

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Investigação de vírus de impacto na sanidade avícola em aves silvestres no
Rio Grande do Sul**

Alice Teixeira Meirelles Leite

Pelotas, 2017

Alice Teixeira Meirelles Leite

**Investigação de vírus de impacto na sanidade avícola em aves silvestres no
Rio Grande do Sul**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas

Coorientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L533i Leite, Alice Teixeira Meirelles

Investigação de vírus de impacto na sanidade avícola em aves silvestres no Rio Grande do Sul / Alice Teixeira Meirelles Leite ; Gilberto D'Ávila Vargas, orientador ; Geferson Fischer, coorientador. - Pelotas, 2017.

53 f. : il.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. NDV. 2. Doença de Marek. 3. IBDV. 4. Aves migratórias. 5. ELISA. I. Vargas, Gilberto D'Ávila, orient. II. Fischer, Geferson, coorient. III. Título.

CDD : 636.0896925

Alice Teixeira Meirelles Leite

Investigação de vírus de impacto na sanidade avícola em aves silvestres no
Rio Grande do Sul

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências,
Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 31/08/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas (Orientador)
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Roberto de Andrade Bordin
Doutor em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses pela Universidade de
São Paulo

Médica Veterinária Luiza da Gama Osório
Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Médica Veterinária Ana Paula Neuschrack Albano
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

**Para Paula e Theo, o melhor presente que minha
família me deu.**

Agradecimentos

E aqui estou eu novamente, expressando minha gratidão aos que tornaram possível este trabalho: como sempre, minha família, por todo carinho e apoio, por acreditarem. Minha família e amigos de Rio Grande, que cuidam tão bem de mim.

Professores, servidores e colegas do Laboratório de Virologia e Imunologia, pela gentileza e conhecimento compartilhado. Meu orientador, Prof. Dr. Gilberto D'Ávila Vargas, e meu coorientador, Prof. Dr. Geferson Fischer, que com paciência e otimismo guiaram este trabalho.

Equipes do Museu Oceanográfico "Prof. Eliézer de C. Rios" e do Biotério Central da FURG, pela amizade e pelas oportunidades de crescimento profissional. Tenho muito orgulho em ser parte desses times!

Três pessoas cuja generosidade salvaram meu trabalho: Milton Oliveira Amado, Sérgio Jorge e Odir Dellagostin.

Minha super equipe de coletas: Ana Cristina, Déia, Gabi, Ana Paula, Wagner e Natan.

Este trabalho tem um pouco de cada um de vocês... Obrigada por tudo!

***“Nenhum trabalho é tão grande, nenhum filhote
é tão pequeno.”***

Ryder - Líder da Patrulha Canin

Resumo

MEIRELLES LEITE, Alice Teixeira. **Investigação de vírus de impacto na sanidade avícola em aves silvestres no Rio Grande do Sul**. 2017. 53f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O Brasil é o segundo produtor mundial de carne de frango, com produção de 13,14 milhões de toneladas em 2015, sendo em torno de 4 milhões de toneladas destinadas à exportação. Aves silvestres de vida livre são capazes de carrear microrganismos patogênicos de forma biológica ou mecânica, podendo atuar como disseminadores de diferentes enfermidades na produção industrial, comercial ou doméstica de aves. O objetivo deste estudo é investigar a exposição aos vírus da Doença de Newcastle (NDV), Doença de Marek e Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio (IBDV) em aves silvestres residentes próximo a uma criação de aves coloniais, e em aves migratórias (*Calidris fuscicollis* e *Thalassarche melanophris*) capturadas no litoral do Rio Grande do Sul. A metodologia empregada foi a detecção de material genético viral por RT-PCR e PCR em suabes de orofaringe e cloaca, e pesquisa de anticorpos por ELISA em amostras de soro e sangue total colhido em papel filtro. Não foi detectada a presença de NDV e vírus da Doença de Marek por métodos moleculares nas aves silvestres pesquisadas (n=24), nem anticorpos contra NDV e IBDV nos ensaios imunoenzimáticos (n=30). Todas as amostras de soro de *Calidris fuscicollis* testadas (n=58) mostraram resultados negativos para anticorpos contra NDV e IBDV. No entanto, 50% (4/8) apresentaram positividade para anticorpos contra vírus da Doença de Marek. Em *Thalassarche melanophris*, 100% das amostras foram negativas para IBDV e positivas para o vírus da Doença de Marek. No presente estudo não foram detectadas a excreção ou a exposição prévia das aves silvestres residentes pesquisadas ao NDV, vírus da Doença de Marek e IBDV pelas técnicas diagnósticas empregadas, porém nas duas espécies migratórias amostradas foi evidenciado o contato prévio com o vírus da Doença de Marek.

Palavras-chave: NDV; Doença de Marek; IBDV; aves migratórias; ELISA

Abstract

MEIRELLES LEITE, Alice Teixeira. **Investigation of impact viruses in poultry health of wild birds in the State of Rio Grande do Sul.** 2017. 53f. Thesis (Doctor degree in Sciences) Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Brazil is the second largest producer of chicken meat, with a 13.14 millions of tons production in 2015 and, about 4 millions of tons were for export. Wild birds, of free life, due to its biological characteristics are capable of carrying pathogenic microorganisms both biologically or mechanically, may thus act as disseminators of several different diseases in industrial, commercial and even domestic poultry production. This study aims at investigating the exposure to Newcastle Disease Virus (NDV), Marek's Disease and Infectious Bursal Disease (IBDV) in wild birds living near a colonial poultry breeding and, in migratory birds (*Calidris fuscicollis* and *Thalassarche melanophris*) captured off the coast of Rio Grande do Sul. The methodology used was the viral genetic material detection using RT-PCR and PCR in cloacal and oropharynx swabs and ELISA serology in total blood samples collected in filter paper. It was not detected the presence of NDV or Marek's Disease Virus by molecular methods in the wild birds investigated (n=24), NDV and IBDV antibodies were also not detect in immunoenzymatic assays (n=30). All serum samples of *Calidris fuscicollis* tested (n=58) were negative for NDV and IBDV antibodies. However, 50% (4/8) presented positive results for Marek's Disease virus antibodies. In *Thalassarche melanophris*, 100% of the samples returned negative for IBDV and positive for Marek's Disease Virus. In the present study, no excretion or previous exposure of resident wild birds surveyed to NDV, Marek's disease virus and IBDV was detected by the diagnostic techniques employed, however, in the two migratory species sampled, previous contact with the Marek's Disease Virus was evidenced.

Key Words: NDV; Marek's Disease; IBDV; migratory birds; ELISA

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	População de aves silvestres e de pintos coloniais utilizada no estudo.....	25
Tabela 2	<i>Primers</i> utilizados na reação de RT-PCR e PCR.....	26
Tabela 3	Frequência das espécies amostradas e amostras biológicas analisadas.....	27

Artigo 2

Tabela 1	Resultados dos ensaios imunoenzimáticos para NDV, Doença de Marek e IBDV.....	38
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Grau Celsius
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
IBDV	Vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de FabricioND Doença de Newcastle
NDV	Vírus da Doença de Newcastle
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com transcrição reversa
®	Marca Registrada

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Objetivos.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 Revisão de Literatura.....	15
3.1 Doença de Newcastle.....	15
3.2 Doença de Marek.....	17
3.3 Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio.....	19
4 Artigos.....	21
4.1 Artigo 1.....	22
4.2 Artigo 2.....	35
5 Considerações Finais.....	42
Referências.....	43
Anexos.....	50

1 Introdução

A avicultura é uma atividade econômica tradicionalmente forte no Brasil. Em 2015 o país era o segundo maior produtor mundial de carne de frango, com 13,14 milhões de toneladas, e o maior exportador, sendo em torno de 4 milhões de toneladas destinadas à exportação, gerando uma receita cambial de US\$ 7,1 milhões (ABPA, 2017). A expectativa é de que a produção continue a crescer, atingindo 14 milhões de toneladas em 2017 (CNA, 2017).

A interação entre aves silvestres e domésticas é considerada um fator para a ocorrência de diferentes enfermidades na produção industrial, comercial ou doméstica de aves (SCHERER *et al.*, 2011). Aves selvagens de vida livre são potenciais portadores e carreadores de diversos agentes patogênicos, disseminados de forma biológica ou mecânica, através de seus excrementos e secreções, ou ainda transportados em seus ectoparasitas (HUBÁLEK, 2004).

A Doença de Newcastle é uma enfermidade causada por um Paramyxovírus, aguda, altamente contagiosa, que acomete aves silvestres e comerciais, de distribuição mundial, com áreas/países considerados livres da doença, e com áreas onde ela é endêmica. Países exportadores estabelecem monitoramentos constantes, para avaliar a sua situação, assim como para tentar evitar a entrada da enfermidade. Em muitos países, incluindo o Brasil, a doença vem sendo controlada em plantéis comerciais através da vacinação, com vacinas aprovadas e com controle de qualidade (MAPA, 2013), que suprimem os sinais clínicos, porém não a eliminação do agente.

A Doença de Marek, cujo agente etiológico é um Alphaherpesvírus, é igualmente cosmopolita, com mortalidade entre 30% e 60% das aves nos lotes afetados. A enfermidade tem um grande impacto econômico na indústria avícola em função dos custos de vacinação, mortalidade, condenações de carcaças e diminuição na produção de ovos (LANDMAN; VERSCHUREN, 2003). Como não há tratamento, medidas de controle e prevenção, como a vacinação, devem ser tomadas para evitar o prejuízo pela infecção (CANAL; BARBOSA, 2009).

A Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio é outra enfermidade de distribuição mundial que apresenta considerável importância econômica em galinhas, devido à alta incidência nos plantéis comerciais. Seu agente etiológico, pertencente à família

Birnaviridae, pode provocar desde elevada mortalidade durante a fase aguda da infecção até severa e prolongada imunossupressão, predispondo ao desenvolvimento de enfermidades secundárias e implicando em maior impacto econômico (BERNARDINO; LEFFER, 2009).

Em função da potencial disseminação de patógenos de interesse para a avicultura comercial resultante do contato entre aves de vida livre e de produção, o objetivo deste estudo é investigar a exposição aos vírus da Doença de Newcastle, Doença de Marek e Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio em aves silvestres residentes próximo a uma criação de aves coloniais na região de Pelotas – RS, e em aves migratórias que ocorrem no litoral do Rio Grande do Sul.

Os resultados deverão contribuir para uma melhor compreensão do papel das aves silvestres como reservatórios e disseminadores de vírus aviários de interesse em Medicina Veterinária, bem como, para reforçar a importância da manutenção das medidas sanitárias na indústria avícola local.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Detectar a exposição a vírus de impacto na sanidade avícola em aves silvestres de vida livre no Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Detectar o vírus da Doença de Newcastle e da Doença de Marek em aves silvestres residentes próximo a uma criação semi-intensiva de aves coloniais na região de Pelotas – RS, pela técnica de RT-PCR e PCR;
- ✓ Pesquisar anticorpos contra os vírus da Doença de Newcastle e da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio em aves silvestres residentes próximo a uma criação semi-intensiva de aves coloniais na região de Pelotas – RS, pela técnica de ELISA indireto;
- ✓ Pesquisar anticorpos contra os vírus da Doença de Newcastle, da doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio e Doença de Marek em duas espécies de aves marinhas migratórias que ocorrem no litoral do Rio Grande do Sul, Maçarico-de-sobre-branco (*Calidris fuscicollis*) e Albatroz-de-sobrancelha-negra (*Thalassarche melanophris*), pela técnica de ELISA indireto;

3 Revisão de Literatura

3.1 Doença de Newcastle

A Doença de Newcastle é uma enfermidade causada pelo Paramyxovírus aviário tipo I, pertencente ao gênero *Avulavírus* e à família *Paramyxoviridae*. As partículas víricas são esféricas ou pleomórficas, medindo de 150 a 300nm de diâmetro, consistindo basicamente de um envelope lipoprotéico, um nucleocapsídeo helicoidal que envolve o genoma de RNA fita simples de polaridade negativa, e uma proteína matriz (ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007; LEIGHTON; HECKERT, 2007).

Esse agente foi categorizado em cinco patotipos com base na virulência da amostra viral e nos sinais clínicos em galinhas infectadas, designados: (a) velogênicos viscerotrópicos, que cursam com mortalidade elevada e lesões hemorrágicas no intestino; (b) velogênicos neurotrópicos, que apresentam mortalidade elevada, sinais respiratórios e neurológicos; (c) mesogênicos, caracterizados por sinais respiratórios e ocasionalmente neurológicos; (d) lentogênicos, que causam infecção subclínica ou sinais respiratórios moderados; e (e) assintomáticos (OIE, 2013; ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007).

