

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E SOROLÓGICA DA VACINAÇÃO CONTRA  
DOENÇA DE NEWCASTLE EM AVES SILVESTRES E ORNAMENTAIS**

**CAROLINE WEISSHEIMER COSTA GOMES**

Porto Alegre

Março / 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E SOROLÓGICA DA VACINAÇÃO CONTRA  
DOENÇA DE NEWCASTLE EM AVES SILVESTRES E ORNAMENTAIS**

**Autora:** Caroline Weissheimer Costa Gomes

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração de Medicina Veterinária Preventiva e Patologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Orientador:** Prof. Cláudio Estêvão Farias da Cruz

Porto Alegre

Março / 2016

**CAROLINE WEISSHEIMER COSTA GOMES**

AVALIAÇÃO CLÍNICA E SOROLÓGICA DA VACINAÇÃO CONTRA DOENÇA  
DE NEWCASTLE EM AVES SILVESTRES E ORNAMENTAIS

Aprovada em 21 MAR 2016

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Cláudio Estêvão Farias da Cruz  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Dr. Helton Fernandes dos Santos  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Mariangela da Costa Allgayer  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Maristela Lovato  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos animais. São eles que me motivam diariamente a estudar, a acordar cedo, a querer aprender mais e mais. Pra eles. Por eles. Sem eles nada disso seria possível, nada disso faria sentido. Um muito obrigada a todos aqueles que já passaram pela minha vida, deixando marcas inesquecíveis e me ensinando muito sobre amor incondicional.

Queria agradecer a minha referência de profissional dedicado, minha inspiração diária, meu companheiro de todas as horas. Ele que me ajudou em tudo, dando idéias e soluções para o projeto. Elisandro Oliveira dos Santos obrigada por me mostrar que nada é por acaso, que tudo tem seu tempo e que no fim tudo da certo.

Ao meu orientador, Cláudio Estêvão Farias da Cruz, por se fazer presente integralmente nesse projeto, participando desde sua criação, as saídas de campo, até a conclusão final. Obrigada pela oportunidade de trabalhar juntos pela conservação da fauna silvestre.

Agradeço muito ao Rincão Aves Ornamentais e ao Damien Seixas, por nos abrir as portas do seu criatório para realizar esse projeto. Por ser exemplo de dedicação aos animais. Por tornarem nossos dias de coletas leves e descontraídos. Um agradecimento especial ao *chef* que deixou todo o trabalho com um sabor delicioso.

Obrigada a toda equipe do laboratório, em especial ao Gustavo Fünckler, pelo processamento das amostras. Agradeço também a Inês Andretta pela ajuda com as análises estatísticas do trabalho.

Obrigada a todos que contribuíram direta e indiretamente com esse estudo. Aos estagiários que ajudaram nas coletas. Aos amigos e a minha família que estiveram ao meu lado durante todo esse percurso.

Obrigada a todos!

# AVALIAÇÃO CLÍNICA E SOROLÓGICA DA VACINAÇÃO CONTRA DOENÇA DE NEWCASTLE EM AVES SILVESTRES E ORNAMENTAIS<sup>1</sup>

Autor: Caroline Weissheimer Costa Gomes

Orientador: Cláudio Estêvão Farias da Cruz

## RESUMO

Manejo nutricional e recintos adequados são prioritários para a manutenção de aves silvestres em cativeiro. O programa sanitário, terceiro aspecto em importância nesses sistemas, inclui várias técnicas, entre as quais, destaca-se aqui, a vacinação que tem sido objeto de pouquíssimos estudos. O objetivo desse estudo foi avaliar, clínica e sorologicamente, o efeito da aplicação de um protocolo de vacinação contra doença de Newcastle em diferentes espécies de aves ornamentais. Foram comparadas as respostas obtidas em 10 galinhas ornamentais com as registradas em 12 faisões coleira (*Phasianus colchicus*), 7 perdizes Chucar (*Alectoris chukar*), 6 psitacídeos (2 Calopsitas *Nymphicus hollandicus*, 2 Lóris *Trichoglossus haematodus moluccanos* and 2 Roselas *Platycercus eximius*) e 6 Turacos (2 Persas *Tauraco persa*, 2 Bochecha-branca *Tauraco leucotis* e 2 Violetas *Musophaga violacea*). As aves foram capturadas com puçá, transferidas à sala de manejo, em caixas transporte e coletas de sangue foram feitas antes e após as vacinações. Instilou-se uma gota das vacinas vivas contra Newcastle HB1 e La Sota, no 1º e 21º dias do experimento. No 112º dia, as aves foram injetadas, intramuscularmente, com 0,25 mL/kg de uma vacina inativada oleosa contra Newcastle. As amostras foram submetidas ao teste *Newcastle disease virus antibody Test Kit ELISA-BioChek*. Exceto por súbitos e transitórios sinais em um faisão coleira (perda de equilíbrio) e um turaco persa (blefaroptose), os quais ocorreram após a vacinação intramuscular, nenhuma outra alteração clínica que pudesse ser associada com as vacinações foi observada. Exceto pelos psitacídeos, todas as outras espécies demonstraram reações consideráveis nos títulos de anticorpos; entretanto as médias de títulos de anticorpos diferiram significativamente daquelas registradas nas galinhas. A capacidade protetora das respostas imunológicas observadas permanece por ser determinada. Ressalta-se a necessidade de continuidade em estudos dessa natureza.

**Palavras chaves:** aves silvestres ornamentais, conservação, manejo sanitário, Newcastle, vacinação.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias – Medicina Veterinária Preventiva e Patologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS (36p.). Março de 2016.

## NEWCASTLE VACCINATION IN ORNAMENTAL WILD BIRDS: CLINICAL AND SEROLOGICAL EVALUATION<sup>2</sup>

Autor: Caroline Weissheimer Costa Gomes

Orientador: Cláudio Estêvão Farias da Cruz

### ABSTRACT

*Proper nutrition and enclosure management are priorities for conserving wild birds in captivity. The health program, a third step in importance in these initiatives, may include several techniques, among which we highlighted vaccination that has rarely been studied in such animals. This study clinically and serologically evaluates the effect of applying a vaccination protocol against Newcastle disease in several wild bird species. The responses observed in 10 ornamental chickens were compared to those recorded in 12 ring-neck pheasants (*Phasianus colchicus*), 7 Chukar partridges (*Alectoris chukar*), 6 psittacines (2 Cocktails *Nymphicus hollandicus*, 2 lorikeets *Trichoglossus haematodus moluccanos* and 2 eastern rosellas *Platycercus eximius*) and 6 touracos (2 Guinea Tauraco *Tauraco persa*, 2 White-cheeked Tauraco *Tauraco leucotis* and 2 Violet *Musophaga violacea*). Birds were captured inside their enclosures with a bird catching net and then were transferred in transport boxes to a safe room, where blood samples were collected before and after vaccinations. Samples were submitted to the Newcastle disease virus antibody Test Kit ELISA-BioChek. One drop of the live Newcastle H1 and La Sota vaccines was ocularly instilled on the 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> experimental days, respectively. On the 112<sup>th</sup> day, one shot of 0.25 ml/kg of an inactivated oily Newcastle vaccine was intramuscularly injected. Except for sudden and transient sings in one ring-neck pheasant (loss of balance) and one Guinea touraco (blepharoptosis), which occurred after the intramuscular shot, none other clinical change that could be associated with the vaccines was observed. Except for the psittacines, the other bird species showed considerable antibody titers responses. However, their mean antibody titers differed significantly from that record in the chickens. The protective effect of the immunological responses observed remains to be determined. The need of further studies in the subject is highlighted.*

**Keywords:** *ornamental wild birds, conservation, sanitary management, Newcastle, vaccination.*

---

<sup>2</sup> Master dissertation in Veterinary Sciences – Preventive Veterinary Medicine and Pathology. Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, (36p.). March 2016.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	10
2.1. Sistema imunológico das aves .....	10
2.1.1. Sistema imune humoral .....	11
2.1.2. Sistema imune celular .....	12
2.1.3. Anticorpos maternos .....	12
2.2. Doença de Newcastle .....	13
2.2.1. Doença de Newcastle em aves silvestres .....	15
2.3. Vacinação em aves .....	16
2.4. Técnica de ELISA .....	18
2.5 Espécies estudadas .....	19
<b>3. Artigo - Pesquisa Veterinária Brasileira</b> .....	21
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	32
REFERÊNCIAS .....	33

## 1 INTRODUÇÃO

A tradição e a cultura associadas com a manutenção de aves em cativeiro são tão antigas quanto a própria sociedade humana. As criações dessas aves são motivadas pelo desejo de mantê-las como animais de estimação, exposições de canto, exposições, ornamentação, suprimento de produtos (carne, ovos, penas, etc.) e programas de recuperação de espécies ameaçadas, entre outros (MERGULHÃO; TRIVELATO, 2006; KARSTEN, 2007). O mercado de aves silvestres ornamentais se mantém em plena expansão mundial e se estima que movimente cerca de 15 bilhões de dólares, anualmente. Nesse cenário, a necessidade de desenvolver tecnologias para o manejo adequado dessas aves em cativeiro assume importância destacada. Apesar disso, estudos associados com o manejo dessas criações são escassos, ou raramente divulgados. Há notável carência de informações associadas com epizootia, ocorrência e manifestações de doenças em aves mantidas em cativeiro, bem como de práticas apropriadas de manejo para diversas espécies. Além disso, pouco se sabe sobre potenciais impactos ambientais que esses plantéis cativos, ocasionalmente, representem. Definitivamente, esse setor de atividade não acompanhou o proeminente desenvolvimento tecnológico que experimentou a avicultura industrial, nas últimas décadas o que, frequentemente, representa motivo de preocupação para o serviço oficial de sanidade avícola (MAPA, 2012; MARKS et al., 2014). A necessidade do incremento de tais tecnologias em criações dessa natureza se justifica tanto pela melhoria dos índices de produção e reprodução, como pela garantia do bem-estar dessas aves, mas fundamentalmente, pela prevenção dos riscos associados com disseminação de doenças para plantéis de avicultura industrial (MAPA, 2012), ou colônias de aves silvestres de vida livre (CUBAS, 1996; VILANI, 2006).

