultativa no Brasil, não sendo recomendada sua utilização em ratitas, salvo se a situação epidemiológica local a indicar (MAPA, 2002).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAB) da Universidade Federal da Bahia, utilizando-se 185 amostras de soro de avestruzes para avaliação de níveis séricos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle, sendo 127 amostras provenientes de diferentes plantéis do Estado da Bahia e 58 do Estado de São Paulo. Os animais da amostragem eram machos e fêmeas, de idade variada e não apresentava sintomatologia clínica.

### Avaliação Sorológica – Inibição da Hemaglutinação

Os títulos de anticorpos anti-VDN no soro de avestruzes foi determinado pela técnica de Inibição da Hemaglutinação.

### **Protocolo da Inibição da Hemaglutinação**

- Coleta e preparo de hemácias

Amostras de sangue foram coletadas de três animais para utilização como revelador da técnica de Inibição da Hemaglutinação. Foram coletados sangues de três espécies diferentes para avaliar a concordância entre os resultados encontrados. O sangue da espécie *Gallus gallus* (galinha doméstica) foi coletado de

animais provenientes da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia. O sangue da espécie *Meleagris gallopavo* (peru) foi coletado de um criatório de aves domésticas e silvestres (Planeta Zôo) no município de Lauro de Freitas – Ba. O sangue da espécie *Struthio camelus* (avestruz) foi coletado de um criatório de avestruzes também no município de Lauro de Freitas – Ba. A coleta foi realizada com seringa contendo Allsever, uma solução anti-coagulante na proporção de 1:1.

A amostra de sangue foi centrifugada a 1200 RPM por quatro minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado por quatro vezes, completando ao volume anterior com solução salina tamponada PBS a 7,2 pH, homogeneizando-se sempre levemente, tendo-se o cuidado de não provocar hemólise. No final da última centrifugação, retiraram-se as hemácias do tubo e as armazenaram a 10% em PBS a 7,2 pH até o momento do uso.

- Titulação do antígeno

A titulação do antígeno determina até que concentração este é capaz de promover a hemaglutinação. Para a realização da técnica se utilizou 4UHA (Unidades Hemaglutinantes), sendo que 1UHA corresponde a maior diluição do antígeno onde ocorreu a hemaglutinação total.

Os antígenos utilizados no experimento foram cedidos pelo LANAGRO – Campinas (MAPA).

Para determinação da titulação adicionou 25  $\mu$ L de PBS pH 7,2 nas as cavidades de duas fileiras da microplaca acrescentando, logo após, 25  $\mu$ L do antígeno a ser titulado nas duas primeiras cavidades e se promoveu uma diluição seriada em razão dois até a última cavidade. Adicionou-se, em todas as cavidades, 25  $\mu$ L de suspensão de hemácias a 1% em PBS pH 7,2, homogeneizou e incubou a 4°C por 30 minutos. É importante salientar que o tipo de hemácia a ser utilizada na titulação do antígeno, deverá ser a mesma utilizada como reveladora no teste de Inibição da Hemaglutinação. A última diluição em que houve hemaglutinação foi a considerada a titulação do antígeno.

- Pré adsorção do soro teste com hemácia de galinha

As amostra de soro teste foram pré adsorvido com hemácias de galinha para anulação de fatores hemaglutinates inespecíficos existentes no soro de avestruz. Na pré adsorção se incubou 50  $\mu$ L das amostras de soros teste com 50  $\mu$ L de suspensão de hemácias de galinhas a 1%, durante 30 minutos. Após esse período, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante, utilizado no teste de Inibição da Hemaglutinação.

- Teste de Inibição da Hemaglutinação

Foram realizados quatro testes de Inibição da Hemaglutinação por amostra do experimento, com hemácias de uma das espécies e o soro inativado.

As amostras dos soros foram submetidas à diluição seriada em razão 2, em PBS pH 7,2, na microplaca de poliestireno de fundo em "U", e incubadas com 25 µL do antígeno a 4UA, durante 30 minutos, a 4°C. Posteriormente, adicionou-se suspensão de hemácias a 1%, efetuando nova incubação por mais 30 minutos. A suspensão de hemácias foi a utilizada para a titulação do antígeno. Na leitura observou-se nas cavidades inibição da hemaglutinação, ou seja, a não formação de botões de hemácias. Em todas as placas, foram realizados os controles de hemácia, do antígeno e do soro controle positivo para validação dos resultados.

- Controle de hemácias

No controle de hemácias foi colocado nas cavidades A e B da fileira vertical 11 da microplaca, 50 µL de PBS pH 7,2 e 25 µL de suspensão de hemácia a 1%. Para validação do controle, deve haver aglutinação das hemácias no fundo das cavidades.

- Controle de antígeno

No controle do antígeno foi colocado nas cavidades C e D da fileira vertical 11 da microplaca, 25 µL de PBS pH 7,2, 25 µL do antígeno a 4UA e 25 µL de suspensão de hemácias a 1%. Nessas cavidades deve haver hemaglutinação.

- Soro Controle Positivo

O soro controle positivo foi realizado utilizando soro de avestruz comprovadamente positivo, cedido, pelo laboratório de Campinas – LANAGRO. O procedimento adotado neste caso foi o mesmo realizado nas amostras testes realizando-se diluição seriada em razão 2, em PBS ph 7,2, se adicionando 25 µL do antígeno a 4UA, promove-se um incubação de 30' a 4°C e adicionando 25 µL de suspensão de hemácias a 1%. Nesse caso se observa a inibição da hemaglutinação.

## 6. RESULTADOS

A avaliação sorológica mostrou uma grande discrepância entre os diferentes tipos de hemácias utilizadas como revelador do teste de Inibição da Hemaglutinação. Foi utilizado como ponto de corte, a titulação de 1:8 ( $2^3$ ) para classificação de animais sorologicamente positivos como preconizado pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (MAPA, 2002) e pela OIE. A utilização de hemácias de galinhas como revelador da prova apresentou o maior número de amostras negativos (107), enquanto que a utilização de hemácias de avestruz apresentou 100% de amostras positivas (185).

Quando se utilizou hemácias de galinhas 88,6% (144) das amostras apresentaram resultados negativos, ou seja, titulação igual ou abaixo de 1:4 ( $2^2$ ), sendo 84,3% (107) das amostras da Bahia e 65,5% (38) das amostras de São Paulo (Figura1).

Quando na técnica utilizou-se as amostras do soro inativadas por uma prévia incubação com hemácias de galinha, 17,3% (32) das amostras foram negativas, sendo 21,3% (27) das amostras da Bahia e 8,9% (5) das amostras de São Paulo (Figura 1).

Na revelação da técnica utilizando-se hemácias de perus, somente 4,9% (9) do total das amostras apresentaram resultados negativos, sendo 6,3% (8) das amostras da Bahia e 3,6% (1) das amostras de São Paulo (Figura 1).

Com as hemácias de avestruz, todas as amostras de soro (Bahia e São Paulo) foram classificadas como sorologicamente positivas. Nenhuma amostra apresentou titulação abaixo de  $2^3(1:8)$  (Figra1).

Tabela 1 – Porcentagem de amostras positivas e negativas no teste de HI realizado com hemácias (He) de galinhas (Ga), peru (Pe) e avestruz (Avz).