A clivagem da proteína F, responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular do hospedeiro, também é essencial para a infectividade e virulência dos Paramyxovírus, exercendo um papel determinante na patogenicidade do agente. Para que o processo de infecção viral ocorra, é necessário que o precursor F0 seja clivado nas proteínas F1 e F2 pelas proteases do hospedeiro. Cepas que clivam F0 com mais eficiência tendem a ser mais virulentas, em contraste com cepas deficientes na clivagem (ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007; PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009; ALEXANDER, 2011).

A transmissão ocorre pelo contato com partículas virais presentes no ar, fezes, água, carcaças, fômites e vacinas contaminadas (LEIGHTON; HECKERT, 2007), e o agente é eliminado durante o período de incubação, nos estágios clínicos e por um período limitado durante a convalescença, podendo sobreviver por longos períodos à temperatura ambiente, especialmente nas fezes (ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007;

OIE, 2013). A vacinação contra a Doença de Newcastle protege as aves das consequências clínicas da doença, mas não impede a replicação e excreção viral (ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007).

O diagnóstico da infecção pelo vírus da Doença de Newcastle é obtido pelo isolamento do agente em ovos embrionados a partir de suabes traqueais, orofaríngeais ou cloacais de aves vivas, ou de macerados de órgãos a partir de aves mortas, seguido da técnica de Hemaglutinação (HA) com eritrócitos de galinha. A seguir o agente hemaglutinante detectado é identificado por uma prova de Inibição da Hemaglutinação. O diagnóstico também pode ser realizado por RT-PCR a partir de RNA extraído das amostras clínicas (ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007; OIE, 2013).

O diagnóstico completo da doença requer a determinação da virulência do agente, que pode ser obtida pelo sequenciamento de genes ou por testes *in vivo*, como o que determina o índice de patogenicidade intracerebral (IPIC). Este teste se baseia na inoculação do líquido alantóide hemaglutinante no cérebro de pintinhos SPF de um dia com observação a intervalos de 24 horas durante oito dias, ou até o óbito. A seguir aplica-se uma escala de pontuação que atribui 0,0 (zero) pontos a cada avesadia, 1 (um) ponto às aves doentes e 2 (dois) pontos às aves mortas, acumulados diariamente até o fim do experimento. O IPIC é o resultado médio por ave e por observação (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2005; ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007; OIE, 2013). Cepas com índice acima de 0,7 são classificadas como velogênicas, fazendo parte da Lista da OIE (Organização Internacional de Epizootias) e são de notificação obrigatória para os países signatários da Organização Mundial do Comércio (OMC) (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2005).

Apesar das medidas profiláticas rigorosas praticadas pelas autoridades sanitárias, de acordo com as recomendações da OIE, o vasto território brasileiro apresenta uma grande diversidade de vida selvagem, incluindo aves selvagens residentes e migratórias, que podem ser reservatórios naturais ou portadores do vírus da Doença de Newcastle, uma vez que muitas aves migratórias vêm de regiões onde o agente é endêmico (THOMAZELLI *et al.*, 2012). Além disso, as aves silvestres aquáticas podem atuar como reservatórios para os patótipos lentogênicos do vírus, os quais podem sofrer mutação após infectar aves domésticas, tornando-se mais virulentos (OIE, 2013).

O vírus já foi encontrado em aproximadamente 250 espécies de aves silvestres e de produção (LEIGHTON; HECKERT, 2007), porém, no Brasil, poucos estudos

foram desenvolvidos em aves silvestres: Oliveira-Junior *et al.* (2003) encontraram uma baixa prevalência (1,43%) do vírus doença de Newcastle em aves silvestres de zoológicos do estado do Rio de Janeiro; Silva *et al.* (2006) detectaram títulos de anticorpos para o vírus, variando entre 2 e 64, no soro de pardais (*Passer domesticus*) capturados em granjas de corte e postura localizadas no Estado de Pernambuco.

Por sua importância econômica, a Doença de Newcastle consta no Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle (MAPA, 2013) e na lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial da Saúde (OIE, 2013).

3.2 Doença de Marek

A Doença de Marek é uma enfermidade causada por um Alphaherpesvírus pertencente ao gênero *Mardivírus* e à família *Herpesviridae*. As partículas víricas são esféricas ou pleomórficas, medindo entre 120 e 300 nm de diâmetro, e consistem de um núcleo contendo uma molécula de DNA de fita dupla linear; um capsídeo icosaédrico envolvendo o núcleo; uma camada proteica amorfa que recobre o capsídeo, chamada tegumento; e um envelope lipoprotéico contendo glicoproteínas na sua superfície (NAIR *et al.*, 2013, FRANCO; ROEHE, 2007).

Como qualquer Herpesvírus, são capazes de permanecer latentes em seus hospedeiros naturais, período em que ocorre pouca ou nenhuma expressão gênica. Em determinadas situações, geralmente associadas com estresse, o genoma é ativado e a produção de progênie viral é reiniciada, acompanhada de episódios esporádicos de reativação e excreção do agente (FRANCO; ROEHE, 2007, CANAL; BARBOSA, 2009).

Três sorotipos do vírus da Doença de Marek (MDV) estão atualmente classificados de acordo com testes de soroneutralização, precipitação em gel de ágar e PCR. Os vírus do sorotipo 1 (MDV-1) incluem os MDVs oncogênicos e seus variantes atenuados em cultivo celular, entre esses, algumas cepas vacinais. Dentro do sorotipo 2 (MDV-2), encontram-se os vírus não-oncogênicos, que ocorrem naturalmente em galinhas; e, no sorotipo 3, são agrupados os vírus não-oncogênicos de perus (turkey herpesviruses - HVT), que são utilizados na forma de vacinas contra a doença de Marek em galinhas (FRANCO; ROEHE, 2007). Com base na sua capacidade de causar tumores em aves, as cepas de campo do sorotipo 1 são ainda divididas em

patotipos, referidos como mild (m)MDV, virulent (v)MDV, very virulent (vv)MDV, e very virulent plus (vv+)MDV (NAIR *et al.*, 2013).

A infecção ocorre de forma horizontal, por inalação de poeira contaminada com partículas virais livres produzidas nos folículos das penas, que permanece nos galpões por muitos meses. As aves começam a excretar o vírus por volta de duas semanas após a infecção, sendo o nível máximo na terceira e quinta semanas. O MDV pode persistir por longos períodos no meio ambiente e é tão ubíquo que, virtualmente, todas as aves domésticas do mundo entram em contato com o agente em alguma fase de suas vidas (CANAL; BARBOSA, 2009; NAIR *et al.*, 2013).

Na forma clássica, os sinais neurológicos são os predominantes, ocorrendo na forma de paralisia assimétrica progressiva dos membros. O achado característico é o aumento de um ou mais nervos periféricos. Os mais frequentemente afetados e facilmente vistos no *post-mortem* são os plexos braquial e ciático, o plexo celíaco, o vago abdominal e os nervos intercostais. Na forma aguda, os sinais clínicos são letargia, perda de peso, palidez da crista e alta mortalidade. Ocorrem tumores múltiplos e difusos em fígado, gônadas, baço, rins, pulmões, proventrículos e coração. Pode ocorrer cegueira por lesões envolvendo a íris (FRANCO; ROEHE, 2007, OIE, 2013, SILVA, 2014?).

No Brasil, as aves criadas industrialmente recebem uma vacina contra a Doença de Marek com a cepa HVT no primeiro dia de vida. Para as reprodutoras o maior grau de proteção contra desafios de vírus patogênicos de campo tem sido oferecido pelas vacinas HVT + RISPENS. A vacinação reduz, mas não impede a infecção nem a excreção viral, o que favorece a disseminação do vírus a campo e a seleção de cepas cada vez mais virulentas e, conseqüentemente, dificulta o controle da enfermidade (FRANCO; ROEHE, 2007; SILVA, 2014?).

Os métodos diagnósticos incluem o uso de anticorpos apropriados para testes de imunofluorescência, imunohistoquímica, precipitação em ágar gel e ELISA, bem como a amplificação de sequências do MDV por PCR (ZHU *et al.*, 1992; FRANCO; ROEHE, 2007; NAIR *et al.*, 2013).

As galinhas são os hospedeiros naturais mais importantes para a Doença de Marek, embora codornas, perus e faisões sejam também susceptíveis à infecção e desenvolvimento de sinais clínicos (NAIR *et al.*, 2013). O MDV permanece um importante patógeno na produção avícola em função dos custos de vacinação, mortalidade, condenações de carcaças e diminuição na produção de ovos

(LANDMAN; VERSCHUREN, 2003).

3.3 Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio

A Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio é uma enfermidade causada por um Avibirnavírus, pertencente à família *Birnaviridae*. Os vírions apresentam formato esférico-icosaédrico, medindo cerca de 60 nm, sem envelope, compostos de um núcleo contendo uma estrutura de RNA de fita dupla, segmentos A e B, cada qual codificando uma poliproteína, que é posteriormente clivada em produtos funcionais (VOGEL; FLORES, 2007). A proteína viral VP2, sintetizada no segmento A e localizada no capsídeo externo do vírus, está relacionada à resposta imune capaz de induzir proteção, e os anticorpos originados por ela permitem efetuar a diferenciação dos sorotipos e subtipos virais (ITO *et al.*, 2001).

São reconhecidos dois sorotipos do vírus. O sorotipo 1 é o mais virulento, sendo classificado em atenuado, variante antigênica e virulento clássico, o qual está associado à alta mortalidade em frangos jovens e tem causado grandes perdas econômicas na indústria avícola em muitos países (VAN DEN BERG *et al.*, 2004).

O vírus é transmitido pela via fecal-oral, com a ingestão de materiais orgânicos contaminados, e verticalmente via ovo (VOGEL; FLORES, 2007). O agente se multiplica nos tecidos linfóides, com predileção pela Bolsa de Fabricio na idade em que ocorre maior desenvolvimento do órgão, causando imunossupressão e aumentando a susceptibilidade das aves a outras doenças infecciosas (TANIMURA; SHARMA, 1997, ETERRADOSSI; SAIF, 2013).

Os sinais clínicos associados à doença aguda são anorexia, depressão, penas arrepiadas, diarreia, prostração e morte (SHARMA *et al.*, 2000). A infecção com cepas virulentas pode determinar taxas de mortalidade elevadas (TANIMURA; SHARMA, 1997, ETERRADOSSI; SAIF, 2013). Estão descritas lesões como atrofia e hemorragia da Bolsa de Fabricio, escurecimento e hemorragias na musculatura peitoral, pois o IBDV parece interferir nos mecanismos normais de coagulação (SHARMA *et al.*, 2000; ETERRADOSSI; SAIF, 2013).

O agente é bastante resistente às condições ambientais e variações extremas de pH, o que contribui para o surgimento de potenciais surtos da doença e representa um entrave para o combate à infecção (VOGEL; FLORES, 2007). Em função disso, a

vacinação contra IBDV durante as primeiras semanas após o nascimento, mesmo associada à imunossupressão, é inevitável para a proteção do frango em condições de alta pressão de infecção (MÜLLER *et al.*, 2003). Os principais objetivos da vacinação contra IBD são a redução dos sinais clínicos, lesões e consequências econômicas associadas à infecção (GAO *et al.*, 2011).

O ELISA é o teste sorológico rotineiramente utilizado para detectar anticorpos contra o IBDV, por permitir o processamento de grande número de amostras simultaneamente (ASHRAF *et al.*, 2006).

Com base em evidências sorológicas da infecção pelo IBDV do sorotipo 1 em aves selvagens, foi sugerido que elas podem desempenhar um papel na epidemiologia do IBDV, servindo como reservatório para o vírus (WILCOX *et al.*, 1983; OGAWA *et al.* 1998).

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Investigação de vírus de impacto na sanidade avícola em aves silvestres próximas a uma criação de frangos coloniais em Pelotas, RS

Autores: Alice T. Meirelles Leite, Geferson Fischer, Silvia O. Hübner, Marcelo de Lima, Gilberto D. Vargas

Publicado na revista Science and Animal Health, v.8, n.1, p.73-87, jan./abr.