Há uma longa lista de patógenos registrados em doenças de aves silvestres (THOMAS et al., 2007), entre os quais merecem destaque *Salmonella*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, Newcastle e Influenza aviária (ANDERSEN; VANROMPAY, 2000; WOODFORD, 2000; SANCHES, 2008; GODOY; MATUSHIMA, 2010, MAPA 2012). Portanto, outras doenças de aves são suficientemente importantes para justificarem inclusão em estudos dessa natureza. Entretanto, a doença Newcastle, além de compor o Plano Nacional de Sanidade Avícola (MAPA, 2012) e determinar severos prejuízos econômicos universalmente, pode afetar severamente diversas espécies. Parcela considerável do contingente de aves mantidas em instalações de criatórios apresenta



condição sanitária desconhecida, o que favorece a ocorrência de doenças e baixas por mortes, as quais apenas raramente têm sido objetos de estudo consistentes (SANCHES, 2008; GODOY; MATUSHIMA, 2010). Fatores como instalações e manejo (sanitário e nutricional), alicerces de qualquer sistema de manutenção animal (CUBAS, 1996), quando deficientes reduzem as chances de sobrevivência dessas aves (MARINI; GARCIA, 2005; EFE et al., 2006; MARINI; MARINHO FILHO, 2006; KARSTEN, 2007), além de favorecerem a disseminação de doenças (CATÃO-DIAS, 2003; CRUZ et al., 2011 e 2016).

Ainda que muitas dessas aves sejam espécies exóticas, a conservação das mesmas é responsabilidade do território que as mantém, especialmente porque várias delas se encontram em condição vulnerável, ou ameaçada, em sua região de ocorrência natural. Sabe-se que várias espécies de aves exóticas adquiridas, nas décadas precedentes, por criatórios brasileiros através de importação pereceram por manejo inadequado e doenças, muitas vezes não diagnosticadas. Portanto, essas aves, praticamente, desapareceram dos criatórios nacionais, nos dias de hoje. *Leiothrix lutea*, *Garrulax* spp., *Pycnonotus jocosus*, *Guttera* sp., *Crossoptilon mantchuricum*, *Argasianus argus*, *Tragopan caboti* e *Polyplectron malacense* são alguns exemplos, entre tantos outros (CRUZ et al., 2011; ABCA, 2012; ABRASE, 2012). A utilização desses plantéis para a produção de informações aplicáveis na conservação de espécies inclui uma das principais justificativas para sua manutenção em cativeiro (ANDRIOLO, 2006).

O monitoramento de plantéis avícolas comerciais, de galinhas e perus, para o risco de doença de Newcastle é uma exigência do Programa Nacional de Sanidade Avícola. Entretanto, nas criações de aves silvestres, essa condição não é obrigatória. Atualmente, o Brasil é considerado país livre da doença de Newcastle na avicultura comercial, sendo esse status mantido através da vacinação de grande parte do plantel avícola de produção. Entretanto, a existência de múltiplos reservatórios domésticos, silvestres e migratórios expõe frequentemente diversos animais ao desafio de campo. Quando se trata de criações comerciais de aves silvestres, os animais estão totalmente suscetíveis, devido à falta de vacinas próprias para as diferentes espécies de aves criadas e a incerteza da eficácia das vacinas comerciais para outras espécies, além de galinhas e perus. Não há produção de vacinas específicas para uso nas espécies de aves silvestres. Tampouco há anticorpos secundários espécie específicos para desenvolvimento de testes sorológicos para a maioria das espécies de aves silvestres (STÖBEL et al., 2002;

FERREIRA et al., 2013). Quanto ao desenvolvimento de programas de vacinação com aplicação em aves silvestres, pouquíssimos relatos têm sido divulgados (OSTROWSKI et al., 1998). Alguns, além de promissores incluem a aplicação em espécie ameaçada submetida a programa de reprodução dirigida para soltura e, portanto, justifica-se sobremaneira (FACON et al., 2005). Observações de campo, em nosso meio, como em outros sugerem que vacinas produzidas para uso em galinhas possam induzir resposta e desenvolver defesa também em algumas famílias de aves silvestres, especialmente galiformes. Estudos prévios (SCHMIDT et al., 2008) confirmam essas observações e indicam a necessidade de investigações adicionais. Além disso, embora haja evidência indicativa da aplicabilidade do antianticorpo antigalinha para detectar anticorpos da maioria das espécies de aves silvestres (MARTÍNEZ et al., 2003), sugere-se que, também nesse aspecto, há necessidade de pesquisas associadas continuadas.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Sistema imunológico das aves**

O sistema imunológico das aves funciona de maneira semelhante ao dos mamíferos (DAVISON, 2014), porém existem diferenças quanto à estrutura e diferenciação dos órgãos linfoides. Estudos detalhados estão disponíveis apenas para galinhas e aves de produção e servem de modelo para diversas outras espécies de aves silvestres e domésticas (GERLACH, 1994a). As aves, de maneira geral, não apresentam linfonodos. Os órgãos que regulam a produção e a diferenciação de linfócitos são os órgãos linfoides primários. O timo e a Bursa de Fabricius são responsáveis pelo amadurecimento e diferenciação dos linfócitos, em duas populações principais: linfócitos T e B (TIZARD, 2002; SHARMA, 2008).

Os linfócitos T amadurecem no timo, órgão encontrado tanto nos mamíferos como nas aves. Já, os linfócitos B, nas aves, amadurecem na Bursa de Fabricius que está localizada imediatamente acima da cloaca. Como o timo, a bursa consiste em linfócitos incrustados em tecido epitelial. A bursa serve de local para maturação e diferenciação das células do sistema formador de anticorpos. Nos mamíferos, esse papel é desempenhado pela medula óssea (TIZARD, 2002). O baço das aves apresenta forma arredondada e filtra os antígenos a partir do sangue e é considerado um órgão linfoide secundário (QURESHI; HUSSAIN; HEGGEN, 1998). Esse processo de filtração remove tanto partículas antigênicas como células sanguíneas envelhecidas. As estruturas linfoides encontradas no trato gastrointestinal das aves, como as tonsilas cecais, placas de Peyer e o divertículo de Meckel são consideradas órgãos linfoides secundários, mas representam parte importante do sistema imune. Também, nessas espécies, encontra-se uma concentração de tecido linfoide na região oculonasal, denominada glândula de Harder (GERLACH, 1994a; MORGULIS, 2002).

O propósito do sistema imunológico não é somente proteger contra organismos invasores, mas também eliminar células anormais do corpo. Essas podem ser células com falhas estruturais ou antigênicas, células infectadas por vírus ou células mutantes cancerígenas (GERLACH, 1994a). O sistema imune consiste em diversos componentes integrados: mecanismos imunes não específicos e específicos, dentre os quais: sistema imune humoral e sistema imune mediado por células (GERLACH, 1994a; QURESHI; HUSSAIN; HEGGEN, 1998). Os mecanismos imunes não específicos ou inatos

incluem a superfície epitelial, a microbiota autóctone, sistema celular (leucócitos, trombócitos, macrófagos), entre outros mecanismos inerentes ao indivíduo. Os mecanismos imunes específicos (sistema adquirido) são caracterizados por especificidade, homogeneidade e memória. Esse mecanismo se baseia principalmente em células sensíveis aos antígenos (linfócitos B e T) para reconhecer cada determinante antigênico e produzir anticorpos específicos (sistema imune humoral) ou para provocar reações mediadas por células (sistema imune celular). Dependendo se o hospedeiro já foi exposto a tal antígeno antes, ou se é a primeira exposição, a resposta específica pode ocorrer entre dois a três dias, ou cinco a dez dias, respectivamente (GERLACH, 1994a).

### **2.1.1 Sistema imune humoral**

A célula base do sistema imune humoral é o linfócito B (QURESHI, HUSSAIN & HEGGEN, 2015). Durante o período de incubação, os linfócitos B maduros migram da Bursa de Fabricius para os outros órgãos linfáticos secundários (baço, tonsilas cecais, divertículo de Meckel), onde eles iniciam o funcionamento. A função primária do sistema imune humoral é a produção de anticorpos. Anticorpos são imunoglobulinas, cuja maior parte contém ligantes para recetores de membrana e ativação do sistema complemento. Imunoglobulinas podem ser diferenciadas em isotipos ou classes (IgM, IgG, IgA em aves e, em mamíferos, também IgD e IgE) (GERLACH, 1994a; SHARMA, 2008).