	He de Ga		Soro inativado com He de Ga		He de Pe		He de Avz	
	BA	SP	BA	SP	BA	SP	BA	SP
Resultados Positivos	15,7%(20)	34,5%(20)	78,7%(100)	91,1%(53)	93,7%(119)	96,7%(57)	100%(127)	100%(58)
Resultados Negativos	84,3%(107)	65,5%(38)	21,3%(27)	8,9%(5)	6,3%(8)	3,6%(1)	0%(0)	0%(0)

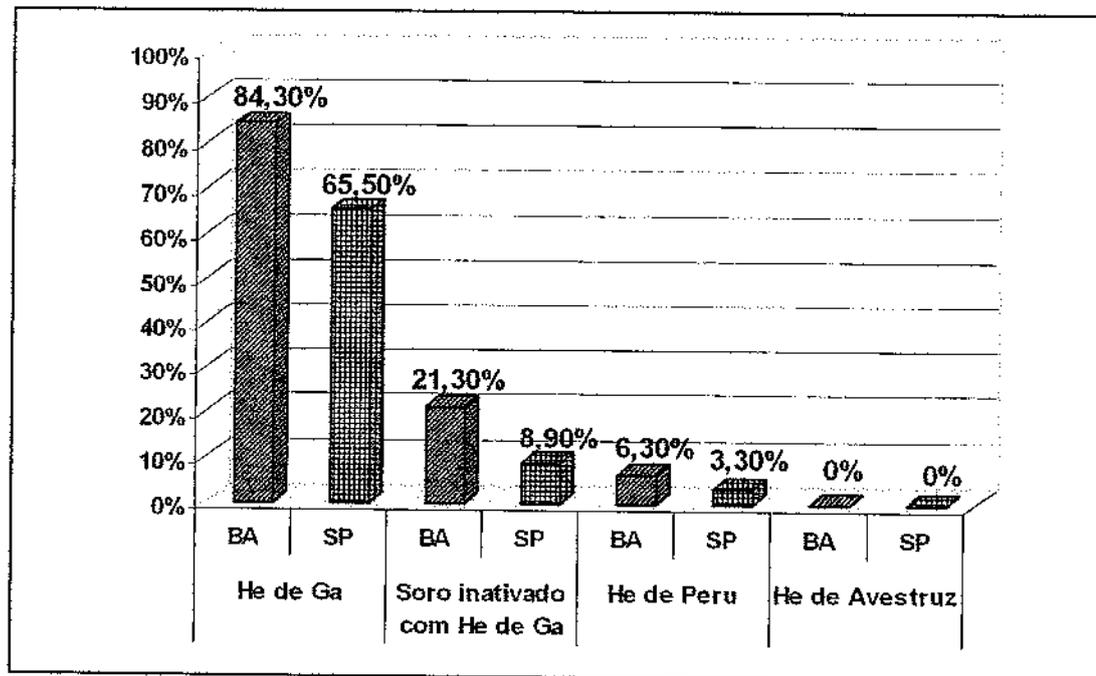


Figura 1 – Porcentagem de resultados negativos das análises realizadas com hemácias de diferentes espécies

Com hemácias de galinhas, observou-se nas amostras da Bahia que 59,0% (75) não apresentaram nenhuma titulação para o VDN quando utilizamos o HI; 9,4% (12) apresentam titulação de  $2^1(1:2)$ ; 15,7% (20) das amostras com títulos de  $2^2(1:4)$ ; 12,6% (16) apresentaram titulação de  $2^3(1:8)$ ; 1,6% (2) com títulos de  $2^4(1:16)$  e 1,6%(2) com títulos de  $2^5(1:32)$  (Figura 2).

Nas amostras de São Paulo, 44,8% (26) não apresentaram titulação; 5,2% (3) com titulação de  $2^1$ ; 15,5% (9) com titulação de  $2^2$ ; 15,5% (9) apresentando títulos de  $2^3$ ; 5,2% (3) com títulos de  $2^4$ ; 6,7% (4) com títulos de  $2^5$  e 6,7% (4) com títulos de  $2^7(1:128)$  (Figura 2).

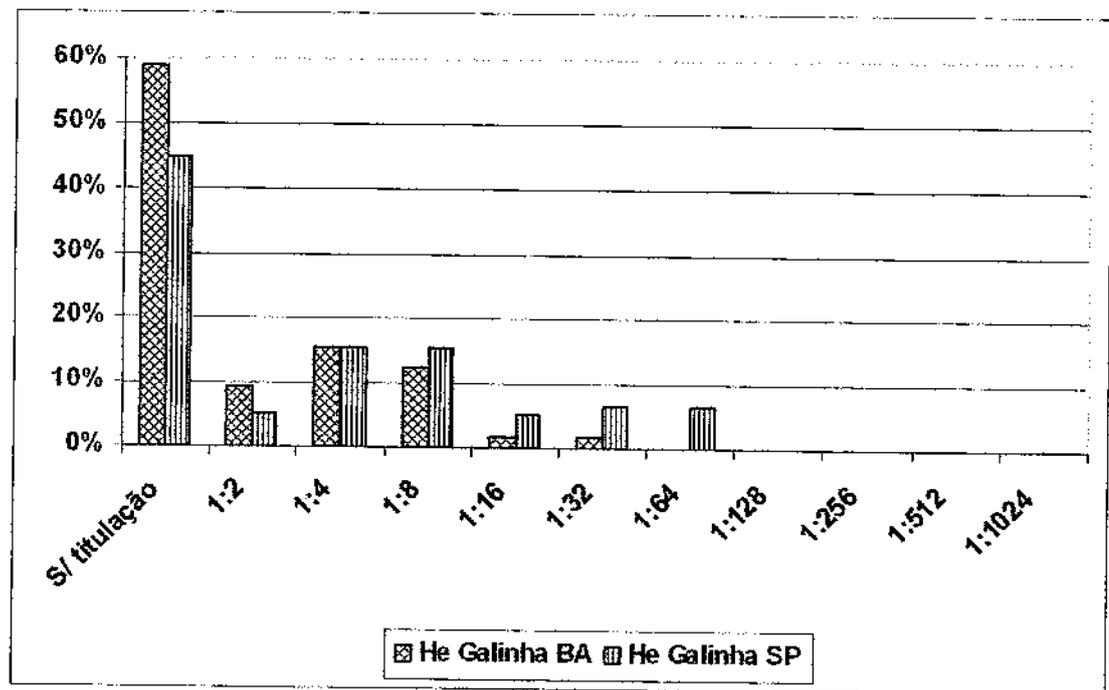


Figura 2 – Titulação das amostras com hemácias de galinha como revelador da prova sorológica de Inibição da Hemaglutinação.

Com a utilização do soro inativado com hemácias de galinhas, 3,2% (4) das amostras da Bahia apresentaram titulação de  $2^1$ ; 18,1% (23) com títulos de  $2^2$ ; 46,5% (59) na diluição de  $2^3$ ; 25,2% (32) com títulos de  $2^4$ ; 6,3% (8) a  $2^5$  e 0,8% (1) das amostras com títulos de  $2^6$  (1:64). As amostras de São Paulo apresentaram 8,6% (5) das amostras com títulos a  $2^2$ ; 34,5% (20) com títulos de  $2^3$ ; 32,7% (19) apresentando títulos de  $2^4$ ; 15,5% (9) em  $2^5$ ; 1,7% (1) com títulos de  $2^6$ ; 5,2% (3) com títulos a  $2^7$  e uma amostra ou 1,7% apresentando titulação na diluição de  $2^{10}$  (1:1024) (Figura 3).