Investigação de vírus de impacto na sanidade avícola em aves silvestres próximas a uma criação de aves coloniais em Pelotas, RS

Alice T. Meirelles Leite, Geferson Fischer, Silvia O. Hübner, Marcelo de Lima, Gilberto D. Vargas

Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango, com 13,245 milhões de toneladas, e o maior exportador, com 4,214 milhões de toneladas destinadas à exportação, no ano de 2019. Aves silvestres de vida livre, devido as suas características biológicas, são capazes de carrear microrganismos patogênicos de forma biológica ou mecânica, podendo atuar como disseminadores de diferentes enfermidades na produção industrial, comercial ou doméstica de aves. O objetivo deste estudo foi investigar a exposição aos vírus da doença de Newcastle (NDV), da doença de Marek (MDV) e da doença de Gumboro (IBDV) em aves silvestres residentes próximo a uma criação de aves coloniais na região de Pelotas – RS. A metodologia empregada foi a detecção de material genético viral por RT-PCR e PCR em suabes de orofaringe e cloaca, e pesquisa de anticorpos por ELISA em amostras de soro e sangue total colhido em papel filtro. Foram capturadas aves da ordem Passeriformes (n=20) e ordem Columbiformes (n=13). Não foi detectada a presença de NDV e MDV por métodos moleculares nas aves silvestres pesquisadas (n=24), nem anticorpos contra NDV e IBDV nos ensaios imunoenzimáticos (n=30). Os resultados obtidos reforçam a importância da vigilância contínua dos vírus potencialmente patogênicos aos plantéis avícolas através do monitoramento de aves migratórias, dada a importante posição do Brasil no mercado produtor e exportador de frangos de corte.

Palavras-chave: NDV. Doença de Marek. IBDV. PCR. ELISA.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango, com 13,245 milhões de toneladas, e o maior exportador, com 4,214 milhões de toneladas destinadas à exportação, gerando uma receita cambial de US\$ 6,994 milhões, valores referentes ao ano de 2019 (ABPA, 2020). Devido ao rigoroso padrão de qualidade imposto pelas barreiras sanitárias, o emprego de métodos de controle de qualidade já é rotina para as empresas avícolas brasileiras, sendo a interação entre os plantéis e as aves silvestres um dos meios mais comuns de disseminação de doenças (SALLE; MORAES, 2009; SCAGION, 2015). As aves são indicadores de biodiversidade e já foram usadas de maneira eficaz na avaliação da conservação de áreas, assim

como na identificação de grandes centros de endemismo terrestre (WEGE; GOERCKE, 2006). Aves selvagens de vida livre são potenciais portadores e carreadores de diversos agentes patogênicos. Mesmo espécies residentes podem se deslocar de 50 a 100 km, e espécies migratórias podem transportar patógenos viáveis a locais distantes durante movimentos erráticos (HUBÁLEK, 2004).

As doenças de origem viral provocam grandes prejuízos para avicultura, uma vez que normalmente induzem redução do desenvolvimento e mortalidade nas aves, principalmente por causarem deficiências imunológicas, o que predispõe a infecções secundárias (HIRSCHMANN et al., 2019). Entre essas doenças estão: a doença de Newcastle, a doença de Marek e a doença de Gumboro. A doença de Newcastle (ND) é uma enfermidade viral aguda, causada pelo Paramyxovírus tipo I, gênero Avulavirus da família Paramyxoviridae, altamente contagiosa, que acomete aves silvestres e comerciais, apresentando distribuição mundial (MAPA, 2013). A infecção pode apresentar-se de modo subclínico ou com alterações respiratórias moderadas e queda na produção de ovos. Dependendo da virulência da amostra viral, elevada mortalidade com alterações respiratórias graves e sinais neurológicos podem ocorrer (ARNS et al., 2007). Por sua importância sanitária estratégica, a ocorrência de um surto da ND pode resultar na interrupção da exportação regional ou nacional da carne de frango e subprodutos avícolas, acarretando enormes prejuízos econômicos aos países com notificação da enfermidade (ARNS et al., 2007; MAPA, 2013).

A doença de Marek é uma doença linfoproliferativa altamente infecciosa, causada por um Herpesvírus, gênero Mardivirus da família Herpesviridae, que afeta galinhas (MDV-1 e MDV-2) e perus (HVT) (CANAL; BARBOSA, 2009). A infecção ocorre por inalação da poeira dos criatórios contendo o agente eliminado pelos folículos das penas, secreção nasal, saliva, urina e fezes (KALETA; DOCHERTY, 2007). O agente pode persistir por longos períodos no meio ambiente e é tão ubíquo que provavelmente todas as aves domésticas do mundo, em algum momento da vida, estarão expostas a ele. O vírus da doença de Marek é um importante patógeno na produção avícola e tem sido intensivamente estudado por pesquisadores no mundo, porém, pouco no Brasil (FRANCO; ROEHE, 2007).

A doença de Gumboro ou doença infecciosa da Bursa (IBD) é uma enfermidade altamente imunossupressora, que aumenta a susceptibilidade das aves jovens a outras doenças infecciosas. Seu agente etiológico é um Birnavírus pertence ao gênero Avibirnavirus da família Birnaviridae, e se multiplica nos tecidos linfóides, com predileção pela bursa de Fabricius (ETERRADOSSI; SAIF, 2013). Diferentes cepas do sorotipo 1 são reconhecidas de acordo

com a virulência, e cepas hipervirulentas têm sido isoladas em aves industriais no Brasil, estando entre os vírus que causam as maiores perdas econômicas para a indústria avícola (DI FABIO et al., 1999). Com base em evidências sorológicas da infecção pelo vírus da doença de Gumboro do sorotipo 1 em aves selvagens, foi sugerido que essas podem desempenhar um papel na epidemiologia da doença, servindo como reservatório para o vírus (OGAWA et al., 1998; WILCOX et al., 1983).

Tendo em vista que o contato entre aves de vida livre e de produção é um fator determinante para a disseminação de patógenos de interesse para a avicultura comercial, este estudo teve como objetivo investigar a exposição aos vírus da doença de Newcastle, da doença de Marek e da doença de Gumboro em aves silvestres próximas a uma criação de aves coloniais na região de Pelotas – RS.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia e Imunologia (LABVIR) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, conforme Certificado de Aprovação CEEA número 3519 e autorização do ICMBio/CEMAVE número 45466-1.

O local escolhido foi uma propriedade com terminação de aves coloniais em um sistema semi-intensivo, na qual as aves silvestres tinham acesso aos galpões e aos piquetes, e na qual os dois grupos eram observados forrageando juntos. A população de aves silvestres residentes da região (n=33) utilizada no estudo foi capturada na área dos piquetes, em redes de neblina com malha de 30 mm nas primeiras horas da manhã, nos meses de maio e junho. Como controle, foram incluídas no estudo amostras de pintos coloniais das linhagens carijó (n=8), gris cendré (n=8), gigante negro (n=8) e vermelho (n=8), com aproximadamente 30 dias, vacinados contra o vírus da doença de Marek e IBDV no incubatório de origem no primeiro dia de vida (Tabela 1).

Para investigação dos vírus circulantes, amostras foram coletadas de suabes de orofaringe (n=32) e cloaca (n=32) das aves coloniais, e suabes de orofaringe (n=24) e cloaca (n=24) das aves silvestres, armazenados em tubos tipo Eppendorf e mantidos em caixas isotérmicas com gelo até o processamento. Amostras de sangue foram obtidas dos pintos (n=8) por punção da veia braquial, e das aves silvestres (n=30) pelo corte da unha, impregnadas em 3 cm² de papel-filtro, seco e armazenado à temperatura ambiente até a eluição. Devido ao pequeno tamanho das aves silvestres, em alguns exemplares não foi possível coletar os suabes, ou a amostra de sangue não foi suficiente para análise. As aves silvestres foram identificadas quanto ao gênero e espécie, de acordo com a Lista das Aves do Brasil, do Comitê Brasileiro de Registros

Ornitológicos (CBRO, 2011), marcadas com anilhas plásticas coloridas para evitar a recaptura e soltas imediatamente após a manipulação.

Tabela 1- População de aves silvestres e de pintos coloniais utilizada no estudo.

Espécie	Nome popular	Nº de animais
<i>Columbina picui</i>	Rolinha-picui	13
<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	6
<i>Passer domesticus</i>	Pardal	5
<i>Sicalis luteola</i>	Tipio	3
<i>Molothrus badius</i>	Asa-de-telha	2
<i>Furnarius rufus</i>	João-de-barro	1
<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	1
<i>Paroaria coronata</i>	Cardeal	1
<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra	1
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Frango colonial carijó	8
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Frango colonial gris cendré	8
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Frango colonial gigante negro	8
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Frango colonial vermelho	8
<i>Total</i>		65

A etapa de extração de RNA e DNA foi executada com o kit Invisorb® Spin Universal (STRATEC Molecular GmbH, Germany), e, a seguir, o RNA foi transcrito em cDNA com o kit M-MLV Reverse Transcriptase Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, USA), de acordo com as normas dos fabricantes. Os produtos foram armazenados a -80 °C até a amplificação do material genético por RT-PCR e PCR, utilizando-se os primers descritos da Tabela 2.

A RT-PCR para detecção do NDV foi realizada em um volume de 13 µL, contendo 6 µL de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega Corporation, USA), 0,5 µL do primer NDVF (0,025 µmol), 0,5 µL do primer NDVR (0,025 µmol) e 3 µL de cDNA, completando-se o volume com água ultrapura. A amplificação foi obtida com um ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 45 °C e 1 minuto a 72 °C, seguido por um ciclo de 5 minutos a 72 °C (adaptado de HAQUE et al., 2010).

A PCR para detecção do MDV foi realizada num volume de 12 µL, contendo 6 µL de GoTaq®Colorless Master Mix (Promega Corporation, USA), 0,5 µL do primer HVT-gA-3 F (0,025 µmol), 0,5 µL do primer HVT-gA-3 R (0,025 µmol) e 1 µL de DNA, completando-se o volume com água ultrapura. A amplificação foi obtida com um ciclo inicial de 1 minuto a 94 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 30 segundos a 72 °C, seguido por um ciclo de 10 minutos a 72 °C (SADEGHI et al., 2006).

Como amostras de referência foram utilizadas vacinas com vírus vivos da doença de Newcastle

(New-Vacin® HB1 – cepa HB1, Biovet, Brasil) e da doença de Marek (Bio-Mark-Vet C® – cepa HVT – FC-126, Biovet, Brasil).

Os produtos de PCR foram separados em um gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE (Tris Base, ácido bórico e EDTA) corado com brometo de etídio, comparados com um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®) e visualizados sob luz ultravioleta.

Para os ensaios imunoenzimáticos foi realizada a eluição dos anticorpos do soro a partir do papel-filtro, conforme metodologia descrita por Fonseca et al. (2007). Os níveis de anticorpos específicos contra NDV e IBDV foram avaliados pelo método ELISA utilizando kits comerciais (IDEXX NDV® e IDEXX IBD®, IDEXX Laboratories, USA, respectivamente), seguindo a recomendação do fabricante. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.), e os títulos foram calculados conforme descrito pelo fabricante.

Tabela 2 - Primers utilizados na reação de RT-PCR e PCR.

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto	Referências
NDVF	GCAGCTGCAGGGATTGTGGT	356 pb	Nanthakumar et al., 2000
NDVR	TCTTTGAGCAGGAGGATGTTG		
HVT-gA-3 F	CGCGTACTGCGCCTGACG	388 pb	Zhu et al., 1992
HVT-gA-3 R	CAACTTCGCTCTTGACG		

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência das espécies domésticas e silvestres amostradas e o material biológico obtido está relacionado na Tabela 3. Dentre as aves silvestres, os exemplares da Ordem Passeriformes (n=20) predominaram sobre os da Ordem Columbiformes (n=13). Ambas as ordens são comumente observadas na área de estudo, e a disponibilidade de grãos e árvores frutíferas nos piquetes dos frangos coloniais pode ter sido um fator determinante da sua abundância em relação ao esforço de coleta nos locais de captura.

Nesse estudo não foi detectada a presença de NDV ou de MDV por RT-PCR e PCR nas aves pesquisadas, embora os pintos coloniais tivessem histórico de vacinação contra o vírus da doença de Marek no incubatório de origem, no primeiro dia de vida. Em galináceos, os suabes orofaríngeos são considerados as melhores amostras para a detecção de NDV (SPACKMAN et al., 2013), porém Das et al. (2006) demonstraram que amostras cloacais e de tecidos dos pulmões, baço e intestino de aves selvagens são de difícil extração de RNA, devido a seu elevado conteúdo de inibidores de RT-PCR, razão pela qual a amostra escolhida para análise

foi a que resultaria em menor prejuízo aos animais.