- IgG sinônimo de IgY devido a sua estrutura e peso diferente da IgG mamífera. É o anticorpo mais comum no soro e, devido ao seu pequeno tamanho molecular, pode facilmente penetrar espaços teciduais e atravessar superfícies corporais. IgG pode opsonizar, aglutinar e precipitar antígenos.
- IgM é o maior isótopo produzido após contato inicial com o antígeno. Devido ao seu tamanho, normalmente está presente somente na corrente sanguínea periférica. É mais ativa que a IgG na opsonização, aglutinação, vírus neutralização e ativação do complemento.
- IgA, quando acoplada a um componente secretório, é excretada na superfície mucosa do sistema respiratório, geniturinário e digestivo. Na galinha, a IgA também ocorre na corrente sanguínea e, em pombas, essa imunoglobulina está presente em alta concentração no "leite do papo". IgA não está relacionada à ativação do complemento e à opsonização. Sua

principal função é prevenir a aderência dos antígenos às superfícies mucosas do organismo.

Para atuar, os anticorpos se unem diretamente à molécula de antígeno, ou ativam o sistema complemento (GERTNERA; SANTINB; SAADC; 2008). Ao se ligarem diretamente ao antígeno, os anticorpos podem fazer com que haja aglutinação de partículas grandes, formando um aglomerado. Podem fazer, também, com que haja precipitação do complexo antígeno-anticorpo e formar um composto insolúvel. Podem também se ligar a porções importantes do antígeno e fazer com que este perca sua patogenicidade. A ligação do anticorpo com o antígeno facilita o englobamento pelos fagócitos e, da mesma forma, ao se ligarem às células, os anticorpos podem causar ruptura e lise celular, eliminando células que apresentem antígenos conhecidos. (MORGULIS, 2002).

### **2.1.2 Sistema imune celular**

O sistema imunológico mediado por células é essencial para proteção contra vírus, células infectadas por vírus, bactérias intracelulares, corpos estranhos, parasitas, fungos e algumas células tumorais (GERLACH, 1994a). Esse sistema é mediado basicamente pelos linfócitos T e macrófagos. O sistema imune celular envolve vários mecanismos de reconhecimento e destruição de células com patógenos intracelulares (SHARMA, 2008), as quais podem ser dificilmente detectadas pelo sistema imune humoral. Esses mecanismos permitem que os linfócitos T reconheçam as células através das proteínas expressas na superfície celular, como fragmentos peptídicos. Em mamíferos, as moléculas que apresentam peptídeos na superfície celular são codificadas por uma região genética polimórfica, conhecida como complexo principal de histocompatibilidade, ou MHC. O MHC em galinhas é conhecido como sistema B. O MHC tem um papel importante no sistema imune de todos os vertebrados, como elementos de restrição apresentando antígenos para os linfócitos T e assim iniciando a resposta imunológica específica (DAVISON, 2014).

### **2.1.3 Anticorpos maternos**

As aves recém-nascidas recebem anticorpos maternos (IgG) transmitidos através da gema e clara (GERLACH, 1994a; TIZARD, 2002). Anticorpos maternos podem

persistir até um mês após eclosão. O tipo e a quantidade de anticorpos que recebem dependem do estado imunológico da matriz. Galinhas começam a desenvolver seus próprios mecanismos de defesa durante vida embrionária, porém a imunocompetência só aparecerá alguns dias após a eclosão (FELLAH et al., 2014). A vacinação das matrizes com os antígenos apropriados é efetuada de quatro a seis semanas antes do início da postura a fim de assegurar níveis significativos de IgG na gema. Os anticorpos são absorvidos da gema a partir do terceiro dia de vida e visa ajudar na proteção do filhote até que ele atinja a maturidade imunológica, com cerca de 20 a 25 dias de idade (GERLACH, 1994a). A meia-vida dos anticorpos maternos varia de quatro a seis dias, porém estudos demonstram que a meia-vida pode ser maior, dependendo do patógeno (GHARAIBEH & MAHMOUD, 2013). Anticorpos maternos podem representar um obstáculo à vacinação precoce, pois podem neutralizar os antígenos vacinais e, ao mesmo tempo, deprimir a proteção natural do filhote (GERLACH, 1994a; SHARMA, 2008).

## **2.2 Doença de Newcastle**

A doença de Newcastle (DNC) é uma enfermidade viral, aguda, altamente contagiosa, que acomete aves silvestres e comerciais. É considerada uma das doenças que causam maior impacto econômico na avicultura comercial ao redor do mundo. O quadro clínico em aves de produção cursa com sinais respiratórios, frequentemente seguidos por manifestações nervosas, diarreia e edema de cabeça (BRASIL, 2009). A doença de Newcastle é causada pelo paramyxovírus aviário sorotipo 1 (APMV-1), que pertence à família *Paramyxoviridae* (SALES et al., 2007). É uma doença de notificação obrigatória segundo a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), a qual estabelece, mediante diagnóstico positivo, medidas severas de contenção e erradicação, incluindo o sacrifício de todas as aves afetadas e susceptíveis à contaminação (BRASIL, 2002).

A DNC é considerada uma doença de distribuição mundial, com áreas onde é endêmica e áreas consideradas livres da doença. Esse vírus pode afetar mais de 230 espécies de aves que se encontram em, pelo menos, 27 ordens distintas (BRASIL, 2009). A susceptibilidade e o curso clínico da doença variam muito entre as espécies e dependem dos patótipos e do estado imunológico do hospedeiro. O período de incubação é de 5 a 6 dias e podem variar entre 2 a 15 dias, ou mais. (PAHO, 2003). O vírus da DNC tem afinidade por eritrócitos, o que permite sua distribuição rapidamente

por todo o organismo do hospedeiro (GERLACH, 1994b). Aves de todas as idades são suscetíveis. Os mais comuns reservatórios incluem aves de vida livre aquáticas da família Pittidae, outras da ordem Psittaciformes e alguns das ordens Passeriformes e Strigiformes (GERLACH, 1994b). O vírus da doença de Newcastle pode ser classificado em 5 patótipos, de acordo com seu grau de patogenicidade (BRASIL, 2009), denominados: (1) viscerotrópico e velogênico, também conhecido como “forma de Doyle”. Causa doença severa e fatal, com alta mortalidade em galinhas. Os sinais clínicos são apatia, diarreia esverdeada e lesões hemorrágicas, principalmente nos intestinos; (2) neurotrópico e velogênico ou “forma de Beach”. Provoca problemas respiratórios como espirros e corrimento nasal, inchamento da cabeça e face, fraqueza, torcicolo, paralisia de posteriores e tremores musculares. Mortalidade pode chegar a até 100% das aves; (3) mesogênico, ou “forma de Beaudette”. Patótipo menos patogênico que causa leves sinais respiratórios, queda de postura e eventualmente sinais nervosos. Mortalidade é baixa e mais comum em aves jovens; (4) lentogênico, ou “forma de Hittchner”. Comumente usadas como cepas vacinais. Podem causar sinais respiratórios brandos em aves jovens, dependendo da cepa vacinal utilizada e (5) entérico assintomático. Não é patogênico, também tem sido utilizado como cepa vacinal.

As vias de transmissão do vírus incluem trato respiratório e gastrintestinal, através do contato direto e indireto. A infecção pode ocorrer através da inalação ou ingestão, visto que o vírus está presente no ar exalado pelas aves, nas fezes e em toda parte da carcaça da ave durante a infecção aguda e na morte. A contaminação de outras aves pode ocorrer por meio de aerossóis e pela ingestão de água, ou comida contaminada (BRASIL, 2009). Embriões podem se infectar, se a casca do ovo estiver contaminada. A transmissão vertical ainda é controversa, uma vez que cepas virulentas normalmente impedem a postura. Já foi relatado a ocorrência de embriões infectados, porém normalmente ocorre a morte embrionária (ALEXANDER & SENNE, 2008). Vetores mecânicos também são importantes na transmissão da doença, como o vento, insetos, equipamentos e humanos. Aves de vida livre também podem contribuir com a disseminação da doença pois podem ser reservatórios do vírus. Considera-se que o reservatório original do vírus era uma espécie de ave silvestre do sudeste da Ásia, devido a uma série de surtos com alta mortalidade de galinhas domésticas, na Indonésia em 1926. A partir desse episódio, a relação do agente com o hospedeiro modificou. Hoje em dia, as galinhas são consideradas o principal agente reservatório do vírus, ao

menos nos patótipos menos virulentos que a forma viscerotrópica (PAHO, 2003; ALEXANDER & SENNE, 2008).

### **2.2.1 Doença de Newcastle em aves silvestres**

Os patótipos lentogênicos, mesogênicos e velogênicos produzem variados sinais clínicos em galinhas. Em outras aves, a sintomatologia varia amplamente, mesmo entre espécies do mesmo gênero. Algumas apresentações da doença são características, mas variam muito quanto a severidade do quadro (GERLACH, 1994b). Os sinais clínicos mais comuns em aves silvestres são: (a) morte súbita ou após algumas horas de depressão do estado geral; (b) doença gastrintestinal aguda; diarreia acompanhada de anorexia, letargia e cianose; (c) doença respiratória aguda; exsudato respiratório, estertor e dispneia; (d) doença gastrintestinal e respiratória aguda e (e) doença crônica do sistema nervoso central (SNC); opistótono, torcicolo, tremores e paralisia tônico-clônica dos membros. Aves afetadas normalmente apresentam petéquias na superfície de serosas, tecido adiposo e mucosa da laringe, traqueia e proventrículo. Enterite hemorrágica e necrosante, principalmente no jejuno, são comuns em cepas virulentas. Aves com sinais neurológicos podem não ter lesões macroscópicas (GERLACH, 1994b). Segundo Leighton & Heckert (2007), alterações da função renal também estão associadas às lesões da DNC.