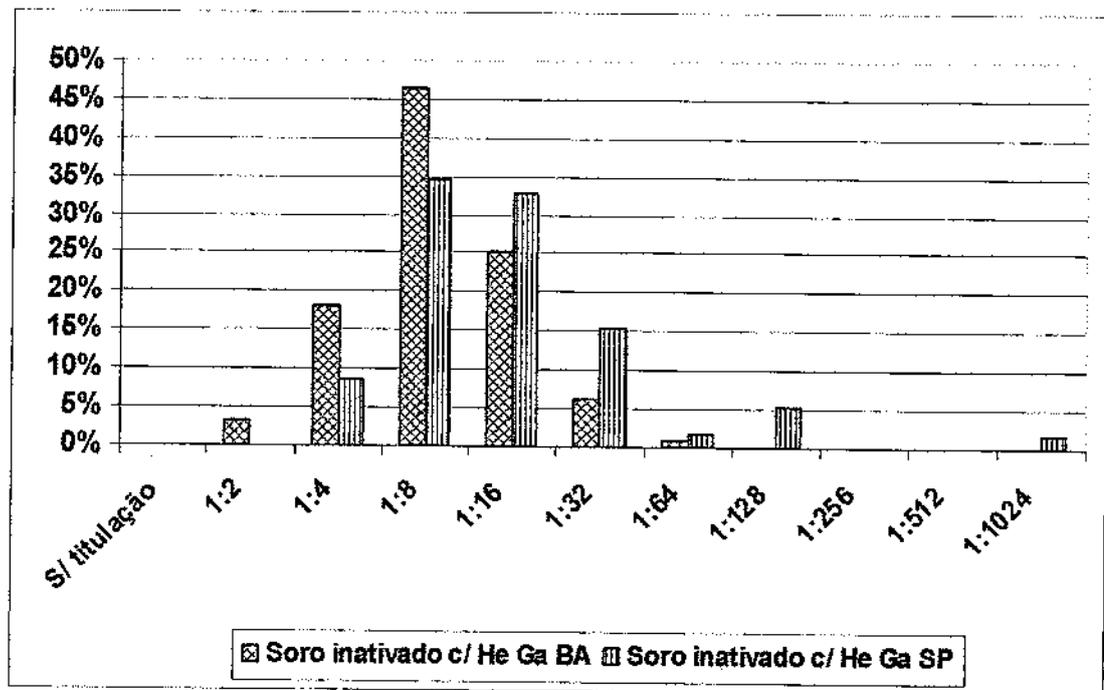


Figura 3 - Titulação das amostras com soro inativado com hemácias de galinha.

Os resultados obtidos no HI com hemácias de peru, nas amostras da Bahia foram: 1,6% (2) que não apresentaram titulação; 0,8% (1) de  $2^1$ ; 3,9% (5) com titulação à  $2^2$ ; 20,5% (26) a  $2^3$ ; 24,4% (31) a  $2^4$ ; 21,3% (27) com titulação de  $2^5$ ; 13,4% (17) apresentando títulos de  $2^6$ ; 7,9% (10) com títulos de  $2^7$ ; 4,7% (6) a  $2^8$  e

1,6 % (2) das amostras com títulos de  $2^{10}$ . As amostras de São Paulo apresentaram 1,7% (1) com títulos de  $2^2$ ; 3,4% (2) a  $2^4$ ; 27,6% (16) com títulos de  $2^5$ ; 32,6% (19) das amostras com títulos de  $2^6$ ; 19% (11) apresentando títulos de  $2^7$ ; 1,7% (1) a  $2^8$ (1:256); 10,3% (6) a  $2^9$ (1:512) e 3,4% (2) com títulos a  $2^{10}$  (Figura 4).

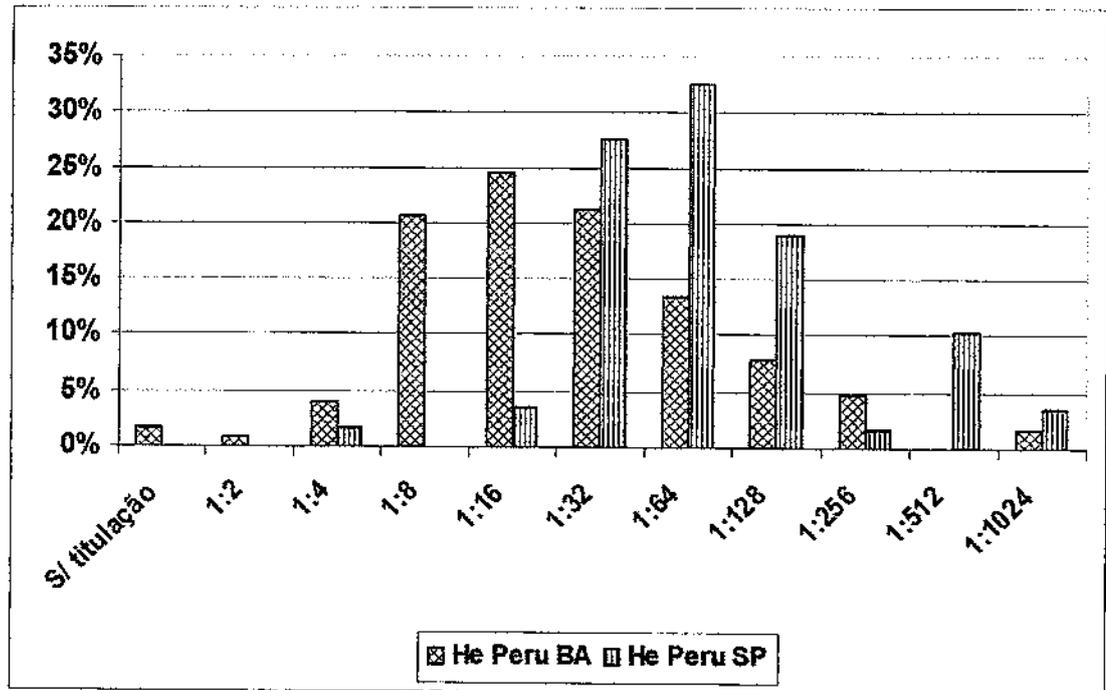


Figura 4 – Titulação das amostras utilizando hemácias de peru como revelador da prova sorológica de Inibição da Hemaglutinação.

Quando se utilizou hemácias de avestruz, as amostras da Bahia apresentaram 3,1% (4) com títulos de  $2^3$ ; 37,8% (48) a  $2^4$ ; 48% (61) apresentando títulos de  $2^5$  e 11% (14) das amostras com títulos de  $2^6$ . Nas amostras de São Paulo, 20,7% (12) apresentaram títulos na diluição de  $2^3$ ; 46,5 % (27), títulos a  $2^4$ ; 15,5% (9) com títulos a  $2^5$ ; 8,6% (5) com títulos a  $2^6$ ; 2,5% (3) apresentando títulos numa diluição de  $2^7$ ; 1,7% (1) com títulos a  $2^8$  e 1,7% (1) com títulos a  $2^{10}$  (Figura 5).