Embora o vírus de Newcastle exista no Brasil desde a década de 50, a sua incidência é baixa em aves silvestres, conforme aponta o trabalho de Thomazelli et al. (2012). Um estudo sorológico para a doença de Newcastle encontrou uma baixa prevalência (1,43%) deste vírus em aves silvestres de zoológicos do estado do Rio de Janeiro (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2003).

Para reforçar a importância de aves silvestres na epidemiologia da doença de Newcastle, Silva et al. (2006) analisaram o soro sanguíneo de 103 pardais (*Passer domesticus*) capturados em granjas de corte e postura localizadas no estado de Pernambuco, através do teste de Inibição da Hemaglutinação, e detectaram títulos de anticorpos que variaram entre 2 e 64 em 10,68% das aves, com sorologia positiva e isolamento viral obtidos de pardais provenientes de granjas de postura. Esses títulos são consequência do consumo de vacinas adicionadas à água de bebida de aves de produção, indicando a estreita proximidade e a potencial troca de patógenos entre essas aves silvestres e os plantéis avícolas.

Tabela 3 - Frequência das espécies amostradas e amostras biológicas analisadas

Espécie	Nome popular	Ordem	Nº de animais	Amostras		
				sangue	suabe orofaríngea	suabe cloaca
<i>Columbina picui</i>	Rolinha-picui	Columbiformes	13	13	11	11
<i>Turdus rufiventris</i>	Sabiá-laranjeira	Passeriformes	6	6	6	6
<i>Passer domesticus</i>	Pardal	Passeriformes	5	5	3	3
<i>Sicalis luteola</i>	Tipio	Passeriformes	3	3	1	1
<i>Molothrus badius</i>	Asa-de-telha	Passeriformes	2	2	0	0
<i>Furnarius rufus</i>	João-de-barro	Passeriformes	1	0	1	1
<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	Passeriformes	1	0	1	1
<i>Paroaria coronata</i>	Cardeal	Passeriformes	1	1	0	0
<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra	Passeriformes	1	0	1	1
Total silvestres			33	30	24	24
<i>G. gallus domesticus</i>	Frango colonial carijó	-	8	8	8	8
<i>G. gallus domesticus</i>	Frango colonial gris cendré	-	8	8	8	8
<i>G. gallus domesticus</i>	Frango colonial gigante negro	-	8	8	8	8
<i>G. gallus domesticus</i>	Frango colonial vermelho	-	8	8	8	8
Total domésticos			32	32	32	32
Total geral			65	62	56	56

Em relação à doença de Marek, sabe-se que a vacinação reduz, mas não impede a infecção nem a excreção viral, o que favorece a disseminação do vírus a campo e a seleção de cepas cada vez mais virulentas, o que dificulta o controle da enfermidade (FRANCO; ROEHE, 2007; SILVA, 2014). Murata et al. (2012) investigaram a presença de MDV-1 em aves selvagens em uma região do Japão e constataram alta prevalência do vírus em aves aquáticas migratórias e sedentárias. Segundo Boodhoo et al. (2016), a presença de MDV em aves selvagens e

migratórias tem sido bem documentada desde o início de 1980. Portanto, não é surpresa que surjam novos relatos à medida que esses vírus são identificados em novos hospedeiros.

Para controlar os surtos de campo do MDV no futuro, é aconselhável monitorar periodicamente o agente em aves aquáticas selvagens (MURATA et al., 2012), bem como entender a importância das aves selvagens como reservatórios ao longo de rotas migratórias para sorotipos patogênicos (BOODHOO et al., 2016).

Os ensaios imunoenzimáticos mostraram resultados negativos para anticorpos contra NDV em todos os animais testados, e contra IBDV nas aves silvestres. No entanto, 100% (8/8) dos frangos coloniais testados apresentaram positividade para anticorpos contra IBDV, com títulos variando entre 416 e 4.250, provavelmente como resultado da vacinação. A detecção de IBVD nas aves silvestres foi realizada apenas por método indireto (níveis de anticorpos específicos) por se tratar de animais adultos, nos quais a bolsa de Fabricius já regrediu (ETERRADOSSI; SAIF, 2013). Segundo Bolis et al. (2003), títulos superiores a 8.000 indicam exposição ao vírus no campo. O ELISA é o teste sorológico rotineiramente utilizado para detectar anticorpos contra o IBDV, por permitir o processamento de grande número de amostras simultaneamente (ASHRAF et al., 2006). A presença de cepas muito virulentas de IBDV tem sido reportada em países como Bolívia, Brasil, Colômbia, Uruguai, Venezuela e República Dominicana (BANDA; VILLEGAS, 2004). Segundo Moraes (2004), em dados do Centro de Diagnóstico em Patologia Aviária (CDPA), no período de 1999-2004, a doença infecciosa da bolsa de Fabricius correspondia a cerca de 30% do total de diagnósticos efetuados naquele laboratório. Vargas et al. (2007) relataram, também, ocorrência da enfermidade em um lote de frangos de corte no Rio Grande do Sul com cerca de 12,5% de mortalidade.

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 1994) prevê atividades de vigilância ativa (captura e colheita de amostras) para o monitoramento da Doença de Newcastle em aves migratórias na Estação Ecológica do Taim e seu entorno. O local é considerado um sítio de invernada de grande importância para aves migratórias, devido aos milhares de indivíduos que chegam e permanecem na região no período de junho a agosto. Entretanto, poucos dados são publicados sobre este monitoramento. Um estudo realizado no inverno de 2011 na Estação Ecológica do Taim concluiu que o estado do Rio Grande do Sul permanecia, até aquele momento, sem registro da visita de aves infectadas por Doença de Newcastle (DOMINGUES et al., 2012). Já um estudo mais recente realizou um inquérito epidemiológico de doenças virais em aves domésticas no período de 2000 a 2016 no sul do Rio Grande do Sul, e encontrou cerca de 16% das aves avaliadas positivas para doenças virais. Das aves infectadas, 42%

apresentaram a doença de Marek e 31,8% foram positivas para a doença infecciosa da bolsa de Fabricius (HIRSCHMANN et al., 2019). Um outro estudo, avaliou a causa da morte de aves silvestres no sul do Rio Grande do Sul, e as doenças virais nessas aves foram responsáveis por 0,97% dos óbitos (ECHENIQUE et al., 2020).

Atualmente, no sul do Rio Grande do Sul, pesquisas e ações de desenvolvimento para a avicultura colonial têm sido realizadas com o objetivo de promover evolução tecnológica para o setor, estimulada pelo crescente interesse do consumidor por alimentos de origem animal produzidos dessa forma. Entretanto, o regime semiconfinado, no qual os animais têm acesso às pastagens após 28 dia de idade, expõe os indivíduos ao contato com aves silvestres residentes e migratórias (REICHERT et al., 2011; ZABALETA; GONÇALVES, 2009). Desta forma é de fundamental importância que haja um controle rígido de agentes patógenos que possam ser transmitidos pelas aves de vida livre aos animais coloniais, para evitar prejuízos a avicultura colonial.

CONCLUSÃO

No presente estudo não foi detectada a excreção ou o contato prévio das aves pesquisadas com NDV, MDV ou IBDV pelas técnicas diagnósticas empregadas, seja pela ausência de exposição ao vírus ou pela excreção intermitente do agente. No entanto, dada a facilidade de disseminação dos agentes a campo e a dificuldade de controle dessas enfermidades, sugere-se contínua vigilância dos vírus potencialmente patogênicos pelo monitoramento de aves vida livre, considerando que o contato intra e interespécies pode desempenhar um papel relevante na transmissão de doenças.

INVESTIGATION OF IMPACT VIRUSES IN POULTRY HEALTH OF WILD BIRDS NEAR A FREE RANGE POULTRY FARM IN PELOTAS, RS

ABSTRACT

Brazil is the second largest producer of chicken meat, with a production of 13.245 millions of tons in 2019 and, about 4.214 millions of tons were intended for export. Wild birds, of free life, due to their biological characteristics are capable of carrying pathogenic microorganisms both biologically or mechanically, acting as disseminators of several different diseases in industrial, commercial and even domestic poultry production. This study aims to investigate the exposure

of wild birds living near a free range poultry farm in the region of Pelotas – RS to Newcastle Disease Virus (NDV), Marek's Disease Virus (MDV) and Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). The methodology used was the viral genetic material detection using RT-PCR and PCR in cloacal and oropharynx swabs and, antibody detection by ELISA serology in total blood samples collected in filter paper. Birds from the order Passeriformes (n=20) and Columbiformes (n=13) were captured. It was not detected the presence of NDV or MDV through molecular methods in the considered wild birds (n=24), antibodies for NDV and IBDV were also negative in the immunoenzymatic assays (n=30) performed. The findings, therefore, reinforce the importance of continuous surveillance of viruses potentially pathogenic for poultry breeding through monitoring migratory birds, especially considering the important position Brazil has in chicken meat production and exportation.

Keywords: NDV. Marek's disease. IBDV. PCR. ELISA.

INVESTIGACIÓN DE VIRUS DE IMPACTO EN LA SANIDAD AVÍCOLA EN AVES SILVESTRES CERCA A UNA CRÍA DE AVES DE CORRAL EN PELOTAS, RS

RESUMEN

Brasil es el segundo productor mundial de carne de pollo, con una producción de 13,245 millones de toneladas en 2019, con alrededor de 4,214 millones de toneladas destinadas a la exportación. Las aves silvestres libres, debido a sus características biológicas, son capaces de transportar microorganismos patógenos sobre una base biológica o mecánica, y pueden actuar como diseminadores de diferentes enfermedades en la producción avícola industrial, comercial o doméstica. El objetivo de este estudio es investigar la exposición a los virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), de la enfermedad de Marek (MDV) y de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio (IBDV) en aves silvestres que residen cerca de una granja de aves de corral en la región de Pelotas – RS. La metodología empleada fue la detección de material genético viral por RT-PCR y PCR en hisopos de orofaringe y cloaca, y la detección de anticuerpos ELISA en muestras de suero y sangre completa recolectadas en papel de filtro. Las aves Paseriformes capturadas (n=20) predominaron sobre las Columbiformes (n=13). No se detectó presencia de NDV y MDV por métodos moleculares en las aves silvestres estudiadas (n=24), ni anticuerpos contra NDV e IBDV en ensayos inmunoenzimáticos (n=30). Los resultados

refuerzan la importancia de la vigilancia continua de los virus potencialmente patógenos para a avicultura a través del monitoreo de las aves migratorias, dada la importante posición de Brasil en el mercado de productores y exportadores de pollos de corte.

Palabras clave: NDV. Enfermedad de Marek. IBDV. PCR. ELISA.

REFERÊNCIAS

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório Anual 2020. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf> .

ARNS, C. W.; SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S. Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. P. 657-688.

ASHRAF, S.; ABDEL-ALIM, G.; SAIF, Y. M. Detection of antibodies against serotypes 1 and 2 infectious bursal disease virus commercial ELISA kits. Avian Diseases, v. 50, n. 1, p. 104-109, 2006.

BANDA, A; VILLEGAS, P. Genetic Characterization of Very Virulent Infectious Bursal Disease Viruses from Latin America. Avian Diseases, v. 48, n. 3, p. 540-549, 2004.

BOLIS, D. A.; PAGANINI, F. J.; SIMON, V. A.; et al. Gumboro disease: evaluation of serological and anatomopathological responses in vaccinated broiler chickens challenged with very virulent virus strain. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v. 5, n. 2, p. 137-146, 2003.

BOODHOO, N.; GURUNG, A.; SHARIF, S.; et al. Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. Veterinary research, v. 47, n. 119, p. 1-19, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria N° 193, de 19 de setembro de 1994, institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Diário Oficial da União, publicado em 19/09/1994, seção 1, p. 13, 1994.

CANAL, C. W.; BARBOSA, T. M. C. Enfermidade de Marek, Complexo Leucótico Aviário e Reticuloendoteliase. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doenças das Aves. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. P. 569-586.

CBRO - COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. Lista das aves do Brasil. 10. ed. 2011.

DAS, A.; SPACKMAN, E.; SENNE, D.; et al. Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. Journal of Clinical Microbiology, v. 44, n. 9, p. 3065-3073, 2006.