As lesões histopatológicas são tão variáveis quanto os sinais clínicos. Lesões no SNC são geralmente caracterizadas por encefalite não supurativa com infiltrado vascular e perivascular de células mononucleares (LEIGHTON & HECKERT, 2007). Pode ocorrer aumento do número de células da glia e pseudoneuronofagia, quando as células da glia ficam na periferia do neurônio. As lesões histopatológicas raramente estão correlacionadas com a severidade dos sinais clínicos (GERLACH, 1994b). A doença de Newcastle já causou alta mortalidade em populações de vida livre de cormorão (*Phalacrocorax auritus*) e pomba comum (*Columba livia*), além de psitacídeos e outras espécies tropicais comuns no mercado internacional de aves de estimação. Somente essas duas epizootias foram documentadas em aves silvestres. Em pomba comum, inicialmente no Oriente Médio, África e Europa, na década de 1980 e cormorões, na América do Norte, na década de 1990. Em cormorões, a doença causou sinais clínicos e mortalidade somente em animais jovens. Os sinais clínicos característicos em ambas epizootias eram de disfunção do SNC associada com infecção



e inflamação do cérebro e medula espinhal. Posição anormal de pescoço e cabeça, dificuldade de se manter em estação, além de paralisia unilateral ou bilateral de patas e asas eram sinais comumente avistados nesses animais (LEIGHTON & HECKERT, 2007). Diversos outros sinais clínicos são evidenciados em aves silvestres. Em um estudo de 1971, com aves de rapina, 44 animais morreram da doença. Algumas delas recebiam, como parte da dieta, carcaças de frangos. Sinais como inapetência, diarreia, coriza e espasmos de cabeça estavam presentes. Diversos animais morreram subitamente (CHU et al, 1976). Diarreia severa também foi relatado por Choi et al (2008), em dois exemplares de mocho d'orelha europeia (*Otus scops*). Ambos os indivíduos se alimentavam de frango, como parte da dieta. Hemorragias em proventrículo e intestino foram visualizadas, durante a necropsia. Com exceção dos rins, nenhum outro órgão foi positivo para o vírus da DNC, nos testes de RT-PCR e inibição de hemaglutinação. Em 1991, um surto da DNC em aves de estimação afetou seis estados, na América do Norte. Diversas espécies de psitacídeos importados (papagaios e calopsitas) foram afetadas. Os sinais clínicos incluíam diarreia esverdeada, depressão, angústia respiratória, tremores e decúbito lateral. O surto afetou milhares de aves de estimação, mas não comprometeu a indústria de frangos comerciais (PANIGRAHY et al., 1993).

### **2.3 Vacinação em aves**

As medidas de biossegurança em granjas são fundamentais para o controle da doença de Newcastle, assim como de várias outras enfermidades. Quarentena, controle do trânsito de animais e pessoas, descontaminação de ambientes e vigilância constante são estratégias profiláticas utilizadas para conter a entrada e disseminação de patógenos. Aliadas a essas medidas, a vacinação é um dos instrumentos mais eficientes no controle da DNC (PAULILLO & JUNIOR, 2000). A vacinação rotineira contra a doença de Newcastle é facultativa nos estados brasileiros e deve ocorrer de acordo com a situação epidemiológica local (BRASIL, 2002). Em muitos países, incluindo o Brasil, a doença vem sendo controlada em plantéis comerciais através da vacinação. Os protocolos escolhidos dependem de diversos fatores, tais como incidência da doença em áreas próximas, status imunológico das aves do plantel, manejo sanitário e nutricional dos animais (BRASIL, 2002). O plano de vacinação deve se adequar às diferentes situações de desafio sanitário, além de ser específico para cada situação.

As vacinas proporcionam uma proteção contra a doença nas espécies aviárias para as quais foram formuladas, normalmente frangos e perus. Em outras espécies, a proteção não é garantida, nem totalmente conhecida. Existem no mercado vacinas vivas e vacinas inativadas, indicadas para utilização em situações diferentes e apresentam vantagens e desvantagens que devem ser ponderadas. Assim como existem vacinas produzidas com estirpes mais ou menos patogênicas e, obviamente, o nível da reação vacinal difere entre as estirpes, sendo isso fator fundamental na hora de escolher o protocolo. Usualmente a aplicação de vacinas com estirpes mais patogênicas produz maior resposta, porém aumenta também o risco de reações mais severas. Assim, para obter bom nível de proteção e minimizar o impacto sobre os animais, os programas geralmente se baseiam no uso sequencial progressivo de vacinas com vírus cada vez mais patogênico (FERNANDES, 2006). Em aves industriais, as vacinas inativadas são normalmente aplicadas após a imunização inicial com uma vacina viva.

As principais vacinas utilizadas atualmente contra a doença de Newcastle são as vivas lentogênicas e as inativadas. Dentre as vacinas vivas, as estirpes La Sota e HB1, ambas lentogênicas, são as mais empregadas, em programas de imunização. Estas vacinas resultam em altos títulos de IgA, IgG e IgM no soro de aves recém imunizadas e também são capazes de induzir resposta imunológica local, pois se replicam tanto no trato respiratório, quanto digestório (BRUCE et al., 2000). A estirpe HB1 induz a reações vacinais suaves, tendo sido usada extensivamente para vacinação em aves domésticas (BELL et al., 1990). Já a estirpe La Sota é mais virulenta e geralmente induz uma maior resposta imunológica (ALEXANDER; SENNE, 2008.), além de poder produzir reações moderadas não recomendadas para vacinações preliminares. As vias de vacinação incluem ocular, nasal, intramuscular, subcutânea, spray, através da água ou alimento. Segundo Schat (2001) aves vacinadas pelas vias ocular e nasal têm uma proteção mais eficaz, visto que promovem um maior estímulo de imunoglobulinas locais (IgA), associado ao efeito imunomodulador sistêmico.

Quanto à vacinação em outras aves domésticas e silvestres, há controvérsias. Há poucos estudos sobre a imunização, principalmente em aves silvestres, sendo a maioria dos protocolos baseados em frangos de produção. Sabe-se que as vacinas com adjuvante oleoso podem causar abscesso no local da aplicação, principalmente em aves de pequeno porte e, portanto devem ser usadas com cautela (GERLACH, 1994b). Em um estudo com 60 faisões coleira (*Phasianus colchicus*), a vacinação com diferentes cepas do vírus de Newcastle induziu uma moderada produção de anticorpos, sem nenhuma

reação clínica pós-imunização. Nesse estudo, foi utilizado o mesmo protocolo vacinal aplicado em galinhas de produção (SCHMIDT et al., 2008). Segundo Gerlach (1994b), como recomendação geral em um surto de DNC, a vacinação emergencial das aves silvestres deve ser feitas com vacinas HB1 ou La Sota apatogênicas, por via ocular ou nasal, na quantidade de cinco doses de frangos por ave. De acordo com Facon et al. (2005), após estudo com 180 aves da espécie *Chlamydotis undulata undulata*, a vacina inativada induziu maior resposta sorológica, quando comparada a outras duas vacinas vivas (HB1 e Clone 30). Nesse relato, não foi observado nenhuma mudança de comportamento, ganho de peso, ou ingestão de alimento nos animais tratados. Dois animais apresentaram pequeno eritema no local da aplicação, após uso da vacina inativada por via subcutânea. Segundo os autores, a vacina inativada induziu maior e mais prolongada resposta de anticorpos, independente do prévio estado imunológico.

#### **2.4 Técnica de ELISA**

A técnica de ELISA (Ensaio Imunoadsorvente Ligado a Enzima) tem sido amplamente utilizada como técnica sorológica de escolha para monitoramentos e estudos de soroprevalência da doença de Newcastle, principalmente devido à possibilidade de automação e à disponibilidade de kits comerciais padronizados. Entretanto, com as vacinas utilizadas atualmente, é impossível diferenciar aves infectadas de aves vacinadas (YUSOFF; TAN, 2001). O teste de ELISA consiste em um ensaio imunoenzimático que permite medidas quantitativas diretas da interação antígeno-anticorpo, através da medida de atividade enzimática sobre um substrato (REIS, 1998). Este ensaio imunoenzimático é do tipo heterogêneo, necessitando de uma etapa de lavagem para separar as substâncias reagentes marcadas que estão livres das marcadas que se ligaram ao anticorpo (REIS, 1998). Existem diversos modelos de testes de ELISA, o indireto tem metodologia mais simples e normalmente utilizada nos kits comerciais. Normalmente, um antígeno aderido a um suporte sólido (placa de ELISA) é preparado; a seguir, coloca-se sobre este os soros em teste, na busca de anticorpos contra o antígeno. Se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá ligação antígeno-anticorpo. Essa ligação é posteriormente detectada pela adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar os anticorpos, a qual é ligada a uma enzima. Este anticorpo ligado à enzima denomina-se conjugado. A enzima reage com o substrato incolor adicionado ao sistema, gerando um produto de

reação colorido, monitorado por espectrofotômetro. No teste ELISA, as enzimas mais utilizadas são as peroxidases, a fosfatase alcalina e a beta-galactosidade. Antes da medida da intensidade da coloração, adiciona-se uma solução alcalina ou ácida que interrompe a reação enzimática e estabiliza a coloração para a realização da leitura em espectrofotômetro. A técnica de ELISA apresenta rapidez, baixo custo e adaptação a diferentes graus de automação, além de objetividade na leitura, elevada sensibilidade e especificidade (REIS, 1998; VAZ, 2007).