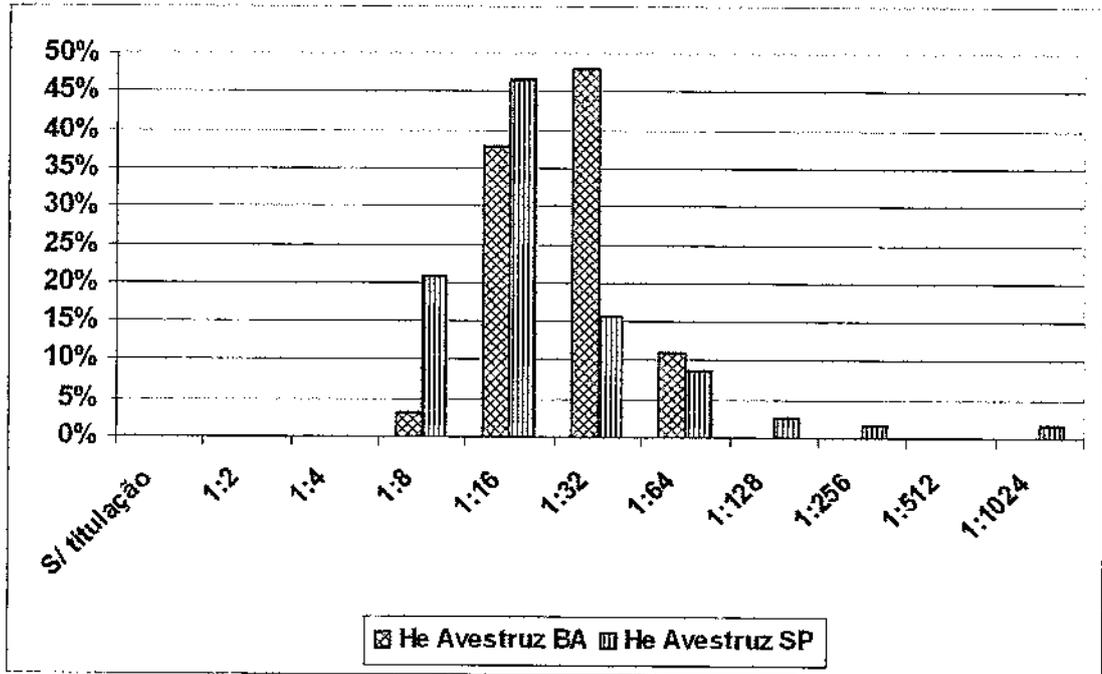


Figura 5 – Titulação das amostras usando hemácias de avestruz como revelador da prova sorológica de Inibição da Hemaglutinação.

Tabela 2 – Comparação das titulações apresentadas pelas amostras na utilização de hemácias de diferentes espécies como revelador da prova de Inibição da Hemaglutinação.

S/ titulação	He Galinha (%)		Soro inativado c/ He Ga (%)		He Avestruz (%)		He Peru (%)	
	BA	SP	BA	SP	BA	SP	BA	SP
1:2	59	44,8	0	0	0	0	1,6	0
1:4	94	5,2	3,2	0	0	0	0,8	0
1:8	15,7	15,5	18,1	8,6	0	0	3,9	1,7
1:16	12,6	15,5	46,5	34,5	3,1	20,7	20,5	0
1:32	1,6	5,2	25,2	32,7	37,8	46,5	24,4	3,4
1:64	1,6	6,7	6,3	15,5	48	15,5	21,3	27,6
1:128	0	6,7	0,8	1,7	11	8,6	13,4	32,6
1:256	0	0	0	5,2	0	2,5	7,9	19
1:512	0	0	0	0	0	1,7	4,7	1,7
1:1024	0	0	0	0	0	0	0	10,3
	0	0	0	1,7	0	1,7	1,6	3,4

Ao comparar os resultados da utilização de hemácias de galinhas na revelação da prova de Inibição da Hemaglutinação com a utilização do soro teste pré inativado com hemácias de galinhas, observa-se a concordância em 37,84% dos resultados: 21,1% (39) se mostraram positivas nos dois casos – 15% (19) das amostras da Bahia e 34,5% (20) das amostras de São Paulo, enquanto, 16,8% (31) das amostras foram negativas – 20,5% (26) das amostras da Bahia, 8,6% (5) das amostras de São Paulo (Figura 6).

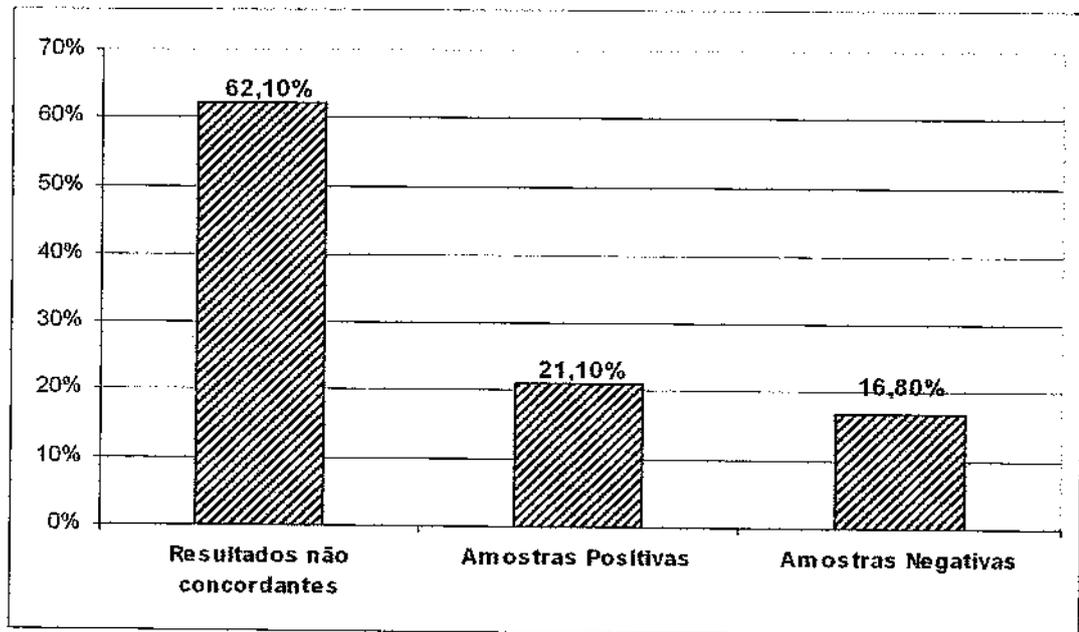


Figura 6 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização de hemácias de galinhas e soro teste inativado.

A menor concordância foi observada quando se comparou a utilização de hemácias de galinhas com hemácias de avestruz, verificando somente 20,6% (40) das amostras com resultados concordantes, e todos esses positivos – 15,7% (20) das amostras da Bahia e 34,5% (20) das amostras de São Paulo. Não houve resultados negativos quando comparamos os dois testes (Figura 7).

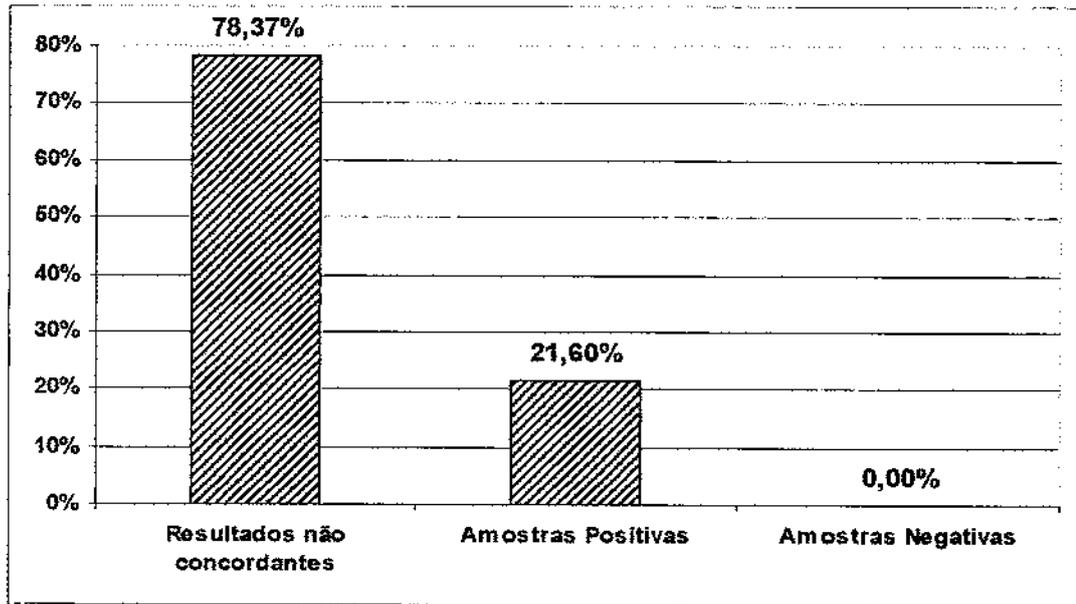


Figura 7 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização de hemácias de galinhas e hemácias de avestruz.