DI FABIO, J.; DE CASTRO, A. G.; GARDIN, Y.; et al. La enfermedad de la bolsa de Fabricio (EIBF) por cepas de alta virulencia se propagan a Latinoamérica. *Avicultura Profesional (EUA)*, v. 17, n. 9, p. 15-18, 1999.

DOMINGUES, R. D.; LOUREIRO, F. C.; FORTES, F. B. B.; et al. Vigilância Ativa para Influenza Aviária e Doença de Newcastle em Aves Migratórias na Estação Ecológica do Taim em 2011. *Informativo Técnico DPA*, v. 3, n. 4, p. 1-4, 2012. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/02101249-inftec-27-vigilancia-para-influenza-aviaria-e-causa-de-mortalidades-aviarias.pdf>>.

ECHENIQUE, J. V. Z.; SOARES, M. P.; ALBANO, A. P. N.; et al. Diseases of wild birds in southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 40, n. 2, p. 121-128, 2020.

ETERRADOSSI, N.; SAIF, Y. M. Infectious bursal disease. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. L.; NAIR, V. *Diseases of Poultry*. Iowa: Wiley-Blackwell, 2013. P. 219-246.

FONSECA, F.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; et al. Avaliação do uso de sangue em papel-filtro para detecção e quantificação de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, n. 2, p. 319-324, 2007.

FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. P. 433-488.

HAQUE, M. H.; HOSSAIN, M. T.; ISLAM, M. T.; et al. Isolation and detection of newcastle disease virus from field outbreaks in broiler and layer chickens by reverse transcription–polymerase chain reaction. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, v. 8, n. 2, p. 87–92, 2010.

HIRSCHMANN, L. C.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; et al. Fatores de risco associados com a presença de infecções virais em aves domésticas na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 47, n. 1642, p. 1-9, 2019.

HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 40, n. 4, p. 639-659, 2004.

KALETA, E. F.; DOCHERTY, D. E. Avian herpesvirus. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. *Infectious Diseases of Wild Birds*. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. P. 63- 86.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle. Brasília: Coordenação de Sanidade Avícola, 2013. 59p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/plano-de-contingencia-versao-1_4.pdf/view> .

MORAES, H. L. S. Doença Infecciosa Bursal: Estudo sobre amostras vacinais e de campo, imunidade maternal e desafio com amostra muito virulenta do vírus. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 95p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-Graduação em

Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

MURATA, S.; HAYASHI, Y.; KATO, A.; et al. Surveillance of Marek's disease virus in migratory and sedentary birds in Hokkaido, Japan. *The Veterinary Journal*, v. 192, n. 3, p. 538-540, 2012.

NANTHAKUMAR, T.; KATARIA, R. S; TIWARI, A. K.; et al. Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Veterinary Research Communications*, v. 24, n. 4 p. 275-286, 2000.

OGAWA, M.; WAKUDA, T.; YAMAGUCHI, T.; et al. Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free living wild birds in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 60, n. 11, p. 1277-1279, 1998.

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

REICHERT, L. J.; GOMES, M. C.; SCHWENGBER, J. E. Avaliação Técnica e Econômica de um Agroecossistema Familiar de Base Ecológica na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Current Agricultural Science and Technology*, v. 17, n. 1-4, p. 123-132, 2011.

SADEGHI, M. R.; GHORASHI, S. A.; KARGAR MOAKHAR, R.; et al. Polymerase chain reaction for the detection and differentiation of Marek's disease virus strains MDV-1 and HVT. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 7, n. 1, p. 17-21, 2006.

SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S. Prevenção de doenças, manejo profilático, monitoria. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. *Doenças das Aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. P. 255-266.

SCAGION, G. P. Detecção sorológica, molecular e caracterização dos Paramixovírus aviários do tipo 1 (classe I e classe II) em aves silvestres e sinantrópicas. Campinas: UNICAMP, 2015. 109p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2015.

SILVA, J. S. A.; MOT, R. A.; VILELA, S. M. O.; et al. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of the agreste region of the state of Pernambuco. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 8, n. 2, p. 125- 129, 2006.

SILVA, P. L. Doença de Marek: neoplasia e imunossupressão. *Ceva World*, edição especial, p. 1-15, 2014. Disponível em: <https://www.avisite.com.br/clipping/CevaWorld_02_Marek.pdf>.

SPACKMAN, E.; PEDERSEN, J. C.; MCKINLEY, E. T.; et al. Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. *BMC Veterinary Research*, v. 9, n. 35, p. 1-12, 2013.

THOMAZELLI, L. M.; ARAÚJO, J.; FERREIRA, C. S.; et al. Molecular Surveillance of the Newcastle Disease Virus in Domestic and Wild Birds on the Northeastern Coast and Amazon Biome of Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 14, n. 1, p. 01-07, 2012.

VARGAS, G. D.; FISHER, G.; HÜBNER, S.; et al. Ocorrência da Doença de Gumboro em Frangos de Corte no Sul do Brasil. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 20, 2007, Porto Alegre. RESUMOS. Porto Alegre: CLA, 2007. P. 191-193.

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

WILCOX, G. E.; FLOWER, R. L. P.; BAXENDALE, W.; et al. Serological survey of wild birds in Australia for the prevalence of antibodies to egg drop syndrome 1976 (EDS - 76) and infectious bursal disease viruses. *Avian Pathology*, v. 12, n. 1, p. 135-139, 1983.

ZABALETA, J. P. L.; GONÇALVES, M. C. Programa de avicultura colonial, *Avicultura Colonial - Embrapa Clima Temperado*, p. 1-2, 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32588/1/Programa.avicultura.colonial.pdf>>.

ZHU, G. S.; OJIMA, T.; HIRONAKA, T.; et al. Differentiation of oncogenic and non-oncogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. *Avian Diseases*, v. 36, n. 3, p. 637-645, 1992.

4.2 Artigo 2

Anticorpos contra vírus aviários em aves migratórias no Rio Grande do Sul

Alice T. Meirelles Leite, Geferson Fischer, Gertrud Müller, Sâmara N. Gomes, Rodolfo P. da Silva Filho, Sílvia O. Hübner, Marcelo de Lima, Gilberto D. Vargas

A ser submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Anticorpos contra vírus aviários em aves migratórias no Rio Grande do Sul¹

Alice T. Meirelles Leite², Geferson Fischer³, Gertrud Müller⁴, Sâmara N. Gomes⁴, Rodolfo P. da Silva Filho⁵,
Silvia O. Hübner³, Marcelo de Lima³, Gilberto D. Vargas³

ABSTRACT.- Meirelles Leite, A.T., Fischer, G., Müller, G., Gomes, S.N., Silva Filho, R.P., Hübner, S.O., Lima, M., Vargas, G.D. [**Antibodies against avian viruses of migratory birds in Rio Grande do Sul.**] Anticorpos contra vírus aviários em aves migratórias no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, CEP 96900-010, Avenida Eliseu Maciel, S/N, Jardim América, Capão do Leão, RS, Brazil. E-mail: al_meirelles@hotmail.com

Wild birds, of free life, are potential carriers of several pathogenic agents that may be disseminated biologically or mechanically by their excrements and secretions. The interaction between wild and domestic birds is considered an important factor to the occurrence of diseases that affect industrial, commercial and even domestic poultry production. This study aims at investigating the presence of antibodies to Newcastle Disease, Marek's Disease and Infectious Bursal Disease using commercial ELISA kits in two migratory species that are present on the coast of Rio Grande do Sul, White-rumped Sandpiper (*Calidris fuscicollis*) and Black-browed Albatross (*Thalassarche melanophris*). All serum samples of White-rumped Sandpiper tested (n=58) showed negative results to NDV and IBVD antibodies. However, 50% of them (4/8) resulted positive for Marek's Disease virus antibodies, with concentrations higher to 200 U of IgG/mL serum. For the Black-browed Albatross, 100% of the samples were negative for IBVD and positive for Marek's Disease Virus. Considering the important position Brazil has worldwide both as producer and exporter chicken meat, the need of continuous surveillance of potentially pathogenic viruses by monitoring migratory bird is fully justified.

INDEX TERMS: avian viruses, *Calidris fuscicollis*, *Thalassarche melanophris*, IBVD, Marek's Disease

RESUMO.- Aves selvagens de vida livre são potenciais portadores e carreadores de diversos agentes patogênicos, disseminados de forma biológica ou mecânica, através de seus excrementos e secreções. A interação entre aves silvestres e domésticas é considerada um fator para a ocorrência de diferentes enfermidades na produção industrial, comercial ou doméstica de aves. Este estudo objetivou investigar a presença de anticorpos contra os vírus da Doença de Newcastle, Doença de Marek e Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio por kits comerciais de ELISA em duas espécies migratórias que ocorrem no litoral do Rio Grande do Sul, Maçarico-de-sobre-branco (*Calidris fuscicollis*) e Albatroz-de-sobrancelha-negra (*Thalassarche melanophris*). Todas as amostras de soro de Maçarico-de-sobre-branco testadas (n=58) mostraram resultados negativos para anticorpos contra NDV e IBVD. No entanto, 50% (4/8) apresentaram positividade para anticorpos contra o vírus da Doença de Marek, com concentrações

¹ Recebido em _____

Aceito para publicação em _____

² Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, CEP 96900-010, Avenida Eliseu Maciel, S/N, Capão do Leão, RS, Brasil. *Autor para correspondência: al_meirelles@hotmail.com

³ Professor Doutor do Departamento de Veterinária Preventiva UFPel, Campus Capão do Leão, CEP 96900-010, Avenida Eliseu Maciel, S/N, Capão do Leão, RS, Brasil

⁴ Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Brazil

⁵ Centro de Recuperação de Animais Marinhos - Museu Oceanográfico "Prof. Eliézer de C. Rios", Fundação Universidade Federal do Rio Grande (CRAM - MO, FURG). Rua Cap. Heitor Perdigoão 10, CEP 96200-970, Rio Grande

superiores a 200 U de IgG/mL de soro. Em Albatroz-de-sobrancelha-negra, 100% das amostras foram negativas para IBVD e positivas para o vírus da Doença de Marek. Dada a importante posição do Brasil como produtor e exportador mundial de frangos de corte, justifica-se a necessidade de vigilância contínua dos vírus potencialmente patogênicos através do monitoramento de aves migratórias.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: vírus aviários, *Calidris fuscicollis*, *Thalassarche melanophris*, IBVD, Doença de Marek

INTRODUÇÃO

Aves selvagens de vida livre são potenciais portadores e carreadores de diversos agentes patogênicos, disseminados de forma biológica ou mecânica, através de seus excrementos e secreções, ou ainda transportados em seus ectoparasitas (Cooper 1990, Hubálek 1994, Wobeser 1997).

O tamanho considerável da população de aves selvagens, a ausência de fronteiras e a livre circulação de aves migratórias tornam essa população um vetor extremamente importante para a disseminação de vírus (Zanetti 2005). Além disso, aves de diferentes espécies frequentemente se reúnem em locais de descanso e alimentação, onde a transmissão horizontal dos agentes pode ocorrer em função dos frequentes contatos entre indivíduos e entre espécies (Hubálek 2004). A interação entre aves silvestres e domésticas é considerada um fator para a ocorrência de diferentes enfermidades na produção industrial, comercial ou doméstica de aves (Scherer et al. 2011).

A Doença de Newcastle, considerada uma das doenças mais devastadoras para o setor avícola em todo o mundo, é causada pelo Paramyxovírus aviário tipo I, pertencente ao gênero *Avulavirus* e à família *Paramyxoviridae* (Suarez 2013). Diferentes graus de severidade da doença podem ocorrer dependendo da virulência da cepa viral e da espécie hospedeira, variando desde uma infecção subclínica, com sinais imperceptíveis ou discretos, até uma doença fatal (Leighton & Heckert 2007).

A infecção pode ocorrer através da inalação ou ingestão de partículas virais presentes no ar, fezes, carcaça e fômites contaminados. Aves silvestres exóticas e nativas podem atuar como reservatórios do vírus, tornando comum o surgimento de variantes patogênicas e sua disseminação entre as aves domésticas e comerciais (Suarez et al. 2013), porém, no Brasil, poucos estudos foram desenvolvidos em aves silvestres (Oliveira-Junior et al. 2003, Silva et al. 2006).

A Doença de Marek é uma enfermidade linfoproliferativa das aves causada por um alphaherpesvírus, de distribuição cosmopolita, caracterizada pela infiltração de células em um ou mais nervos periféricos, gônadas, íris, vísceras, músculos e pele, que pode resultar em mortalidade entre 30% e 60% das aves nos lotes afetados, bem como em prejuízos no crescimento e na reprodução. Como qualquer Herpesvírus, o agente tende a causar infecções latentes com recorrência periódica da excreção viral, geralmente associada a estresse, com ou sem sinais clínicos detectáveis (Canal & Barbosa 2009, Nair et al. 2013).