## **2.5 Espécies estudadas**

A ordem Galliformes inclui 61 gêneros e 215 espécies. Esta inclui faisão de coleira, perdiz Chucar e a galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*). São aves onívoras e que possuem dieta diversificada, a qual inclui frutos, sementes, brotos e invertebrados (MARQUES, 2014). Algumas espécies tem grande importância como dispersores de sementes e na exploração comercial. Nesse trabalho, foram estudadas duas espécies de galiformes: perdiz Chucar (*Alectoris chukar*) e faisão coleira (*Phasianus colchicus*), ambas pertencentes à família Phasianidae e de origem asiática (IUCN, 2012a). Entretanto têm distribuição mundial, devido a sua utilização como aves de caça e ornamental. Machos e fêmeas de perdiz Chucar apresentam padrão de plumagem semelhante e seu peso varia em torno de 500 gramas. O faisão coleira possui dimorfismo sexual evidente, sendo a fêmea de tamanho menor (cerca de 1 kg) e coloração parda. O macho possui penas coloridas e brilhantes e pode chegar a 1,5 kg.

A ordem Psittaciformes é constituída por duas famílias, Psittacidae e Cacatuidae, possuindo cerca de 380 espécies conhecidas. Essas aves têm distribuição mundial, predominando nos trópicos e o Brasil é o país com maior diversidade de psitacídeos. São aves, extremamente, populares por sua capacidade social, inteligência, coloração exuberante e capacidade de imitar sons. Essas características fazem com que sejam muito procuradas como animais de estimação. O comércio ilegal desses animais, associado à fragmentação e destruição de seus habitats contribuem para que diversas espécies estejam ameaçadas de extinção (GRESPLAN & RASO, 2014). Nesse trabalho, foram estudadas três espécies de psitacídeos, calopsita (*Nymphicus hollandicus*), Lóris (*Trichoglossus haematodus moluccanos*) e a Rosela (*Platycercus eximius*). Ambas as espécies têm origem na Oceania, porém são encontradas ao redor do mundo, mantidas como aves de estimação (IUCN, 2012b). As calopsitas pesam entre 80 e 100 gramas,

têm dieta granívora e generalista, baseada em sementes, brotos, frutas, insetos e outros vegetais. As roselas possuem alimentação semelhante e peso corpóreo variável entre 90 e 120 gramas. Os Lóris são animais nectarívoros e sua dieta pode conter pólen, néctar, frutas e flores, além de insetos e suas larvas. Essas aves possuem a língua alongada e a extremidade modificada em forma de cerdas para coletar pólen e néctar (GRESPLAN & RASO, 2014). São pouco maiores que as roselas e pesam entre 100 e 250 gramas.

A ordem Musophagiformes é composta por 23 espécies de turacos que são endêmicos da África sub-sahariana. Essas aves possuem asas curtas e arredondadas, e pouca habilidade de voo; entretanto pulam agilmente entre os galhos de árvores. São aves dispersoras de sementes, devido ao seu hábito alimentar basicamente frugívoro (SUN & MOERMOND, 1997). Habitam savanas e florestas abertas, onde encontram sua dieta que consiste de frutos, flores e pequenos invertebrados. Há poucos estudos sobre essa ordem de aves, as quais têm crescentes taxas de comercialização, como aves ornamentais e de estimação. Esse estudo avaliou a resposta de três espécies diferentes, turaco persa (*Tauraco persa*), turaco bochecha branca (*Tauraco leucotis*) e turaco violeta (*Musophaga violacea*). Essas espécies não apresentam dimorfismo sexual e têm peso variável, entre 200 e 300 gramas.

### 3. Artigo para envio à Pesquisa Veterinária Brasileira

## Newcastle disease vaccination in captive-bred wild birds<sup>3</sup>

Caroline W.C. Gomes<sup>4</sup>, Jacqueline Meyer<sup>2</sup>, Michelen O. Gonçalves<sup>2</sup>, Gustavo Fünckler<sup>5</sup>, Inês Andretta<sup>6</sup> e Cláudio E.F. Cruz<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Gomes C., Meyer J., Gonçalves M., Fünckler G., Andretta I. & Cruz C.E.F. **Newcastle disease vaccination in captive-bred wild birds.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):0-0. Departamento de Patologia Clínica veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: [claudio.cruz@ufrgs.br](mailto:claudio.cruz@ufrgs.br).

The breeding of wild birds in captivity assumes an increasingly important role in conservation due to the loss of species and their habitats. Meeting the environmental and nutritional needs of species kept in captivity is the primary basis for achieving adequate levels of efficiency in such projects. Among the flock health practices, we highlight here wild bird vaccination, a scarcely studied subject. This study clinically and serologically evaluates the effect of applying a vaccination protocol against Newcastle disease in four groups of ornamental wild birds. The responses observed in 10 ornamental chickens were compared to those recorded in 12 ring-neck pheasants (*Phasianus colchicus*), 7 Chukar partridges (*Allectoris chukar*), 6 psittacines (2 cockatiels *Nymphicus hollandicus*, 2 lorikeets *Trichoglossus haematodus molucanos* and 2 eastern rosellas *Platycercus eximius*) and 6 touracos (2 Guinea *Tauraco persa*, 2 White-cheeked *Tauraco leucotis* and 2 Violet *Musophaga violacea*). One drop of each live Newcastle HB1 and La Sota vaccines were ocularly instilled on the 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> experimental days, respectively. On the 112<sup>th</sup> day, one shot of an inactivated oily Newcastle vaccine was intramuscularly injected. Serum samples were submitted to the Newcastle disease virus antibody Test Kit ELISA-BioChek. Sudden and transient clinical changes were only observed in two birds after the IM shot. Except for the psittacines, other bird species showed considerable increase in the antibody titers. However, their mean antibody titers differed significantly from that record in the chickens. The protective effect of the immunological responses observed here remains to be determined. The need of further studies in the subject is emphasized.

INDEX TERMS: bird management and conservation, ornamental wild birds, Newcastle, vaccination protocol.

**RESUMO.- [Vacinação contra doença de Newcastle em aves silvestres criadas em cativeiro.]** A criação de aves silvestres em cativeiro assume importância em conservação devido à perda de espécies e habitats. O atendimento das necessidades nutricionais e ambientais das espécies mantidas em cativeiro é primordial para a obtenção de níveis adequados de eficiência. Entre as práticas sanitárias aplicáveis nos plantéis, destaca-se aqui a vacinação de aves silvestres, assunto raramente divulgado. O estudo avalia clínica e sorologicamente o efeito da aplicação de um protocolo de vacinação contra a doença de Newcastle, em quatro grupos de aves silvestres ornamentais. As respostas sorológicas observadas em 10 galinhas ornamentais foram comparadas àquelas registradas em 12 faisões coleira (*Phasianus colchicus*), 7 perdizes Chucar (*Allectoris chukar*), 6 psitacídeos (2 Calopsitas *Nymphicus hollandicus*, 2 Lóris *Trichoglossus haematodus molucanos* e 2 Roselas *Platycercus eximius*) e 6 Turacos (2 Persas *Tauraco persa*, 2 Bochecha-branca *Tauraco leucotis* e 2 Violetas *Musophaga violacea*). Instilou-se uma gota das vacinas vivas contra Newcastle HB1 e La Sota, no 1<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias do experimento, respectivamente. No 112<sup>o</sup> dia, as aves foram vacinadas com uma vacina inativada oleosa contra Newcastle, via intramuscular. As amostras foram submetidas ao teste *Newcastle disease virus antibody Test Kit ELISA-BioChek*. Alterações clínicas repentinas e transitórias foram observadas em duas aves apenas após a injeção intramuscular. Exceto pelos psitacídeos, todas as demais aves

<sup>3</sup> Received on...

Accepted for publication on...

<sup>4</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves, 9090, Porto Alegre, Brazil. E-mail corresponding author: [claudio.cruz@ufrgs.br](mailto:claudio.cruz@ufrgs.br)

<sup>5</sup> Laboratório Porto Belo, Rua Conselheiro Xavier da Costa, nº2190 Ipanema 91760-260, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>6</sup> Laboratório de Estudos Zootécnicos, Faculdade de Agronomia, Av. Bento Gonçalves, 7712. UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil.

mostraram consideráveis aumentos nos títulos de anticorpos; entretanto, as médias desses títulos diferiram significativamente daquelas registradas nas galinhas. Nenhuma resposta foi identificada em qualquer psitacídeo do estudo, provavelmente porque o conjugado de galinha não identifica anticorpos nesse grupo de aves. A capacidade protetora das respostas imunológicas observadas permanece desconhecida. Enfatiza-se a necessidade de continuidade, nesses estudos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Aves silvestres ornamentais, manejo e conservação de aves, doença de Newcastle, protocolo de vacinação.

## INTRODUCTION

Newcastle disease (NC) is among the most important diseases of birds worldwide (Thomas et al. 2007) and numerous bird species are susceptible (Kaleta & Baldauf 1988). Despite the tremendous worldwide increase in the captive populations of wild birds and considering that vaccination is a basic tool in sanitary programs in most animal production systems, the application of vaccine protocols in captive breeding of most species of wild birds has rarely been reported. The available information is associated with vaccination of galliform (Schmidt et al. 2008) or individual endangered species (Facon et al. 2005). However, the risks and the impact of NC outbreaks in flocks of both commercial and conservational aviculture are sufficient justification for also developing vaccination programs in captive-breed wild bird flocks, which is currently a rapidly developing aviculture sector. Moreover, although controversial (Martínez et al. 2003), the serological tests used for monitoring vaccine efficacy in birds have been indicated as a major limitation in these processes (Stöbel et al. 2002, Ferreira et al. 2013). Information on the titers responses after a NC vaccination protocol in four groups of captive-bred wild birds is the main objective of the paper.

