UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

MELISSA PAES PETRUCCI

ANALISE HISTOPATOLOGICA E IMUNOHISTOQUIMICA DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE AVULAVIRUS AVIÁRIO SOROTIPO 2 E 10 ISOLADOS DE PINGUINS DE MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*).

CAMPOS DOS GOYTACAZES

2017

MELISSA PAES PETRUCCI

ANALISE HISTOPATOLOGICA E IMUNOHISTOQUIMICA DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE AVULAVIRUS AVIÁRIO SOROTIPO 2 E 10 ISOLADOS DE PINGUINS DE MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*).

Dissertação apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal na área de concentração de Sanidade Animal

Orientador: Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos

Campos dos Goytacazes

2017

MELISSA PAES PETRUCCI

ANALISE HISTOPATOLOGICA E IMUNOHISTOQUIMICA DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE AVULAVIRUS AVIÁRIO SOROTIPO 2 E 10 ISOLADOS DE PINGUINS DE MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*).

Comissão examinadora:

_____

Dsc. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos

_____

Dsc. Luz Alba Maria Garcette Fornells

_____

Dsc. Milton Masahico Kanashiro

_____

Dsc. Claudia Maria Costa de Almeida

RESUMO

Os Avulavirus aviários (AAvV), tem sido isolado de uma ampla variedade de espécies de aves domésticas e selvagens através do mundo. No Brasil, a partir de amostras fecais de Pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), resgatados no litoral do Espírito Santo, em 2008, foram isoladas duas cepas de Avulavirus aviário: ES-2 caracterizado como AAvV-10 e a cepa ES-3 carateriza do como AAvV-2. Para avaliar melhor os riscos que esses isolados possam representar, o trabalho teve como objetivo, realizar infecções experimentais em diferentes sistemas hospedeiros (camundongos e aves) e avalia-los quanto ao desenvolvimento de doença clínica, susceptibilidade, patogenicidade e distribuição de antígenos em diferentes órgãos. Nos camundongos infectados com a cepa ES-3 (AAvV-2), foi observada apenas uma leve prostração nos primeiros dias pós-inoculação. Nos animais infectados com a cepa ES-2 (AAvV-10) essa alteração não foi observada. As análises histopatológicas, tanto pelo AAvV-2 quanto ao AAvV-10, não revelaram nenhuma lesão patológica digna de nota em nenhum dos órgãos avaliados em qualquer etapa do estudo. Apesar disso, as análises por imunohistoquímica, revelaram a presença de antígenos virais em vários órgãos nos dois experimentos. Em resumo, nos dois experimentos, os animais não desenvolveram sinais clínicos aparentes até o final dos experimentos (14dpi). Essas observações demonstraram que apesar de infecciosas, essas cepas não são patogênicas para esse sistema hospedeiro. No sistema hospedeiros aves (pintos de um dia de idade), os animais não desenvolveram nenhum sintoma clínico. As análises histopatológicas dos tecidos dos animais inoculados, via oral e respiratória com o AAvV-10 e via oral com o AAvV-2, não foi observada nenhuma lesão patológica digna de nota em nenhum dos órgãos avaliados. Entretanto, as análises por IHQ revelaram a presença de antígenos virais em vários órgãos. Diante desses resultados, concluímos que o sistema hospedeiro (pintos de um dia de vida) foi susceptível ao AAvV-10 quando inoculados por via oral e respiratória, e para o AAvV-2 quando inoculado por via oral, foram disseminados e detectados por IHC em vários órgãos, essas cepas não foram patogênicas para esse sistema hospedeiro.

Palavras Chaves: Avulavirus aviário-2, Avulavirus aviário-10, Camundongo, Pintos, Pinguins, Patogenicidade.

ABSTRACT

The avian paramyxovirus (APMvs) have been reported from a wide variety of wild and domestic avian species. In Brazil, two strains were isolated from fecal samples of Magellanic penguins (Spheniscus magellanicus), stranded in the coast of Espírito Santo, in 2008: ES-2 characterized as APMV-10 and strain ES-3 characterized as APMV-2. Our objective was to carry out experimental infections in mice, inoculated orally, to evaluate the susceptibility, dissemination and pathogenicity of these isolates in different host system (mice and chicks). Animals infected with strain ES-3 (APMV-2), show only a brief decrease in physical activity observed in the first days after inoculation. In animals infected with strain ES-2 (APMV-10) this change was not observed. Histopathological analyzes of the tissue of mice infected with APMV-2 and APMV-10 did not reveal any serious pathological lesion in any of the organs evaluated at any stage of the study. Nevertheless, immunohistochemical assays revealed the presence of viral antigens in several organs in both experiments. In summary, in both assays the animals did not develop apparent clinical signs until the end of the experiments (14dpi). These observations demonstrated that, although infectious, the strains are not pathogenic to this host system. In 1 day-old chicks, the animals infected by both strains, did not develop any apparent clinical symptoms. Histopathological analyzes of the tissues of the inoculated animals, oral and respiratory with APMV-10 and oral route with APMV-2, any several pathological lesions were observed in any of the evaluated organs. However, IHC analyzes revealed the presence of viral antigens in various organs. In view of these results, we concluded that the host system (1day-old chicks) was susceptible to APMV-10 when inoculated orally and respiratory, and to APMV-2 when inoculated orally, they were disseminated and detected by IHC in several organs, these strains were not pathogenic to this host system.