As galinhas são os hospedeiros naturais mais importantes para a Doença de Marek, embora codornas, perus e faisões sejam também susceptíveis à infecção e desenvolvimento de sinais clínicos (Nair et al. 2013). Essa doença tem um grande impacto econômico na indústria avícola em função dos custos de vacinação, mortalidade, condenações de carcaças e diminuição na produção de ovos (Landman & Verschuren 2003).

A Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio é outra enfermidade de distribuição mundial que apresenta considerável importância econômica em galinhas, devido à alta incidência nos plantéis comerciais (Bernardino & Leffer 2009). Seu agente etiológico pertence à família *Birnaviridae*, e ataca o tecido linfóide, causando depleção de linfócitos. O sorotipo 1 é o mais patogênico, podendo provocar doença clínica e mortalidade durante a fase aguda da infecção, mas de maior importância econômica é a imunossupressão severa subsequente à infecção, permitindo o desenvolvimento de enfermidades secundárias. Acredita-se que o vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio cause doença apenas em galinhas (Bernardino & Leffer 2009, Eterradosi & Saif 2013) porém o agente tem sido detectado em várias espécies de aves silvestres (Smyth & McNulty 1994, Kasanga et al. 2008, Nunes et al. 2012, Marques et al. 2013).

O Hemisfério Sul recebe anualmente muitas espécies de aves migratórias do norte e do sul, principalmente entre os meses de setembro e maio, quando estas aves visitam o Brasil (Vooren & Brusque 1999). Em função da escassez dos levantamentos da prevalência de agentes virais de potencial impacto na sanidade avícola em aves silvestres, este estudo objetivou investigar a presença de anticorpos contra os vírus da Doença de Newcastle (NDV), Doença de Marek (MDV) e Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio (IBDV) em duas espécies migratórias que ocorrem no litoral do Rio Grande do Sul, considerando que essa avifauna pode atuar como portadora de agentes patogênicos para aves de produção e desempenhar um

papel relevante na transmissão de doenças.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: as amostras de soro de Maçarico-de-sobre-branco (*Calidris fuscicollis*) foram obtidas durante dois anos, nos meses de setembro/outubro de 2009 e março/abril de 2010, correspondendo ao período de chegada das aves no Rio Grande do Sul e seu retorno ao Hemisfério Norte, respectivamente. As aves (n=58) foram capturadas em redes de neblina de 12 metros de comprimento por 2,80 metros de altura, na Praia do Cassino, localizada no município do Rio Grande, (31° 47' 02" S e 52° 03' 10" W e 32° 39' 45" S e 52° 44' 10" W), conforme autorização do ICMBio/CEMAVE n. 23.234-1, de 28/01/2011, e Comitê de Ética da UFPel nº 2.13.00.013. O sangue foi colhido sob sedação com uma combinação de cetamina a 10% e xilazina a 2% por via intramuscular e o soro foi congelado a -20°C para posterior processamento. As amostras de soro de Albatroz-de-sobrancelha-negra (*Thalassarche melanophris*) foram obtidas de indivíduos vítimas de um encalhe em massa após uma forte tempestade em alto-mar, em maio de 2015, num trecho de praia entre os municípios de Mostardas e São José do Norte (31° 06' 25" S e 50° 55' 16" W a 32° 00' 53" S e 52° 02' 30" W). As aves (n=15) foram encaminhadas ao Centro de Recuperação de Animais Marinhos - Museu Oceanográfico "Prof. Eliézer de C. Rios", FURG, para serem submetidos a protocolo de reabilitação preconizado para esses casos, o qual inclui avaliação periódica de indicadores hematológicos e bioquímicos. O soro obtido dessas coletas foi congelado a -20°C para posterior processamento.

Ensaio Imunoenzimático: os níveis de anticorpos específicos contra o vírus de Newcastle e IBV foram avaliados pelo método ELISA utilizando kits comerciais (IDEXX NDV® e IDEXX IBV®, IDEXX Laboratories, respectivamente), seguindo a recomendação do fabricante. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.), e os títulos foram calculados conforme descrito pelo fabricante. Os níveis de anticorpos específicos contra o vírus de Marek foram avaliados pelo método ELISA utilizando o kit MyBioSource Chicken Marek's disease virus antibody - MDV IgG®, conforme recomendação do fabricante. Os resultados foram expressos em densidade óptica.

RESULTADOS

Neste estudo todas as amostras de soro de Maçarico-de-sobre-branco testadas para NDV e IBV (n=58) mostraram resultados negativos para anticorpos contra esses vírus. No entanto, 50% das amostras testadas para o vírus da Doença de Marek (4/8) apresentaram positividade para anticorpos contra o agente, com concentrações superiores a 200 U de IgG/mL de soro. Em Albatroz-de-sobrancelha-negra (n=15), 100% das amostras foram negativas para IBV e positivas para o vírus da Doença de Marek (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados dos ensaios imunoenzimáticos para NDV, Doença de Marek e IBV.

	Maçarico-de-sobre-branco		Albatroz-de-sobrancelha-negra	
NDV	testados n=58	positivos n=58	-	-
vírus da Doença de Marek	testados n=8	positivos n=4	testados n=15	positivos n=15
IBV	testados n=58	negativos n=58	testados n=15	negativos n=15

DISCUSSÃO

Os kits comerciais utilizados neste trabalho são padronizados para soro de galinha. No entanto, Cray & Villar (2008) demonstraram que anticorpos IgY de galinha comercialmente disponíveis apresentam boa reatividade cruzada com a maioria das espécies aviárias. Nunes et al. (2012) detectaram reatividade cruzada de anticorpos IgY de galinha com IgY de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) por ELISA, e confirmaram a reatividade das amostras testadas em kits comerciais para IBV pelo teste de imunodifusão em gel de ágar. Marques et al. (2013) utilizaram kits comerciais validado para aves domésticas na pesquisa de anticorpos contra IBV em cracídeos no Rio Grande do Sul. As imunoglobulinas em aves são codificadas por um número limitado de genes e as sequências são mais conservadas do que em outros organismos (Roitt et al. 1993). Desse modo, o uso de anticorpos desenvolvidos para outras espécies, como a galinha doméstica, na detecção de doenças em aves silvestres pode ser viável, desde que considerada a diluição do soro utilizada e a ligação do anticorpo à proteína certa (Martínez et al. 2003).

Segundo Alexander (1991), já foram estabelecidas infecções pelo Paramyxovírus tipo I em, pelo menos, 241 espécies de aves, representando 27 das 50 Ordens da Classe Aves, e provavelmente todas as espécies sejam susceptíveis à infecção. Alexander et al. (1989) isolaram o Paramyxovírus aviário tipo I lentogênico em pinguins antárticos. Thomazelli et al. (2012) demonstraram, através de ensaios sorológicos

e moleculares, a presença do vírus da Doença de Newcastle em exemplares do gênero *Calidris* sp. capturados na costa nordeste do Brasil.

Estudos anteriores (Orsi et al. 2010) revelaram soropositividade para o Paramyxovírus aviário tipo I de baixa patogenicidade em aves domésticas comerciais assintomáticas (28,8%), confirmando a manutenção do estado velogênico livre da Doença de Newcastle para o Brasil. No entanto, cepas virulentas podem emergir de vírus de baixa virulência por mutações no gene F, que codifica o local de clivagem F0 (Hanson 1976, Gould et al. 2001).

Em relação à IBDV, Ogawa et al. (1998) demonstraram evidências sorológicas de infecção em aves selvagens de vida livre, tanto residentes quanto migratórias. Estes resultados indicam que aves silvestres podem ter um papel importante na epidemiologia e história natural da enfermidade. Espécies residentes podem agir como reservatórios de IBDV, sendo também possível ocorrer infecção cruzada entre aves de produção e aves selvagens de vida livre (Ogawa et al. 1998, Kasanga et al. 2008).

No Brasil, os resultados do trabalho de Nunes et al. (2012) evidenciaram presença de anticorpos específicos contra IBDV em 56,1% da população de pinguins-de-Magalhães estudada. Marques et al. (2012) relataram títulos de anticorpos contra IBDV em 9,4% das amostras de soro de aves Tinamiformes mantidas em criatórios pesquisadas. Santos (2008) e Marques et al. (2013) detectaram títulos significativos de anticorpos contra IBDV por sorologia em cracídeos cativos no Rio Grande do Sul e Minas Gerais, respectivamente, indicando exposição prévia ao agente. Considerando que em ambos os locais as aves eram clinicamente normais, a estimulação imune pode ter sido causada pelo contato com aves de produção imunizadas com vacinas vivas, amplamente utilizadas nas criações comerciais brasileiras, com aves infectadas naturalmente, ou ainda com resíduos da indústria avícola (Marques et al. 2013).

Neste estudo foi encontrado um alto percentual de positividade para o vírus da Doença de Marek em Maçarico-de-sobre-branco e Albatroz-de-sobrancelha-negra. Os maçaricos estavam clinicamente saudáveis, enquanto os albatrozes, que permaneceram em reabilitação por um período médio de 22 dias, apresentavam desidratação e perda de peso, sinais clínicos compatíveis com aves marinhas recolhidas em encalhes de praia.

Animais não apresentam sinais clínicos durante a infecção latente por Herpesvírus, com exceção da presença de anticorpos produzidos em resposta à infecção aguda, identificada por testes sorológicos. Esses indivíduos são muito importantes do ponto de vista epidemiológico como fontes potenciais de infecção, pois atuam como disseminadores do vírus (Franco & Roehe 2007).

O vírus da Doença de Marek pode persistir por longos períodos no meio ambiente e é tão ubíquo que, virtualmente, todas as aves domésticas do mundo entram em contato com o agente em alguma fase de suas vidas (Franco & Roehe 2007). Nas aves migratórias, a distribuição geográfica dos Herpesvírus pode chegar a proporções enormes, que se estendem do norte do Alasca até a América do Sul, de regiões do norte da Europa e Ásia para a África ou partes do sul da Ásia, posto que segue os habitats naturais das espécies afetadas. Em geral, aves selvagens mantidas em cativeiro, incluindo centros de reabilitação ou de criação para liberação futura, são mais propensas a apresentar surtos do que as populações de vida livre (Kaleta & Docherty 2007). Devido à sua frequência e relevância, Kaleta & Docherty (2007) sugerem que as investigações de Herpesvírus devem ser incorporadas em programas de vigilância de doenças de aves selvagens.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados evidenciaram a presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Marek nas duas espécies de aves migratórias amostradas, Maçarico-de-sobre-branco e Albatroz-de-sobrancelha-negra. Contra os demais vírus pesquisados, Doença de Newcastle e IBDV, não foram detectados anticorpos pelo método de ELISA indireto. Dada a importante posição do Brasil como produtor e exportador mundial de frangos de corte, justifica-se a necessidade de vigilância contínua dos vírus potencialmente patogênicos através do monitoramento de aves migratórias.

REFERÊNCIAS

Alexander D. J., Manvell R. J., Collins M. S., Brockman S. J., Westbury H. A., Morgan I., & Austin F. J. 1989. Characterization of paramyxoviruses isolated from penguins in Antarctica and sub-Antarctica during 1976–1979. *Archives of virology*. 109(1):135-143.

Alexander D.J. 1991. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. p.496–519. In: Calnek B.W. et al. *Diseases of poultry*. 9 ed. Iowa: Ames.