## MATERIALS AND METHODS

### General information

The study was conducted in a commercial breeding flock of ornamental exotic captive-bred wild birds. The farm is located in southern Brazil and has a flock of 200 birds, most of which are kept in enclosures (Figure 1A) with an average space per bird of 5 m<sup>3</sup>. Most of the birds have been born in an incubator, raised in a heated environment and fed commercial ration, fruits (Figure 1B), and mealworms. Except for the chickens (2 Appezeler, 7 Sebright and 1 Belgian), the birds were allocated in 4 groups: (a) ring-neck pheasants (*Phasianus colchicus*); (b) Chukar partridge (*Allectoris chukar*); (c) psittacines (2 cockatiel *Nymphicus hollandicus*, 2 lorikeets *Trichoglossus haematodus molucanos* and 2 eastern rosellas *Platycercus eximius*)

and (d) touracos (2 Guinea *Tauraco persa* (Figure 2A), 2 White-cheeked *Tauraco leucotis* and 2 Violet *Musophaga violacea*). The birds were captured inside their enclosures with bird catching net and then transferred in transport boxes to a safe room. Vaccinations were performed as shown in Table 1. Birds were observed twice daily for behavioral and postural abnormalities. The study was approved by the Ethics Committee of Animal Use – UFRGS.

### **Samples, serology and vaccination**

Blood samples were collected by jugular puncturing (Figure 2B) on days 1, 21, 43 and 112, with disposable (1 by bird) insulin syringes attached to 13.7 x 33 mm needles. Syringes of the same type were used for injecting intramuscular NC vaccine. On average, 0.5 ml of blood that produced 0.2 ml of serum was collected from each bird. Live NC vaccines (HB1 and La Sota) were ocularly instilled one drop per bird (Figure 3). Inactivated NC parenteral vaccine was administered according to the weight of each bird (0.25 mL per 1kg). The Newcastle disease virus antibody Test Kit ELISA procedures were performed according to directions for BioChek poultry immunoassays.

### **Statistical analysis**

The NC antibody data were submitted to variance analysis using Minitab 16 (Minitab Statistical Software, Minitab Inc., State College, PA, USA). Predetermined contrasts were used to compare the NC antibody titers for the ornamental species to that of the chickens. Effects were considered significant when contrast probabilities were below 0.05.

## **RESULTS**

Except for sudden and temporary sings in one ring-neck pheasant (loss of balance) and one Guinea touraco (dull and half-closed eyes, blepharoptosis), which occurred after the intramuscular shot, no further clinical signs that could be associated with the vaccines were observed. However, such changes couldn't also be associated with vaccination. Table 2 compares the average antibody titers among the bird groups and Table 3 presents the ELISA results. While the initial flock included 12 birds, most of the Chukar partridges died due to an outbreak of *Histomonas meleagridis* infection.



## DISCUSSION

Birds are the most widely captive-bred wild animals (Santos 1992). For several reasons, humans have kept captive-bred wild birds for thousands of years (Karsten 1997). While conservation of endangered species is among one of the most justifiable purposes (Collar et al. 2012), each case should be thoroughly evaluated and additional conservation alternatives must be considered (Snyder et al. 1996). Whatever the reason for keeping birds in captivity, adequate avian management and welfare must be guaranteed (Karsten 1997; Ernest et al. 2007). Providing correct nutrition and the proper environment are priorities and irreplaceable factors in these as in other animal systems. However, an adequate sanitary program ranks third in this scenario and may encompass numerous practices, among which vaccination should certainly be considered. Nevertheless, there is very little information available on the subject (Ostrowski et al. 1998, Facon et al. 2005, Ferreira et al. 2013).

The impact of Newcastle disease is most notable in domestic poultry due to their high susceptibility and the consequences of severe outbreaks on the poultry industry (Alexander & Senne, 2008), meanwhile the risks associated with transmission between flocks and losses due to outbreaks of the disease (Kaleta & Baldauf 1988, Glasser et al. 1992, Ibu et al. 2009) justify the application of vaccine protocols also in captive flocks of species of wild birds, especially those with threatened populations (Facon & Lacroix 2005). All the captive-bred wild birds included in this study are considered species of least concern by IUCN (2015), which means these birds are widespread and abundant in nature. However, the captive populations of some of them in Brazil are very limited, as are most of the exotic bird species present in the country today. Moreover, some of the species included in the study have close relatives among the endangered categories. Edwards's Pheasant (*Lophura edwardsi*) is an example that is critically endangered in its occurrence area, the Vietnam forests. Unlike many other species that have already disappeared from the country's poultry farms, Edwards's Pheasant is still present in Brazil and, though not a native species, it should be managed with care and responsibility as in an effort to avoid extinction. Since propagation and release could subsequently be conducted. A number of measures must be implemented to ensure achievement of that objective (Karsten 2007), and certainly vaccination against major avian diseases should be one of them. The unrestricted trade of the ornamental wild birds within Brazil is an additional motivation for maintaining investigations into the applicability of vaccination protocols.

In this study, we compared immunological responses recorded in chicken, the species for which both the vaccines and the ELISA test were designed to, with antibody titers observed in the other species. While severe side effects after Newcastle vaccination are usually rare, some mild reactions have been reported after injectable vaccination (Facon et al. 2005, Schmidt et al. 2008). B1 and La Sota are lentogenic strains usually associated with mild signs (FAO 2015). Possible adverse reactions to vaccines together with high value of bird species have traditionally deterred owners from vaccinating their flocks. The results presented here constitute counter arguments to that belief. Except for the psittacines, in which no antibody response was observed, most of the birds in the study showed considerable increases in their antibody titers after vaccination. However, their mean antibody titers differed significantly from that record in the chickens. Apparently, the closer the relationship of the bird group to chickens, the higher the mean antibody titers recorded. Similar results in Ring-neck pheasants have been previously reported (Schmidt et al. 2008). Since they also belong to Galliform family, the Chukar partridge could have exhibited similar a response, but disease and mortality greatly impaired the results in the group. In this sense, our findings could also benefit the National Action Plan of Action for the Conservation of the Galliform species threatened with extinction (Silveira et al. 2008), since it includes the management of captive populations.

The protective effect of the immunological responses observed here remains to be identified and any association between our findings and disease protection could be premature. However, evidence to the contrary has been reported. Newcastle transmission studies in poultry indicate that vaccinated birds with low or undetectable antibody titers may be protected against disease and mortality, but that infection and transmission may still occur (Boven et al. 2008, Kapczynski & King, 2005). In contrast to what was expected (Mazengia et al. 2009), in most birds, antibody titers diminished after the booster vaccine, returning to their maximum post-vaccination level. Speculations associated with this finding could include problems with the vaccine vial or vaccine viability. In contrast with previous observations (Martínez et al. 2003), the low immune responses in psittacine seen in this study is probably associated with the incapacity of the antichickens antibody to identify antibodies in this group of birds. There is a need for further studies into the subject.

**Acknowledgements.-** The authors are grateful to the owners of *Rincão Aves Ornamentais* for allowing us to conduct this study on their birds.

## REFERENCES

- Alexander, D.J.; Senne, D.A. 2008. Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus infections. In: Saif, Y.M.; Fadly, A.M.; Glisson, J.R.; McDougald, L.R.; Nolan, L.K.; Swayne, D.E (Eds). Diseases of poultry. 12th ed, Iowa: Blackwell Publishing, p 75 - 100.
- Boven M., Bouma A., Fabri T.H.F., Katsma E., Hartog L. & Koch G. 2008. Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathol.* 37(1):1-5.
- Collar N.J., Gardner L., Jeggo D.F., Marcondes B., Owen A., Pagel T., Pes T., Vaidl A., Wilkinson R. & Wirth R. 2012. Conservation breeding and the most threatened birds in Asia. *BirdingAsia* 18:50–57.
- Ernest R.A., Woodard A.E. & Vohra P. 2007. Raising game birds. Adobe PDF Library. Publication 8155. University of California. Available in <http://anrcatalog.ucdavis.edu>. Accessed in 15 December 2015.
- FAO. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Newcastle disease vaccines: an overview. Corporate document repository. Available in [www.fao.org/docrep](http://www.fao.org/docrep). Accessed in 10 December 2015.
- Facon C., Guerin J-L. & Lacroix F. 2005. Assessment of New Castle disease vaccination of houbara bustard breeders (*Chlamydotis undulata undulata*). *J. Zoo Wildl. Med.* 41(4): 768-744.
- Ferreira P.R.B., Laranjeira D.F., Oliveira L.S., Malta M.C.C., Gomes M.C., Bastos B.L., Portela R.W. & Barrouin-Melo S.M. 2013. Teste de ELISA indireto para diagnóstico sorológico de leishmaniose visceral em canídeos silvestres. *Pesq. Vet Bras.* 33(4):528-534.
- Glasser L.C., Barker I.K., Weseloh C., Ludwig J., Windingstad R.M., Key D.K. & Bollinger T.K. 1992. The 1992 epizootic of Newcastle disease in Double-crested cormorants in North America. *J. Wildl. Dis* 35(2):319-330.
- Ibu O.J., Okoye J.O.A., Adulugba E.P., Chah K.F., Shoyinka S.V.O., Salihu E., Chukwuedo A.A. & Baba S.S. 2009. Prevalence of Newcastle disease viruses in wild and captive birds in Central Nigeria. *Int. J. Poultry Sci.* 8(6):574-578.
- IUCN. 2015. International Union for Conservation of Nature. Available at [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org), accessed 10<sup>th</sup> December 2015.
- Kaleta E.F. & Baldauf C. 1988. Newcastle disease in free-living pet birds. In: Alexander DJ. (Ed.), Newcastle disease. Kluwer Academic. Boston, pp.197-246.
- Kapczynski D.R. & King D.J. 2005. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine* 23: 3424-3433.
- Karsten P. 2007. Pekin Robin and small softbills: Management and Breeding. Hancock House Publishers Ltd., Surrey.
- 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. *Func. Ecol.* 17(5):700-706.