Na comparação de hemácias de galinhas com hemácias de peru 26,5% (49) das amostras apresentaram o mesmo resultado, sendo 21,6% (40) positivos – 15,7% (20) das amostras da Bahia e 34,5% (20) das amostras de São Paulo – e 4,86% (9) negativos – 6,3% (8) da Bahia e 1,72% (1) de São Paulo (Figura 8).

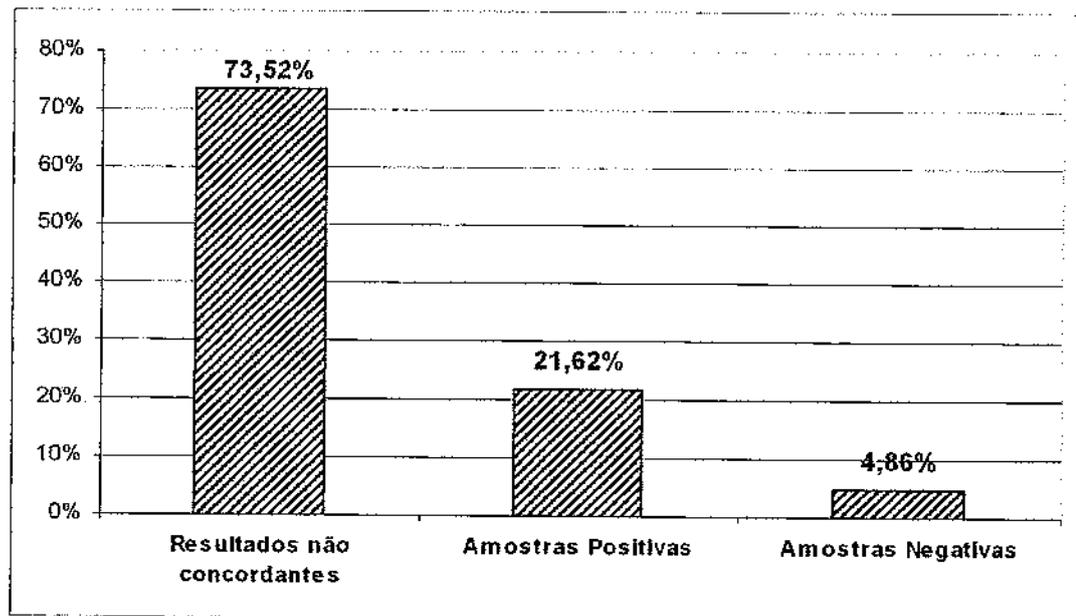


Figura 8 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização de hemácias de galinhas e hemácias de peru.

Há uma boa concordância entre os resultados obtidos quando se compara a utilização do soro teste pré-inativado com hemácias de galinhas e hemácias de peru. 82,2% (152) das amostras coincidiram seus resultados quando comparados: 80% (148) apresentaram-se positivas – 74,8% (95) da Bahia e 91,4% (53) de São Paulo – e 2,1% (4) de amostras negativas – 2,36% (3) da Bahia e 1,72% (1) de São Paulo (Figura 9). Boa concordância também foi encontrada quando comparado a utilização do soro inativado com a utilização de hemácias de avestruz. O percentual de concordância foi praticamente o mesmo – 82,7% (153) de amostras apresentaram o mesmo resultado, sendo todas positivas – 78,74% (100) da Bahia e 91,38% (53) de São Paulo. Não foram encontrados resultados negativos comum aos dois tratamentos (Figura 10).

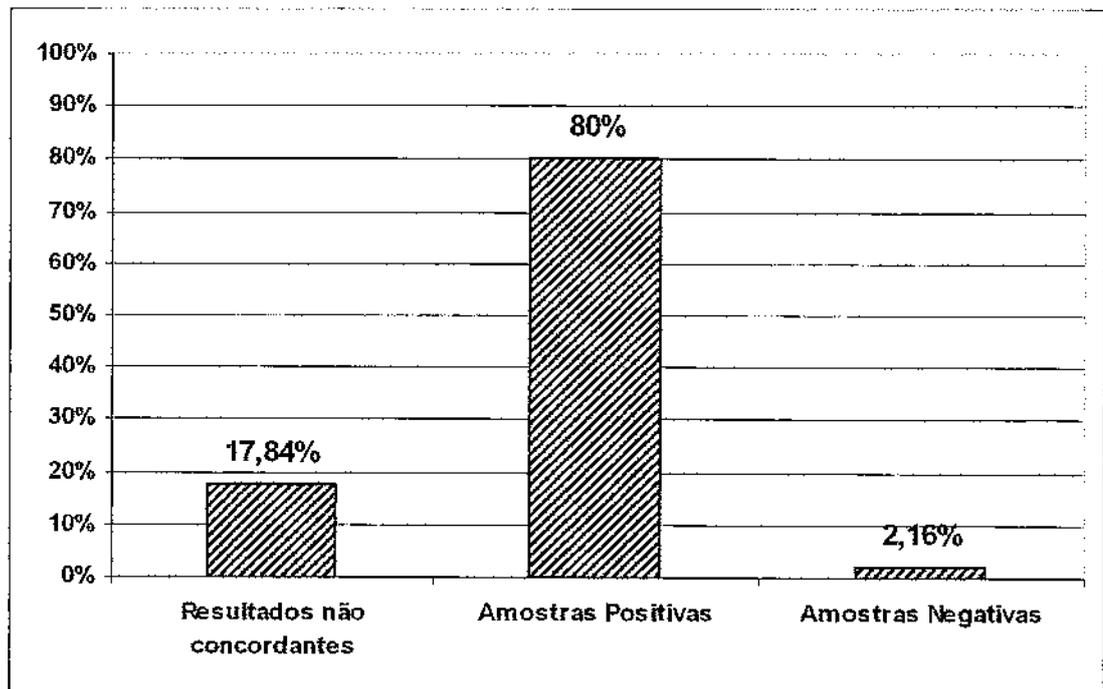


Figura 9 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização do soro teste inativado e hemácias de peru.