- Bernardino A. & Leffer E. 2009. Doença infecciosa da bolsa de Fabricio. p. 651-676. In: Berchieri Júnior A.; Silva E. N., Di Fabio J., Sesti L. & Zuanaze M. A. F. Doenças das Aves. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas.
- Canal C. W., Barbosa T. M. C. Enfermidade de Marek, 2009. Complexo Leucótico Aviário e Reticuloendoteliose. p. 569-586. In: Berchieri Júnior A., Silva E. N., Di Fabio J., Sesti L. & Zuanaze M. A. F. Doenças das Aves. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas.
- Cooper J. E. 1990. Birds and zoonoses. *Ibis*. 132: 181-191.
- Cray C.; Villar D. 2008. Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. *Vet Clin Pathol*. 37(3):328-331.
- Etteradossi N. & Saif Y.M. 2013. Infectious bursal disease. p. 219-246. In: Swayne D. E., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Suarez D.L., Nair V. Diseases of poultry. 13 ed. Iowa State University: Ames.
- Franco A. C. & Roehe P. M. 2007. Herpesviridae. p. 433- 488. In: Flores E. F. Virologia veterinária. Santa Maria: Ed. da UFSM.
- Gould A. R., Kattenbelt J. A., Selleck P., Hansson E., Della-Porta A., & Westbury H. A. 2001. Virulent Newcastle disease in Australia: Molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Research*. 77(1): 51-60.
- Hanson R. P. 1976. Avian reservoirs of Newcastle disease. p. 185-195. In *Wildlife diseases* Springer US.
- Hubálek Z. 1994. Pathogenic microorganisms associated with free-living birds (a review). *Acta Scientiarum Naturalium Brno*. 28: 1-74.
- Hubálek Z. 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*. 40(4): 639-659.
- Kaleta E. F. & Docherty D. E. 2007. Avian herpesvirus. p. 63-86. In: Thomas N. J., Hunter D.B., Atkinson CT, editors. *Infectious diseases of wild birds*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Kasanga C. J., Yamaguchi T., Wambura P. N., Munang'andu H. M., Ohya K. & Fukushi, H. 2008. Detection of infectious bursal disease virus (IBDV) genome in free-living pigeon and guinea fowl in Africa suggests involvement of wild birds in the epidemiology of IBDV. *Virus Genes*. 36(3) 521-529.
- Landman W. J. M. & Verschuren S. B. E. 2003. Titration of Marek's disease cell associated vaccine virus (CVI 988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from dutch hatcheries. *Avian Diseases*. 47: 1458-1465.
- Leighton F. A. & Heckert R. A. 2007. Newcastle Disease and Related Avian Paramyxoviruses. p. 3-16. In: Thomas N. J., Hunter D. B. & Atkinson, C. T. *Infectious Diseases of Wild Birds*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Marques M. V. R., Junior F. C. F., de Assis Andery D., Fernandes A. A., De Araújo A. V., De Resende J. S., & da Silva Martins N. R. 2012. Health assessment of captive tinamids (Aves, Tinamiformes) in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 43(3): 539-548.
- Marques M. V. R., Junior F. C. F., de Assis Andery D., Fernandes A. A., de Araújo A. V., de Resende J. S., & da Silva Martins N. R. 2013. Serologic, parasitic, and bacteriologic assessment of captive cracids (Aves: Galliformes: Cracidae) in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 44(1): 27-34.
- Martínez J., Tomás G., Merino S., Arriero E. & Moreno, J. 2003. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. *Functional Ecology*. 17(5): 700-706.

Nair V., Schat K.A., Fadly A.M., Zavala, G., Hafner S., Reece R.L. & Williams S.M. 2013. Neoplastic diseases. p. 513-673. In: Swayne D. E., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Suarez D.L., Nair V. Diseases of poultry. 13 ed. Iowa State University : Ames.

Nunes C. F., Fonseca F., Leite A. T. M., Silva Filho R. P. D., Finger P. F., Castro C. C. & Hübner S. D. O. 2012. Investigation on Newcastle Disease Virus (NDV), Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) and Avian Poxvirus (APV) in magellanic penguins in Southern region of Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology. 55(4): 537-542.

Ogawa M., Wakuda T., Yamaguchi T., Murata K., Setiyono A., Fukushi H. & Hirai K. 1998. Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free living wild birds in Japan. J Vet Med Sci. 60(11): 1277-1279.

Oliveira-Junior J. G., Portz C., Loureiro B. O., Schiavo P. A., Fedullo L. P. L., Mazur C. & Andrade C. M. 2003. Serology for the Newcastle disease virus in non vaccinated birds in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Ciência Rural. 2(33): 381-383.

Orsi M. A., Doretto Jr L., Camillo S. C. A., Reischak D., Ribeiro S. A. M., Ramazzoti A., Mendonça A.O., Spilki F.R., Buzinaro M.G., Ferreira H.L. & Arns C. W. 2010. A survey for maintenance of virulent newcastle disease virus-free area in poultry production in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 41(2): 368-375.

Roitt I., Brostoff J. & Male D. 1993 Immunology, 3rd edn. Mosby-Year Book Europe Limited, London.

Santos H. F. 2008. Anticorpos Contra Vírus de Aves em Galinhas de Terreiro e Cracídeos. Identificação e Susceptibilidade a Antimicrobianos da Microbiota de Cracídeos Cativos no RS, Brasil. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Scherer A. L., Scherer J. D. F. M., Petry M. V. & Sander M. 2011. Occurrence and interaction of wild birds at poultry houses in southern Brazil. Revista Brasileira de Ornitologia - Brazilian Journal of Ornithology. 19(1): 74-79.

Silva J. S. A., Mot R. A., Vilela S. M. O., Doretto J. L., Pinheiro J. J. W. & Silva L. B. G. 2006. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of the agreste region of the state of Pernambuco. Brazilian Journal of Poultry Science. 8(2): 125-129.

Smyth J. A. & McNulty M. S. 1994. A transmissible disease of the bursa of Fabricius of ducks. Avian Pathology. 23(3): 447-460.

Suarez D.L., Miller, P.J., Koch G., Mundt E., Jones R.C., Rautenschlein, S. 2013. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. p. 89-138. In: Swayne D. E., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K., Suarez D.L., Nair V. 13 ed. Diseases of poultry. Iowa State University: Ames.

Thomazelli L. M., J. Araujo, C. S. Ferreira, R. Hurtado, D. B. Oliveira, T. Ometto, M. Golono, L. Sanfilippo, C. Demetrio, M. L. Figueiredo, & E. L. Durigon. 2012. Molecular surveillance of the Newcastle disease virus in domestic and wild birds on the north eastern coast and Amazon biome of Brazil. Rev. Bras. Cienc. Avic. 14(1):1-7.

Vooren C. M., Brusque L. F. 1999. As aves do ambiente costeiro do Brasil: biodiversidade e conservação. Disponível em: < http://www.brasil-rounds.gov.br/round6/arquivos_r6/guias/PERFURACAO/PERFURACAO_R6/refere/Aves.pdf>. Acesso em: 25 de julho de 2017.

Wobeser, G. A. 1997. Diseases of wild waterfowl, 2nd Edition. Plenum Press, New York, New York, 324 pp.

Zanetti F., Berinstein A., Pereda A., Taboga O., & Carrillo E. 2005. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. Avian diseases. 49(4): 546-550.

5 Considerações Finais

No presente estudo não foi detectada a excreção ou o contato prévio das aves pesquisadas com NDV, vírus da Doença de Marek e IBVD pelas técnicas diagnósticas empregadas, seja pela ausência de exposição ao vírus ou pela excreção intermitente do agente. Os dados apresentados também evidenciaram a presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Marek nas duas espécies de aves migratórias amostradas, Maçarico-de-sobre-branco e Albatroz-de-sobrancelha-negra. Contra os demais vírus pesquisados, Doença de Newcastle e IBVD, não foram detectados anticorpos pelo método de ELISA indireto.

No entanto, dada a facilidade de disseminação dos agentes a campo, a dificuldade de controle dessas enfermidades e a importante posição do Brasil como produtor e exportador mundial de frangos de corte, sugere-se contínua vigilância dos vírus potencialmente patogênicos pelo monitoramento de aves vida livre, residentes emigratórias, considerando que o contato intra e interespecies pode desempenhar um papel relevante na transmissão de doenças.

Os resultados obtidos reforçam a importância da vigilância contínua dos vírus potencialmente patogênicos aos plantéis avícolas através do monitoramento de aves migratórias, dada a importante posição do Brasil no mercado produtor e exportador de frangos de corte.

Referências

ALEXANDER, D. J.; MANVELL, R. J.; COLLINS, M. S.; BROCKMAN, S. J.; WESTBURY, H. A.; MORGAN, I.; AUSTIN, F. J. Characterization of paramyxoviruses isolated from penguins in Antarctica and sub-Antarctica during 1976–1979. **Archives of virology**, v. 109, n.1, p. 135-143, 1989.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. *In*: CALNEK, B. W. *et al.* **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University, 9. ed., 1991. p. 496–519.

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

ARNS, C. W.; SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S. Paramyxoviridae. *In*: Flores, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007, p. 657- 688.

ASHRAF, S. *et al.* Detection of antibodies against serotypes 1 and 2 infectious bursal disease virus commercial ELISA kits. **Avian Diseases**, v. 50, p.104-109, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL [ABPA]. 2017. Relatório anual 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL [ABPA]. 2020. Relatório Anual 2020. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf>. Acesso em: 8 maio 2020.

BANDA, A; VILLEGAS, P. Genetic characterization of very virulent infectious bursal disease viruses from Latin America. **Avian Diseases**, v. 48, n. 3, p. 540-549, 2004.

BERNARDINO, A.; LEFFER, E. Doença Infecciosa da Bolsa de Fabricio. *In*: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J., SESTI, L; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009, p. 651-676.

BOLIS, D. A.; PAGANINI, F. J.; SIMON, V. A.; ZUANAZE, M. F.; SCANAVINI NETO, H.; CORREA, A. R. A.; ITO, N. M. K. Gumboro disease: evaluation of serological and anatomopathological responses in vaccinated broiler chickens challenged with very virulent virus strain. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 5, n. 2, Campinas May/Aug., 2003.

BOODHOO, N.; GURUNG, A.; SHARIF, S.; BEHBOUDI, S. Marek's disease in

chickens: a review with focus on immunology. **Veterinary research**, v. 47, n. 1, p.119, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria Nº 193, de 19 de setembro de 1994, institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)**. Diário Oficial da União, publicado em 19/09/1994, seção 1, p. 13, 1994.

CANAL, C. W.; BARBOSA, T. M. C. Enfermidade de Marek, Complexo Leucótico Aviário e Reticuloendoteliose. *In*: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N., DI FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**, Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009, p. 569-586.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL [CNA]. 2017. **Balço 2016, perspectivas 2017**. Disponível em: <<http://data.novo.gessulli.com.br/file/2016/12/08/H104033-F00000-M637.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2017.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS [CBRO]. **Lista das aves do Brasil**, 10. ed., 2011.

COOPER, J. E. Birds and zoonoses. **Ibis**. v.132, p. 181–191, 1990.

CRAY, C.; VILLAR, D. Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. **Vet Clin Pathol**. v. 37, n. 3, p. 328-331, 2008.

DAS, A.; SPACKMAN, E.; SENNE, D.; PEDERSEN, J.; SUAREZ, D. L. Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. **J Clin Microbiol**, v. 44, p. 3065–3073, 2006.

DI FABIO, J.; DE CASTRO, A. G.; GARDIN, Y.; ROSSINI, L. I.; TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N. *et al.* La enfermedad de la Bolsa de Fabricio (EIBF) por cepas de alta virulencia se propagan a Latinoamérica. **Avicultura Profesional (EUA)**, v. 17, n. 9, p. 15-18, 1999.

DOMINGUES, R. D.; LOUREIRO, F. C.; FORTES, F. B. B.; *et al.* Vigilância ativa para Influenza Aviária e Doença de Newcastle em aves migratórias na Estação Ecológica do Taim em 2011. **Informativo Técnico DPA**, v. 3, n. 4, p. 1-4, 2012. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/02101249-inftec-27-vigilancia-para-influenza-aviaria-e-cao-de-mortalidades-aviarias.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

ECHENIQUE, J. V. Z.; SOARES, M. P.; ALBANO, A. P. N.; *et al.* Diseases of wild birds in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 121-128, 2020.

ETERRADOSSI, N.; SAIF, Y.M. Infectious bursal disease. *In*: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D.L.; Nair, V.