- Mazengia H., Gelaye E. & Nega M. 2009. Evaluation of Newcastle disease antibody level after diferente vaccination regimes in three districts of Amhara Region, Northwestern Ethiopia. *J Inf. Dis. Immun.* 1(2):16-19.
- Ostrowski S., Saint-Jalme M. & Ancrenaz M. 1998. Antibody response to New Castle vaccination in a flock of young houbara bustard (*Chlamydotis undulata*). *J. Zoo Wildl. Med.* 29(2): 234-236
- Santos E. (1992). *Pássaros do Brasil*. 6<sup>a</sup> edn, Villa Rica, Belo Horizonte. 312p.
- Schmidt E., Pulillo A., Caron L., Filho T., Agustini M., Ventura H. & Junior L. 2008. Clinical and immunological parameters of New Castle disease vaccination in juvenile ring-necked pheasants (*Phaisanus colchicus*). *Int. J. Poultry Sci.*7(3):283-284.
- Silveira L.F., Soares E.S. & Bianchi C.A. 2008. Plano de ação nacional para conservação dos Galliformes ameaçados de extinção. ICMBio MMA, Brasília. 90p.
- Snyder N., Derrickson S., Beissinger S., Wiley J., Smith T., Toone W. & Miller B. 1996. Limitations of captive breeding in endangered species recovery. *Conserv. Biol.* 10(2):338–348.
- Stöbel K., Schönberg A. & Staak C. 2002. A new non-species dependent ELISA for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* s. I in zoo animals. *Int. J. Med. Microbiol.* 33: 88-99.
- Thomas N.J., Hunter D.B. & Atkinson C.T. 2007. *Infectious Disease of Wild Birds*. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom. 484p.



**Figure 1.** Violet touraco in a planted aviary (A). Chopped fruit and vegetables mixture, a typical touraco diet (B).



**Figure 2.** A Guinea touraco restrained for blood sampling (A). Jugular puncturing for blood collection in a White-cheeked touraco (B).



**Figure 3.** Ocular instillation of a live NC vaccine in Sebright chicken (A). Note the bluish eye of a Cockatiel just after ocular vaccination. The blue color is due to the vaccine diluent dye (B).

**Table 1. Newcastle vaccination protocol applied to the groups of birds.**

<i>Bird species</i>	<i>N<sup>o</sup> of birds</i>	<i>1<sup>st</sup> day</i>	<i>21<sup>st</sup> day</i>	<i>112<sup>th</sup> day</i>
Chicken	10	Ocular	Ocular	Intramuscular
Ring-neck pheasant	12	Instillation	Instillation	dose of a
Chukar partridge	7	of a live	of a live	inactivated
Psittacines	06	HB1 NC	la sota NC	NC
Turacos	06	vaccine	vaccine	vaccine
Doses		1 drop	1 drop	*

\* Based on the bird's weight, 0.25 mL/kg.

**Table 2. Mean NC antibody titers for the ornamental wild species compared to that of the chickens.**

<i>Bird species</i>	<i>1<sup>st</sup> day</i>	<i>21<sup>th</sup> day</i>	<i>43<sup>th</sup> day</i>	<i>112<sup>th</sup> day</i>
Chicken	195.60	5528.20	2876.80	5151.30
Pheasants	165.33	5202.25	884.25*	1811.25*
Chukar partridge	93.86*	1262.71*	248.60*	1239.67*
Psittacines	1.00*	9.50*	130.00*	-
Turacos	59.50*	954.67*	687.50*	841.50*
<b>Probability</b>	0.017	<0.001	<0.001	<0.001
<b>R<sup>2</sup></b>	28.96	81.73	60.3	55.51

\* Means followed by asterisks differ significantly (P<0.05) from the mean for the chickens in the contrast comparison test.

**Table 3. Newcastle disease virus antibody Test Kit ELISA-BioChek in ornamental birds.**

<i>Chicken</i>	<i>1<sup>st</sup> day</i>		<i>21<sup>st</sup> day</i>		<i>43<sup>th</sup> day</i>		<i>112<sup>th</sup> day</i>	
	AB Titer	Result	AB Titer	Result	AB Titer	Result	AB Titer	Result
1	252		3192	+	1267	+	6917	+
2	119		4821	+	2295	+	3556	+
3	162		3530	+	2637	+	2397	+
4	89		7040	+	1838	+	4209	+
5	334		8513	+	4724	+	9202	+
6	308		6351	+	5743	+	272	+
7	258		7788	+	2690	+	9245	+
8	123		4795	+	1624	+	4649	+
9	136		4401	+	4925	+	5967	+
10	175		4851	+	1025	+	5099	+
<b><i>Pheasant</i></b>								
1	17	-	5702	+	595	+	2301	+
2	26	-	6255	+	521	+	1192	+
3	215	-	7275	+	829	+	1566	+
4	149	-	4609	+	1660	+	1685	+
5	175	-	5891	+	835	+	1682	+
6	275	-	5235	+	1096	+	1699	+
7	60	-	4258	+	919	+	1626	+
8	265	-	4573	+	677	+	2507	+
9	10	-	2791	+	1419	+	1172	+
10	421	-	4878	+	954	+	1828	+
11	248	-	4940	+	691	+	1265	+
12	123	-	6020	+	415	+	3212	+
<b><i>Partridge</i></b>								
1	1	-	1010	-	#			
2	89	-	1904	+	#			
3	3	-	1689	+	242	-	#	
4	20	-	904	-	192	-	#	
5	526	-	954	-	337	-	487	-
6	1	-	1189	+	236	-	1348	+
7	17	-	1189	+	236	-	1884	+
<b><i>Psittacine</i></b>								
1	1	-	23	-	125	-		
2	1	-	1	-	9	-		
3	1	-	1	-	261	-		
4	1	-	1	-	137	-		
5	1	-	1	-	0	-		
6	1	-	30	-	248	-		
<b><i>Touracos</i></b>								
1	0	-	1	-	254	-	599	-
2	217	-	136	-	1676	+	1215	+
3	0	-	1172	+	568	+	765	-
4	0	-	2689	+	815	+	1179	+
5	112	-	858	-	429	+	861	-
6	28	-	872	-	383	-	430	-

# Death of birds; Psittacines: Cockatiel (1 and 2), Lorikeets (3 and 4), Rosellas (5 and 6); Touracos: Guinea (1 and 2), White-cheeked (3 and 4), Violet (5 and 6).



#### 4. CONCLUSÕES

- a) A maior parte das aves silvestres vacinadas não apresentou reações clínicas indesejáveis.
- b) A maior parte das aves silvestres vacinadas respondeu às vacinações, ainda que de forma significativamente diferente do que as galinhas.
- c) Ainda que seja desconhecido o efeito protetor dessa vacinação nessas aves, há evidências sugestivas da probabilidade de que ocorra proteção contra doença e morte determinadas pelo vírus da doença de Newcastle.
- d) Há necessidade de continuidade em estudos associados com produção de conjugados espécie específicos, adaptações de doses/respostas e determinação de proteção efetiva.

## REFERÊNCIAS

- ABCA. Associação Brasileira dos Criadores de Aves. 2012. Disponível em [www.abcaves.com](http://www.abcaves.com), acessado em julho de 2012.
- ABRASE. Associação Brasileira dos Criadores e Comerciantes de Animais Silvestres e Exóticos. 2012. Disponível em [www.abrase.com.br](http://www.abrase.com.br), acessado em junho de 2012.
- ALEXANDER, D. J.; SENNE, D. A. Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E (Eds). Diseases of poultry. 12th ed, Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p 75 - 100.
- ANDERSEN, A. A.; VANROMPAY, D. Avian chlamydiosis. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties. 2000. 19: 396-404.
- ANDRIOLO, A. Desafios para a conservação da fauna. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds) Tratado de animais selvagens – medicina veterinária. Editora Roca. 2006. 19-25.
- BELL, J. G., AILT BELARBI, D., AMARA, A. A controlled vaccination trial for Newcastle disease virus in village chicken flocks. Preventive Veterinary Medicine, 1990. V. 9, p. 205 - 300.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa SDA nº 32, de 13 de maio de 2002. Diário Oficial da União, nº91, seção 1, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Plano de contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle. Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Saúde Animal, Coordenação Geral de Combate às Doenças, Coordenação de Sanidade Avícola. Julho, 2009.
- BRUCE, S. S; KING, D. J.; SELLERS, H. S. The avian response to Newcastle disease virus. Developmental & Comparative Immunology, 2000. V. 24, p.257-268.
- CATÃO-DIAS, J. L. Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade. Ciência e Cultura. 2003. 55: 32-34.
- CHOI, K.; LEE, E.; JEON, W.; NAH, J.; KIM, Y.; LEE, M.; LEE, H.; KWON, J. Isolation of a recent Korean epizootic strain of Newcastle disease virus from Eurasian Scops Owls affected with severe diarrhea. Journal of Wildlife Diseases, 2008. 44(1):193 - 198.
- CHU, H. P.; TROW, E. W.; GREENWOOD, A. G.; JENNINGS, A. R.; KEYMER, I. F. Isolation of Newcastle disease virus from birds of prey. Avian Pathology, 1976. 5:3, 227-233.
- CRUZ, C. E. F; OLIVEIRA, L. G. S; BOABAID, F.; ZIMERMANN, F.C.; STEIN, G.; MARKS, F.; CERVA, C.; LIEBERKNECHT, C.; CANAL, C.; DRIEMEIER, D. Management, breeding, and health records from a captive colony of pekin robins (*Leiothrix lutea*), 2001-2010. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2011. 42: 451-459.