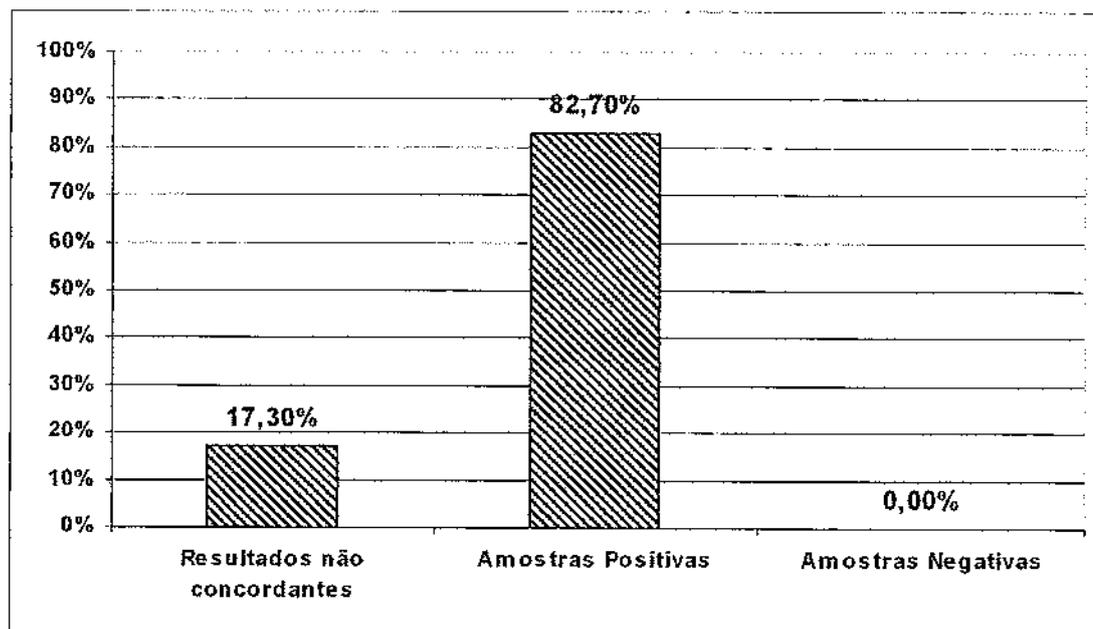


Figura 10 – Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização do soro teste inativado e hemácias de avestruz.

O resultado de maior concordância foi obtido quando se comparou a utilização de hemácias de peru com hemácias de avestruz. 95,1% (176) das amostras mostraram resultados positivos quando comparado os dois testes – 93,7% (119) da Bahia e 98,3% (57) de São Paulo. Não houve resultados negativos.

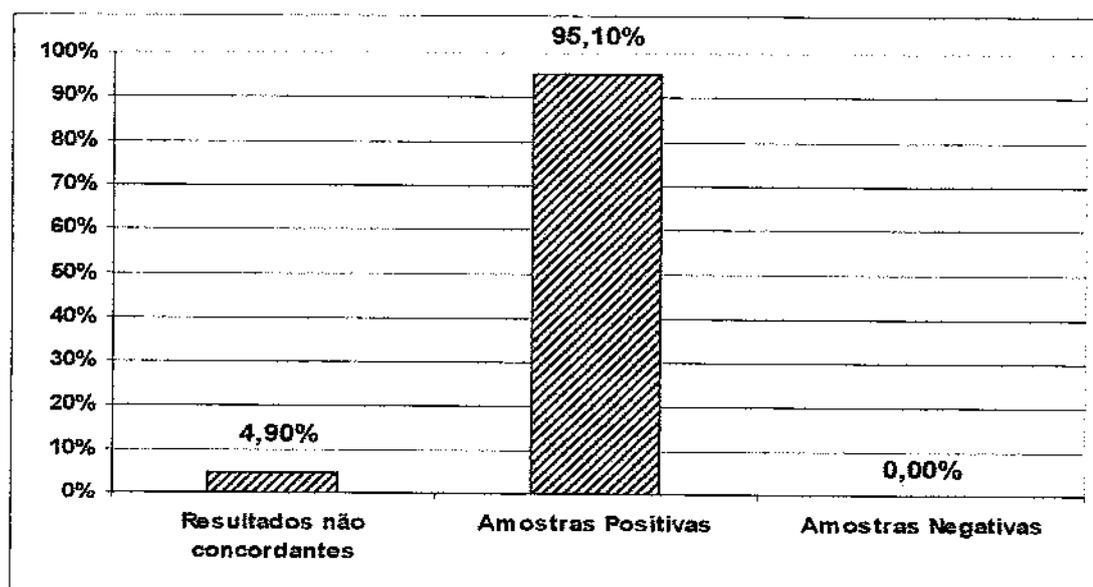


Figura 11 - Porcentagem dos resultados concordantes entre a utilização de hemácias de peru e hemácias de avestruz.

## 7. DISCUSSÃO

A utilização de hemácias de galinhas, como preconiza a técnica, levou a obtenção de resultados incompatíveis quando comparado com hemácias de outras espécies. O uso de hemácias da mesma espécie como revelador da prova de inibição da hemaglutinação é uma recomendação feita por diversos autores (YUSOFF e TAN, 2001; BEARD e WILKES, 1985), sendo indicado, devido a presença de hemaglutininas inespecíficas no soro de avestruz resultando em falsos negativos (GRIMES, 2002), confirmado quando se utilizou a pré-adsorção do soro teste com hemácias de galinhas, que elevou o número de animais positivos de 15,7% para 78,7% no Estado da Bahia e de 34,5% para 91,1% no Estado de São Paulo.

Para evitar resultados falsos negativos recomenda-se o uso de hemácias da própria espécie. No entanto, em relação à avestruzes, existe a dificuldade de serem mantidos em locais de fácil acesso aos laboratórios. Como alternativa, a utilização de hemácias de peru apresenta uma boa sensibilidade e reprodutibilidade (MURPHY, 2003). No ensaio comparando-se os resultados entre hemácia de peru e de avestruz apresentou uma excelente concordância e viabilizaria a execução da técnica em laboratórios, especialmente aqueles distantes de áreas com criatórios de avestruzes.

Outra boa correlação também foi encontrada quando se compara a utilização de hemácias de avestruz com a utilização da amostra teste pré-incubada com

hemácias de galinhas. Apesar da reprodutibilidade de apenas 82,7% quando comparada com 95,1% quando se utiliza hemácias de peru, essa seria uma alternativa, quando a coleta de sangue de peru também fosse uma possibilidade complicada.

Além da interferência do tipo (espécie) das hemácias, outros fatores parecem interferir na reprodutibilidade da Inibição da Hemaglutinação, como erros na diluição, titulação e antígeno utilizado. Alexander e Manvell (2002), avaliaram a capacidade de identificação do antígeno de *Paramyxovirus* aviários e reprodutibilidade do teste HI para diagnóstico da Doença de Newcastle em laboratórios europeus e verificaram grande discrepância nos resultados obtidos pelos 35 laboratórios analisados.

Apesar da HI ser considerada uma técnica de fácil execução e custo relativamente baixo, sua associação com outros testes que apresentem maiores especificidade e sensibilidade garante confiabilidade dos resultados. Koch e Van Roozelaar (1994) analisaram 147 amostras de soro de avestruzes para anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle, por soroneutralização e teste HI, verificando que o número de amostras negativas no teste HI foi tão baixo que impossibilitou a estimativa da sensibilidade e especificidade, e que algumas amostras com índices de neutralização relativamente altos eram negativas no teste HI, sugerindo que os animais negativos no HI provenientes de um lote onde alguns animais foram positivos só deveriam ser removidas, comercializadas ou exportadas se permanecessem negativas duas a três semanas após terem sido isoladas dos animais positivos.