- Diseases of poultry**. 13. ed. Ames: Iowa State University, 2013, p. 219-246.
- FONSECA, F.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D. A.; FISCHER, G.; VIDOR, T. Avaliação do uso de sangue em papel-filtro para detecção e quantificação de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n.2, p. 319-324, 2007.
- FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. *In*: FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007, p. 433- 488.
- GAO, L.; QI, X.; LI, K.; GAO, H.; GAO, Y.; QUIN, L.; WANG, Y.; WANG, X. Development of a tailored vaccine against challenge with very virulent infectious bursal disease virus of chickens using reverse genetics. **Vaccine**, v. 29, p. 5550-5557, 2011.
- GOULD, A. R.; KATTENBELT, J. A.; SELLECK, P.; HANSSON, E.; DELLA-PORTA, A.; WESTBURY, H. A. Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. **Virus Research**, v. 77, n.1, p. 51-60, 2001.
- HANSON, R. P. Avian reservoirs of Newcastle disease. *In*: **Wildlife diseases**. New York: Springer US, 1976, p. 185-195.
- HAQUE, M. H.; HOSSAIN, M. T.; ISLAM, M. T.; ZINNAH, M. A.; KHAN, M. S. R.; ISLAM, M. A. Isolation and detection of Newcastle disease virus from field outbreaks in broiler and layer chickens by reverse transcription–polymerase chain reaction. **Bangl. J. Vet. Med.**, v. 8, n. 2, p. 87–92, 2010.
- HIRSCHMANN, L. C.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; *et al.* Fatores de risco associados com a presença de infecções virais em aves domésticas na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 47, n. 1642, p. 1-9, 2019.
- HUBÁLEK, Z. Pathogenic microorganisms associated with free-living birds (a review). **Acta Scientiarum Naturalium Brno**, v. 28, p. 1–74, 1994.
- HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 4, p. 639-659, 2004.
- ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. Doença de Gumboro: revisão de literatura, avanços tecnológicos e novos conhecimentos. **Boletim Técnico ELANCO Saúde Animal**, São Paulo, 2001.
- KALETA, E. F.; DOCHERTY, D. E. Avian herpesvirus. *In*: THOMAS, N. J.; HUNTER, D.B.; ATKINSON, C. T., ed. **Infectious diseases of wild birds**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p. 63-86.
- KASANGA, C. J.; YAMAGUCHI, T.; WAMBURA, P. N.; MUNANG'ANDU, H. M.; OHYA, K.; FUKUSHI, H. Detection of infectious bursal disease virus (IBDV) genome in free-living pigeon and guinea fowl in Africa suggests involvement of wild birds in the epidemiology of IBDV. **Virus Genes**. v. 36, n. 3, p. 521-529, 2008.
- LANDMAN, W. J. M.; VERSCHUREN, S. B. E. Titration of Marek's disease cell

associated vaccine virus (CVI 988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from dutch hatcheries. **Avian Diseases**, v. 47, p. 1458-1465, 2003.

LEIGHTON, F. A.; HECKERT, R. A. Newcastle Disease and Related Avian Paramyxoviruses. *In*: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious diseases of wild birds**, Iowa: Blackwell Publishing, 2007, p. 3-16.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle (Versão 1.4)**. 2013,59p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/plano-de-contingencia-versao-1_4.pdf/view>. Acesso em: 9 ago. 2017.

MARQUES, M. V. R.; JUNIOR, F. C. F.; DE ASSIS ANDERY, D.; FERNANDES, A.A.; DE ARAÚJO, A. V.; DE RESENDE, J. S.; MARTINS, N. R. da S. Health assessment of captive tinamids (Aves, Tinamiformes) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 43, n. 3, p. 539-548, 2012.

MARQUES, M. V. R.; JUNIOR, F. C. F.; DE ASSIS ANDERY, D.; FERNANDES, A.A.; DE ARAÚJO, A. V.; DE RESENDE, J. S.; MARTINS, N. R. da S. Serologic, parasitic, and bacteriologic assessment of captive cracids (Aves: Galliformes: Cracidae) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 44, n. 1, p. 27-34, 2013.

MARTÍNEZ, J.; TOMÁS, G.; MERINO, S., ARRIERO, E.; MORENO, J. Detection of serum immunoglobulins in wild birds by direct ELISA: a methodological study to validate the technique in different species using antichickens antibodies. **Functional Ecology**. v.17, n. 5, p. 700-706, 2003.

MORAES, H. L. S. **Doença Infecciosa Bursal**: estudo sobre amostras vacinais e de campo, imunidade maternal e desafio com amostra muito virulenta do vírus. 2004. Porto Alegre, 95f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MÜLLER, H.; ISLAM, M. R.; RAUE, R. Research on infectious bursal disease - the past, the present and the future. **Veterinary Microbiology**, v. 97, p.153–165, 2003.

MURATA, S.; HAYASHI, Y.; KATO, A.; ISEZAKI, M.; TAKASAKI, S.; ONUMA, M.; OSA, Y.; ASAKAWA, M.; KONNAI, S.; OHASHI, K. Surveillance of Marek's disease virus in migratory and sedentary birds in Hokkaido, Japan. **The Veterinary Journal**, v.192, n. 3, p. 538-540, 2012.

NAIR V.; SCHAT, K. A.; FADLY, A. M.; ZAVALA, G.; HAFNER, S.; REECE, R. L.; WILLIAMS, S. M. Neoplastic diseases. *In*: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. L.; NAIR, V. **Diseases of poultry**, Ames: Iowa State University, 13. ed., 2013, p. 513-673.

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

NUNES, C. F.; FONSECA, F.; LEITE, A. T. M.; SILVA FILHO, R. P. D.; FINGER, P. F.; CASTRO, C. C.; HÜBNER, S. D. O. Investigation on Newcastle Disease Virus (NDV), Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) and Avian Poxvirus (APV) in magellanic penguins in Southern region of Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 55, n. 4, p. 537-542, 2012.

OGAWA, M.; WAKUDA, T.; YAMAGUCHI, T.; MURATA, K.; SETIYONO, A.; FUKUSHI, H.; HIRAI, K. Seroprevalence of infectious bursal disease virus in freeliving wild birds in Japan. **J Vet Med Sci**, v. 60, n. 11, p. 1277-1279, 1998.

OIE. World Organization for Animal Health. 2013. **Newcastle disease – Aetiology, epidemiology, diagnosis, prevention and control references**. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Diseases_cards/NEWCASTLE_DISEASE.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2017.

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

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

ORSI, M. A.; DORETTO JR, L.; CAMILLO, S. C. A.; REISCHAK, D.; RIBEIRO, S. A. M.; RAMAZZOTI, A.; MENDONÇA, A. O.; SPILKI, F. R.; BUZINARO, M. G.; FERREIRA, H. L.; ARNS, C. W. A survey for maintenance of virulent newcastle disease virus-free area in poultry production in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, n. 2, p. 368-375, 2010.

PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Doença de Newcastle. *In*: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J., SESTI, L; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009, p. 587-630.

REICHERT, L. J.; GOMES, M. C.; SCHWENGBER, J. E. Avaliação Técnica e Econômica de um Agroecossistema familiar de base ecológica na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 1-4, p. 123-132, 2011.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 3. ed. London: Mosby-Year Book Europe Limited, 1993.

SADEGHI, M. R.; GHORASHI, S. A.; KARGAR MOAKHAR, R.; MORSHEDI, D.; SALEHI TABAR, R.; GHAEMMAGHAMI, S. S. Polymerase chain reaction for the detection and differentiation of Marek's disease virus strains MDV-1 and HVT. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 7, n.1, p. 17-21, 2006.

SANTOS, H. F. **Anticorpos contra vírus de aves em galinhas de terreiro e cracídeos**. Identificação e Susceptibilidade a Antimicrobianos da Microbiotade Cracídeos Cativos no RS, Brasil. 2008. Santa Maria, 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SALLE, C. T. P.; MORAES, H. L. S. Prevenção de doenças, manejo profilático, monitoria. *In*: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J., SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009, p. 255-266.

SCAGION, G. P. **Detecção sorológica, molecular e caracterização dos Paramixovírus aviários do tipo 1 (classe I e classe II) em aves silvestres e sinantrópicas**. Campinas: UNICAMP, 2015. 109p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

SHARMA, J. M.; KIM, I. J.; RAUTENSCHLEIN, S.; YEH, H. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 223-235, 2000.

SILVA, J. S. A.; MOT, R. A.; VILELA, S. M. O.; DORETTO, J. L.; PINHEIRO, J. J. W.; SILVA, L. B. G. Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of the agreste region of the state of Pernambuco. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 2, p. 125-129, 2006.

SILVA, P. L. **Doença de Marek**: neoplasia e imunossupressão. Ceva World, edição especial, p. 1-15, 2014. Disponível em: <https://www.avisite.com.br/clipping/CevaWorld_02_Marek.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2017.

SMYTH, J. A.; MCNULTY, M. S. A transmissible disease of the bursa of Fabricius of ducks. **Avian Pathology**. v. 23, n. 3, p. 447-460, 1994.

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

SUAREZ, D. L.; MILLER, P. J.; KOCH, G.; MUNDT, E.; JONES, R. C.; RAUTENSCHLEIN, S. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. *In*: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SUAREZ, D. L.; NAIR, V. **Diseases of poultry**, Ames: Iowa State University, 13 ed., 2013, p. 89-138.

TANIMURA, N.; SHARMA, J. M. Appearance of T cells in the bursa of Fabricius and cecal tonsils during the acute phase of infectious bursal disease virus infection in

chickens. **Avian Diseases**. v.41, p.638-645, 1997.

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

VAN DEN BERG, T. P.; MORALES, D.; ETERRADOSSI, N.; RIVALLAN, G.; TOQUIN, D.; RAUE, R.; ZIERENBERG, K.; ZHANG, M. F.; ZHU, Y. P.; WANG, C. Q.; ZHENG, H. J.; WANG, X.; CHEN, G. C.; LIM, B. L.; MÜLLER, H. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. **Avian Pathol.** v. 33, p. 470–476, 2004.

VARGAS, G. D.; FISHER, G.; HÜBNER, S. *et al.* **Ocorrência da Doença de Gumboroem Frangos de Corte no Sul do Brasil**. In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura, XX, 2007. Anais... Porto Alegre – Brasil, p. 191-193, 2007.

VOGEL, F. S. F.; FLORES, E. F. Outras famílias virais. In: FLORES, E. F. **Virologiaveterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007, p. 839-860.

VOOREN, C. M., BRUSQUE, L. F. 1999. **As aves do ambiente costeiro do Brasil: biodiversidade e conservação**. Disponível em: <http://www.brasil-rounds.gov.br/round6/arquivos_r6/guias/PERFURACAO/PERFURACAO_R6/refere/Aves.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2017.

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

WILCOX, G. E.; FLOWER, R. L. P.; BAXENDALE, W.; MACKENZIE, J. S. Serological survey of wild birds in Australia for the prevalence of antibodies to eggdrop syndrome 1976 (EDS-76) and infectious bursal disease viruses. **Avian Pathology**, v. 12, n.1, p. 135-139, 1983.

WOBESER, G. A. **Diseases of wild waterfowl**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1997.

ZABALETA, J. P. L.; GONÇALVES, M. C. Programa de avicultura colonial, Avicultura Colonial - **Embrapa Clima Temperado**, p. 1-2, 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32588/1/Programa.avicultura.coloni al.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2017.

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

ZHU, G. S.; OJIMA, T.; HIRONAKA; T.; IHARA, T.; MIZUKOSHI, N.; KATO, A.; UEDA, S.; HIRAI, K. Differentiation of oncogenic and non-oncogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. **Avian Dis.** v. 36, p. 637-645, 1992.

Anexos

Anexo A – Parecer CEEA (artigo 1)



Pelotas, 14 de maio de 2014

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa)

Para: Professor Gilberto D'Avila Vargas

Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Detecção de vírus aviários em aves silvestres e cativas no Rio Grande do Sul”**, processo nº23110.003519/2014-10, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 3519-2014).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

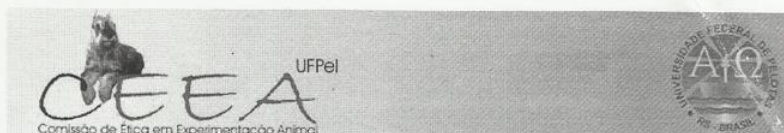
Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 20/05/2014

Assinatura do Professor Responsável:

Anexo B – Parecer CEEA (artigo 2)



Pelotas, 07 de maio de 2009.

De: Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del-Pino
Pres. da Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEAA)

Para: Prof. Dr. Gertrud Müller Antunes
Departamento de Microbiologia e Parasitologia


Senhora Professora:

A CEEAA analisou o projeto de pesquisa intitulado “**Diversidade parasitária de animais silvestres do Rio Grande do Sul**”, processo nº 23110.008876/2008-18 sendo de parecer FAVORÁVEL a sua execução considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos que após tomar conhecimento do parecer reenviar o processo à CEEAA.

OBS: Informamos que duas cópias deste parecer estão anexadas ao processo. Uma cópia destinada ao coordenador do projeto e a outra deverá permanecer junto ao mesmo.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino
Presidente da CEEAA