- CUBAS, Z. S. Special challenges of maintaining wild animals in captivity in South America. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties. 1996. 115: 267-287.
- DAVISON, F. The importance of the avian immune system and its unique features. In: SCHAT, K. A.; KASPERS, B.; KAISER, P. Avian Immunology. Elsevier, 2 ed., 2014. p 1 - 9.
- EFE, M. A.; MARTINS-FERREIRA, C.; OLMOS, F.; MOHR, L. V.; SILVEIRA, L. F. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Ornitologia para a destinação de aves silvestres provenientes do tráfico e cativo. Revista Brasileira de Ornitologia, 2006. 14: 67-72.
- FACON, C.; GUERIN, J.; LACROIX, F. Assessment of newcastle disease vaccination of houbara bustard breeders (*Chlamydotis undulata undulata*). Journal of Wildlife Diseases, 41(4), 2005, pp. 768–774.
- FELLAH, J. S.; JAFFREDO, T.; NAGY, N.; DUNON, D. Development of the avian immune system. In: SCHAT, K. A.; KASPERS, B.; KAISER, P. Avian Immunology. Elsevier, 2 ed., 2014. p 45 - 63.
- FERNANDES, L. M. B. Doença de newcastle: padronização de testes sorológicos para o diagnóstico em avestruzes (*Struthio camelus*) e avaliação soroepidemiológica nos estados da Bahia e de São Paulo. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em imunologia. Salvador – Bahia, 2006.
- GERLACH, H. Defense mechanisms of the avian host. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. Avian medicine: principles and application. Lake Worth, Florida. Wingers Publishing, Inc, 1994. Cap 5, p 109 - 120 (a).
- GERLACH, H. Viruses. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. Avian medicine: principles and application. Lake Worth, Florida. Wingers Publishing, Inc, 1994. Cap 32, p 862 - 948 (b).
- GERTNERA, L. R. S.; SANTINB, E.; SAADC, M. B. Influência da fumonisina sobre a resposta imunológica de aves: revisão bibliográfica. Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba, v. 6, n. 3, jul/set 2008. p 401 - 411.
- GHARAIBEH, S.; MAHMOUD, K. Decay of maternal antibodies in broiler chickens. Poultry Science Association Inc, 2013. V. 92, n. 9, p; 2333-2336.
- GODOY, S. N.; MATUSHIMA, E. R. A survey of diseases in passeriform birds obtained from illegal wildlife trade in São Paulo city, Brazil. Journal of Avian Medicine and Surgery. 2010. 24: 199-209.
- GRESPLAN, A.; RASO, T. F. Psittaciformes (araras, papagaios, periquitos, calopsitas e cacatuas). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds) Tratado de animais selvagens – medicina veterinária. 2 ed. São Paulo: Roca, 2014. 550- 589.
- IUCN. BirdLife International. Alectoris chukar. The IUCN Red List of Threatened Species 2012 (a): e.T22678691A38499355. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012-1.RLTS.T22678691A38499355.en>. Acessado em 10 de abril de 2016.

- IUCN. Birdlife International. *Nymphicus hollandicus*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2012 (b): e.T22684828A38988723. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012-1.RLTS.T22684828A38988723.en>. Acessado em 10 de abril de 2016.
- KARSTEN, P. Pekin robins and small softbills: management and breeding. Hancock House Publishers Ltd., Surrey, Canada, 2007.
- LEIGHTON, F. A.; HECKERT, R. A. Newcastle disease and related avian paramyxoviruses. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, B.; ATKINSON, C. T. *Infectious diseases of wild birds*. Blackwell Publishing, 2007.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/sanidade-animal>
- MARINI, M. A.; GARCIA, F. I. Bird Conservation in Brazil. *Conservation Biology*, 2005. 19: 665-671.
- MARINI, M. A.; MARINHO FILHO, J. S. Translocação de aves e mamíferos: teoria e prática no Brasil. In: ROCHA, C. F. D.; BERGALO, H. G.; SLUYS, M. V.; ALVES, M. S. (eds). *Biologia da conservação: essências*. Ed. Rima, São Carlos-SP, 2006. 582p.
- MARKS, F. S.; RODENBUSCH, C. R.; OKINO, C. H.; HEIN, H. E.; COSTA, E. F.; MACHADO, G.; CANAL, C. W.; BRENTANO, L.; CORBELLINI, L. G. Targeted survey of New Castle disease virus in backyard poultry flocks located in wintering site for migratory birds from Southern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. 2014. 116: 197-202.
- MARQUES, M. V. R. Galliformes (aracuaã, jacu, jacutinga, mutum e uru). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds) *Tratado de animais selvagens – medicina veterinária*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2014. 354- 383.
- MERGULHÃO, M. C.; TRIVELATO, S. L. F. Interação homem-animal – um constante aprendizado para uma relação de respeito. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds) *Tratado de animais selvagens – medicina veterinária*. Editora Roca, 2006. 15-18.
- MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. *Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte*. Jaboticabal: FUNEP, 2002. p. 231-245.
- PAHO. Pan American Health Organization. *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: chlamydioses, rickettsioses, and viroses*. 3 ed. Washington, D.C., 2003.
- PANIGRAHY, B.; SENNE, D. A.; PEARSON, J. E.; MIXSON, M. A.; CASSIDY, D. R. Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds in 1991. *Avian Diseases*, 1993. Vol. 37, No. 1, p. 254-258.
- PAULILLO, A. C.; JUNIOR, L. D. Doença de Newcastle. In: JUNIOR, A. B.; MACARI, M. *Doença das Aves*. São Paulo: FACTA, 2000. p.267- 281.
- QURESHI, M. A.; HUSSAIN, I.; HEGGEN, C. L. Understanding immunology in disease development and control. *Poultry Science* 77, 1998. p. 1126 – 1129. Acessado em: <http://ps.oxfordjournals.org/> on August 16, 2015

REIS, M.M. Testes imunológicos: manual ilustrado para profissionais da saúde. Ed. Porto Alegre: AGE, 1998.

SALES, T. S.; HERVAL, E. F. G.; CÉSAR, A. E. R.; RAMOS, I.; BATINGA, T. B.; SILVA, P. S.; MAIA, P. C. C.; FERNANDES, L. Títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em três diferentes sistemas de criação avícola na região de Feira de Santana – Bahia. Rev. Bras. Saúde Prod. An., out/dez 2007. V.8, n.4, p. 386-393.

SANCHES, T. C. Causas de morte em Passeriformes: comparação entre aves de vida livre residentes na região metropolitana de São Paulo e aves oriundas do tráfico. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

SCHAT, K. A. Current Progress on Avian Immunology Research. Proc. 6th Avian Immunology Research Group Meeting, Ithaca, NY Oct. 8-10, 2000. American Association of Avian Pathologists, Inc. p1-387, 2001.

SCHMIDT, E. M. S.; PAULILLO, A. C.; CARON, L. F.; FILHO, T. F.; AGUSTINI, M.; VENTURA, H. L. B.; JUNIOR, L. D. Clinical and immunological parameters of Newcastle disease vaccination in juvenile ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*). International Journal of Poultry Science 7 (3): 283-284, 2008.

SHARMA, J. M. Avian Immune System. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E (Eds). Diseases of poultry. 12th ed, Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p 47 - 58.

SUN, C.; MOERMOND, T. C. Foraging ecology of three sympatric turacos in a montane forest in Rwanda. The Auk, 114 (3), Wisconsin, USA, 1997. p. 396 - 404.

THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. Infectious Disease of Wild Birds. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, 2007. 484p.

TIZARD, I. R. Imunologia veterinária: uma introdução. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002.

VAZ, A. J. Imunoensaios utilizando conjugados. In: VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C. Imunoensaios: fundamentos e aplicações. 23 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Googan, 2007. p. 108-116.

VILANI, R. G. D'. O. C. Estrutura hospitalar, quarentenário e centros de triagem. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds) Tratado de animais selvagens – medicina veterinária. Editora Roca, 2006. 33-43.

WOODFORD, M. H. Quarantine and health screening protocols for wildlife prior to translocation and release into the wild. Published jointly by the IUCN Species Survival Commissions Veterinary Specialist Group, Gland; the Office International des Epizooties (OIE), Paris; Care for the Wild, UK and the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarian, Switzerland, 2000. 87p.

YUSOFF, K.; TAN, W. S. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. Avian Pathol, 2001. V.30, p. 439–455.