### Soroprevalência da Doença de Newcastle

Os percentuais de positividade variou com o tipo de hemácia utilizada. Atentando ao fato de que no Brasil a vacinação contra a Doença de Newcastle é facultativa para avestruzes (I.N. número 2, PNSA, MAPA, 2002) e que, os proprietários das aves cujas amostras foram testadas neste ensaio afirmaram não terem aplicado quaisquer vacinas em seus animais, supõe-se que os anticorpos detectados sejam decorrentes de contato com amostras de campo, ou de resposta a amostras oriundas de vacinas empregadas para proteger galinhas, criadas na mesma propriedade ou em propriedades vizinhas, dado bastante comum já que existe a possibilidade de galinhas servirem como reservatório da Doença de Newcastle em avestruzes (LEY et al., 2000; HUCHZERMEYER, 1997). Apesar da recomendação de isolamento das avestruzes, essa condição de promiscuidade entre as duas espécies é bastante comum.

A presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle em avestruzes não vacinadas na Suécia e Holanda, também foi observada por Koch et al, 1998. Comparando resultados obtidos na soroneutralização, inibição da hemaglutinação e no b-ELISA, esses autores obtiveram, respectivamente, 66,35%, 61,6% e 57,8% de amostras positivas, ressaltando a ocorrência de reações inespecíficas no HI, levando a resultados falsos negativos e ao ganho na sensibilidade do teste como efeito da inativação de hemaglutininas inespecíficas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ley et al (2000), que analisando amostras de avestruzes observaram mais de 57% (93/211) de amostras

positivas na Inibição da Hemaglutinação para Doença de Newcastle. Huchzermeyer (1997) enfatizou que avestruzes geralmente são mais resistentes a Doença de Newcastle, com menor mortalidade e a apresentação dos sinais clínicos está relacionada à idade dos animais e à via de infecção.

## 8. CONCLUSÕES

- A utilização de hemácias de galinhas como revelador do teste de Inibição da Hemaglutinação para o diagnóstico da Doença de Newcastle em avestruzes, como preconizado pelo padrão da técnica, leva a um número muito elevado de resultados negativos.
- Para que haja uma maior correspondência entre o real resultado é fazer uso da hemácia específica da espécie que esta sendo testada.
- Outras boas opções, que apresentaram concordância nos resultados, é a utilização de hemácias de perus ou a inativação de fatores hemaglutinantes inespecíficos existente nos soros de avestruzes através de uma pré-adsorção com hemácias de galinhas.
- Ambos os Estados analisados apresentaram uma elevada incidência de animais sorologicamente positivos para a Doença de Newcastle, medidas de controle e prevenção devem ser adotadas para que a estrutocultura não venha a ser um impasse para o desenvolvimento da avicultura nacional.

BEARD, C. W.; WILKES, W.J.; **A comparison of Newcastle disease hemagglutination- inhibition test results from diagnostic laboratories in the south-eastern United States** Avian Diseases v.29, p.1048-56, 1985.

BLIGNAUT A.; BURGER, W. P.; MORLEY, A. J.; BELLSTEDT, D. U.; **Antibody responses to La Sota strain vaccines of Newcastle Disease Virus in ostriches (*Struthio camelus*) as detected by enzyme-linked immunosorbent assay.** Avian Diseases, v. 44, n.2, p.390-398, 2000.

BOLTE, A. L.; MEURER, J.; KALETA, E. F.; **Avian host spectrum of avipoxviruses.** Avian Pathology, Oxfordshire, v.28, p.415-432, 1999.

CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; DE ANGELIS, N. D.; ROHDE, C.; COLLINS, N.; ZULU, T.; **Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*).** Avian Pathology, Oxfordshire, v. 26, n.2, p. 357-363, June 1997.

CARDOSO, B.; **Newcastle no Paraná.** Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br>>. Acesso em: 9 de setembro de 2006.

COOPER, R. G.; **Bacterial, fungal and parasitic infections in the ostrich (*Struthio camelus* var. *domesticus*).** Animal Science Journal, v. 76:2, p.97-106, 2005.

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

CUNNINGHAM, C. H. **A Laboratory Guide in Virology**, 4<sup>th</sup> ed. Minneapolis: Bergees Publishing Co. 1966.

D'ÁVILA, Z. S. **Novos Tempos, Novos Rumos.** abr./maio 2005. Disponível em: <<http://www.aepe.com.br/ac=read&nid=114>>. Acesso em: 20 jun. 2006.

DEGEFA, T.; DADI, L.; YAMI, A.; MARIAM, K. G.; NASSIR, M. **Technical and economic evaluation of different methods of Newcastle disease vaccine administration.** Journal Veterinary Medical, v.51, p.365-369, 2004.

FOLITSE, R.; HALVORSON, D. A.; SIVANANDAN, V.; **A dot immunoblotting assay (Dot Blot ELISA) for early detection of Newcastle Disease antibodies in chickens.** Avian Diseases, v.42, p.14-19, 1998.

FOREIGN ANIMAL DISEASES. The Gray Book, part IV – Velogenic Newcastle disease, 1998. Disponível em: <[http://www.vet.uga.edu/gray\\_book/FAD/vnd.htm](http://www.vet.uga.edu/gray_book/FAD/vnd.htm)>. Acesso em: 19 agosto 2006.

GRIMES, A.; **Proteins and glycoproteins of Newcastle disease virus: comparison of serological responses.** J. Virol, v. 7, p 45-47, 2002.

HANSON, R. P. **Newcastle disease.** In: HOFSTAD, M. S.; CALNEK, B. W.; HELMBLDT, C. F.; REID, W. M.; YODER, JR, H. W. (Eds), *Diseases of Poultry*. 6<sup>th</sup>. Ames: Iowa State University Press, p.619-656, 1972.

HANSON, R. P. **Newcastle disease.** In: Hitchner, S. B.; Domermuth, C. H.; Purchase, H. G.; Williams, J. E. (eds.), *Isolations and Identifications of Avian Pathogens*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: American Association of Avian Pathologists, p. 63-66, 1980.

HERNÁNDEZ, M. S.; MONTOYA, N. H.; ARMAS, C. D.; RODRÍGUEZ, J. A.; PÉREZ, A. D. **Pesquisa serologica sobre el virus de la enfermedad de Newcastle en obreros avícolas y un grupo control.** Revista Cubana Higiene e Epidemiologia, v.25, n.1, p.77-84, 1987.

HUA, Y. P.; CHAI, H. L.; YANG, S. Y.; ZENG, X. W.; SUN, Y. **Primary survey of avian influenza virus and Newcastle disease virus infection in wild birds in some areas of Heiglongjiang Province, China.** Journal of Veterinary Science, v.6, n.4, p.311- 315, 2005.

HUANG, Z.; PANDA, A.; ELANKUMARAN, S.; GOVINDARAJAN, D.; ROCKEMANN, D. D.; SAMAL, S. K. **The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence.** Journal of Virology, v.78, n.8, p. 4176-4184, 2004.

HUCHZERMEYER, F. W.; **Animal health risks associated with ostrich products.** Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot, v.16, p.111-116, 1997.

JAENISCH, F. R. F.; **Biosseguridade na produção de frango no sistema agroecológico.** In: CURSO VIRTUAL SOBRE PRODUÇÃO AGROECOLÓGICO DE FRANGO DE CORTE, 1., 2003, Concórdia/ SC. Anais..., p. 43-50, 2003.

JORGE, M. A.; MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S. **Método caseiro.** Avicultura Industrial, n.1075, p 20-21, 2000.

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

KAPCZYNSKI, D. R.; KING, D. K.; **Protection of 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 the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak.** *Vaccine*, v.23, p.3424-3433, 2005.

KOCH, G.; CZIFRA, G.; ENGSTROM, B. E.; **Detection of Newcastle disease virus-specific antibodies in ostrich sera by three serological methods.** *Veterinary Record*, v.143, p.10-12, 1998.

KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D.; **Comparison of haemagglutination inhibition titres and neutralization indices of ostriches sera.** In: Edited by Dennis J. Alexander. *Proceedings of the joint second annual meetings of the national Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of countries of the European Union.* Held in Brussels, 18-19<sup>TH</sup>, p.97-99, OCTOBER 1994

KOMMERS, G. D.; KING, D. J.; SEAL, B. S.; BROWN, C. C. **Pathogenesis of chicken-passaged Newcastle disease viruses isolated from chickens and wild and exotic birds.** *Avian Diseases*, v.47, n.2, p.319-329, 2003

KUMANAN, K.; MEIGNANALAKSHMI, A.; MEENU, R.; NAINAR, A. M. **Pathotyping of a newcastle disease virus isolated from emus (*Dromaius novaehollandiae*).** *Tropical Animal Health and Production*, v.35, p. 391-395, 2003.

LANCASTER, J. E.; **A History of Newcastle Disease with Comments on its Economic Effects.** *World's Poultry Science Journal*, v.32, n.2, p.167-175, May 1976.

LAMBRECHT, B.; GONZE, M.; MEULEMANS, G.; VAN DEN BERG, T. P.; **Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon- $\gamma$  in response to mitogen and recall newcastle disease viral antigen stimulation.** *Avian Pathology*, v. 33, n.3, p. 343-350, 2004.

LEEuw, O.S.; KOCH, G.; HARTOG, L.; RAVENSHORST, N.; **Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein.** *Journal of General Virology*, v.86, p.1759-1769, 2005.

LEY, E.C.; MORISHITA, T.Y.; HARR, B.S.; MOHAN, R. BRISKER, T.; **Serologic survey of slaughter-age ostriches (*Struthio camelus*) for antibodies to selected avian pathogens.** Avian Diseases, v. 44, 989-92, 2000.

LICATA, M. J.; LADMAN, B. S.; JUNIOR, J. G.; FOLTZ, J. A.; POPE, C. R. **Efficacy of combined infectious Bronchitis/Newcastle disease vaccines.** Northeastern Conference on Avian Diseases, New York, p.15-17, 2005

MANVELL, R.J.; FROST, K.; ALEXANDER, D.J.; **Characterization of Newcastle disease and avian influenza viruses from ratites submitted to the International Reference Laboratory.** In: Proc. International Ratite Conference, Manchester: C. Deeming, p.45-46, 1966.

MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS. OIE 2004. Newcastle disease. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00038.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm) >. Acesso: 10 de setembro de 2006.

MAPA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola.** Abr. 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br> >. Acesso em 10 de setembro de 2006

McFERRAN, J. B. **Control of Newcastle disease in Northern Ireland.** Proceedings – Avian Exotic Disease Control Seminar. Glenfield: Agriculture & Fisheries, p. 16-21. 1989.

MURPHY, A.; **Responses to different red blood cells in *Mycoplasma galisepiticum* diagnosis** In: BARRENS, B. (Ed). Proceedings of the 25<sup>th</sup> Prairie Grouse Technical Council, Wiscosin: Natural Resources Centre, p. 12-25, 2003.

NUNES, J. E. S.; VASCONCELOS, A. C.; JORGE, M. A.; GUIMARÃES, E. B.; PAIXÃO, T. A.; MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S. **Estudo comparativo da virulência de amostras de vacina de vírus da doença de Newcastle em galinhas SPF por meio da análise morfométrica da espessura traqueal.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.54, n.4, 2002.

OIE; **Newcastle disease.** Office International des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines 4th Ed. Paris: Office Internationale des Epizooties. p.161-169, 1996.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; PORTZ, C.; LOUREIRO, B. O.; SCHIAVO, P. A.; FEDULLO, L. P. L.; MAZUR, C.; ANDRADE, C. M. **Vírus da doença de Newcastle**

em aves não vacinadas no Estado do Rio de Janeiro. *Ciência Rural*, v.33, n.2, 2003.

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

PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. **Doença de Newcastle.** In: JÚNIOR, A. B.; MACARI, M. *Doença das Aves.* São Paulo: FACTA, cap.5, p. 267 - 276, 2000

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

PFITZER, S.; VERWOERD, D. J.; GERDES, G. H.; LABUSCHAGNE, A. E.; REASMUS, A.; MANVELL, R. J.; GRUND, C. **Newcastle disease and avian influenza A virus in wild waterfowl in South Africa.** *Avian Diseases*, v.44, p.655-660, 2000.

SAMBERG, Y.; HADASH, D. U.; PERELMAN, B.; MEROZ, M. **Newcastle disease in ostriches (Struthio camelus): field case and experimental infection.** *Avian Pathology*, v.18, p.221-226, 1989.

SANTOS, B. M.; MARTINS, N. R. S.; RESENDE, M.; GOUVEIA, A. M. G.; **Resposta imune conferida pelas amostras La Sota e VG /GA do vírus da doença de Newcastle.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.48, n.6, p.645-656, 1996.

SANTOS, M. S. V.; **Biosseguridade em todos os níveis.** Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br>>. Acesso em: 09 setembro 2006.

SESTI, L.; **Biosseguridade na moderna avicultura: O que fazer e o que não fazer.** Disponível em: < <http://www.vet.uga.edu>>. Acesso em: 19 de outubro de 2006.

SOUZA, R. L. M.; RODOVALHO, M. V.; GIANNONI, M. L.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A. **Padronização e aplicação do método BFL-ELISA para a detecção de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em emas e avestruzes.** *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 2, p. 88, 2000.

SOUZA, R. L. M.; CARDOSO, T.C.; PAULILLO, A.C.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; **Comparação entre as técnicas de ELISA indireto, ELISA com duplo anticorpo e Inibição da Hemaglutinação na detecção de anticorpos contra o**

- vírus da Doença de Newcastle.** Revista Brasileira de Ciência Avícola, v.1, p. 43-47, 1999.
- SPREADBROW, P. B.; Thermostable Newcastle disease vaccines for use in village chickens.** 1999. In: First INFPD/FAO Electronic Conference on Scope and Effect of Family Poultry Research and Development, Guèye E. F. (Ed.) Disponível <<http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/aga/agap/lpa/fampo1/freecom10.htm>>. Acesso em: jan. 2005.
- STONE-HULSLANDER, J.; MORRISON, T. G.; Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells.** Journal of Virology, v.71, n.9, p. 6287-6295, Sept 1997.
- SWAYNE, D. E.; KING, D. J. Avian influenza and Newcastle disease.** JAVMA, v.222, n.11, June 1, 2003.
- VERWOERD, D.J.; Velogenic Newcastle disease epidemic in South Africa. Part II: Ostriches, waterfowl, exotic bird collections and wild birds, South African Veterinary Medicine.** V.8, p.44 – 49, 1995
- WILLIAMS, R.; BOSHOFF, C. H.; VERWOERD, D.; SCHOEMAN, M.; VAN WYK, A.; GERDES, T. H.; ROOS, K. Detection of antibodies to Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) by an indirect ELISA.** Avian Diseases, v.41, n.4, p.864-869, Oct/Dec 1997.
- WOBESER, G.; LEIGHTON, F. A.; 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, 353-359, 1993.
- YUSOFF, K.; TAN, W. S. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities.** Avian Pathol, v.30, p.439-455, 2001.
- ZHUHUI, H.; PANDA, A.; ELANKUMARAN, S.; GOVINDARAJAN, D.; ROCKEMANN, D. D.; SAMAL, S. K. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence.** Journal of virology, v.78, n. 8, p. 4176-4184, 2004.