Key words: APMV-2, APMV-10, Mice, 1 day-old chicks, Penguins, Pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia Eletrônica do Avulavirus Aviário 14

Figura 2 – Principais rotas migratórias (flyways) de aves que se deslocam entre os Hemisférios Norte e Sul em 2014. 32

Figura 3 - Mapa da rota dos pinguins – de - Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) Fonte: Revista Pesquisa da FAPESP.....34

Figura 4 - Área de ocorrência e distribuição do pinguim – de - Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) 35

Figura 5 - Mapa de registros da espécie pinguim – de - Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no litoral do Brasil.....36

Figura 6 - Foto da disposição dos camundongos acomodados em caixas multiespécies Alesco, dentro do isolador mantido com pressão negativa.....40

Figura 7 - Foto da disposição dos pintos acomodados em caixas multiespécies Alesco, dentro do isolador mantido com pressão negativa.....42

Figura 8 - Imunohistoquímica em cortes de tecidos de camundongo inoculados via oral com Avian avulavirus -2 cepa ES-3 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.....47

Figura 9 - Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculados via oral com Avian avulavirus -2 cepa ES-3 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.....51

Figura 10 - Imunohistoquímica em cortes de tecidos de camundongo inoculados via oral com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.....54

Figura 11 - Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculados via oral com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.....56

Figura 12 - Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculados via respiratório com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.....59

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Isolados dos Avulavirus aviário com seus respectivos anos de isolamento, locais e autores.....18

Tabela 2 - Classificação da patogenicidade quanto aos sinais clínicos (OIE 2017) 19

Tabela 3 - Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de camundongos inoculado via oral com Avian avulavirus-2 cepa ES-3 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.....47

Tabela 4 - Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pinto de um dia inoculado via oral com Avian avulavirus-2 cepa ES-3/*Spheniscus magellanicus*/Espírito Santo/Brasil/2012 com título de 256 UHA.....51

Tabela 5 - Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de camundongos inoculado via oral com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.....53

Tabela 6 - Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculado via oral com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.....55

Tabela 7 - Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculado via respiratória com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.....58

LISTA DE ABREVIAÇÃO

IHQ - Imunohistoquímica

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PNSA - Programa Nacional de Sanidade Avícola

OIE - Organização Internacional de Epizootias

ICTV - International Comitte on Taxonomy of Viroses

NDV - Newcastle Disease Virus

EUA - Estados Unidos da América

TME - Tempo Médio de Morte Embrionária

ICPI - Índice de Patogenicidade Intracerebral

IPIV - Índice de Patogenicidade Intravenosa

SNC – Sistema Nervoso Central

CEMAVE - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres

IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza

Dpi - Dias Pós Inoculação

HA - Hemaglutinação

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal

IgY – Imunoglobulina de galinha

IgG – Imunoglobulina de camundongo

SUMARIO

1.INTRODUÇÃO 11

2. REVISÃO LITERATURA 14

2.1 CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES GERAIS DOS AVULAVIRUS 14

2.2 – AVULAVIRUS NO MUNDO.....16

2.3 - PATOGENICIDADE E PATOGENIA DOS AVULAVIRUS.....19

2.3.1- TESTES DE PATOGENICIDADE.....21

2.4 - OS SOROTIPOS.....22

2.4.1 - AAvV-1.....22

2.4.2 - AAvV-2.....23

2.4.3 - AAvV-3.....24

2.4.4 - AAvV-4.....25

2.4.5 - AAvV-5.....25

2.4.6 - AAvV-6.....26

2.4.7- AAvV-7.....26

2.4.8 - AAvV-8.....27

2.4.9 - AAvV-9.....27

2.5.0 - AAvV-10.....27

2.5.1 - AAvV-11.....28

2.5.2 - AAvV-12.....28

2.5.3 - AAvV-13.....28

2.5.4 - AAvV-14.....29

2.5.5 - AAvV-15.....29

2.6 – ROTA MIGRATÓRIA.....30

2.7 – PINGUINS.....33

3. - MATERIAL E MÉTODOS.....38
3.1 - AMOSTRAS VIRAIS.....38
3.2 - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE VÍRUS.....38
3.3 - PRODUÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES.....39
3.4 - ÍNDICE DE PATOGENICIDADE EM CAMUNDONGOS.....39
3.5 - ÍNDICES DE PATOGENICIDADE EM AVES.....41
3.6 – HEMAGLUTINAÇÃO.....42
3.7 - HISTOPATOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA CAMUNDONGO.....42
3.8 - HISTOPATOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA PINTO.....44
4. - RESULTADO.....46
5.- DISCUSSÃO 62
6.- CONCLUSÃO 66
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....67

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCH / UENF** 004/2018

P498 Petrucci, Melissa Paes.

Análise histopatológica e imunohistoquímica de infecção experimental de avulavirus aviário sorotipo 2 e 10 isolados de pinguins de magalhães (*Spheniscus magellanicus*) / Melissa Paes Petrucci – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

68 f. : il.
Bibliografia: f. 54 - 68.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.
Área de concentração: Sanidade Animal.
Orientador: Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos.

1. Avulavirus aviário-2. 2. Avulavirus aviário-10. 3. Pinguim. 4. Pintos. 5. Patogenicidade. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 636.6089

1 - INTRODUÇÃO

A avicultura no Brasil é uma atividade de grande sucesso com muitos investimentos, movimentando milhões de reais. No ano de 2015 o Brasil alcançou o terceiro lugar em produção de frango e o primeiro em exportação, passando à frente da China, e só ficando atrás dos Estados Unidos (ABPA 2015).

Entretanto, se não contarmos com uma sólida estrutura de controle da saúde animal poderemos, a qualquer momento, ser surpreendidos por enfermidades exóticas ou até mesmo assistir a reemergência de enfermidades que hoje se encontram sob controle (MAPA 2016).

Por conta dessa preocupação, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da portaria nº 193 19/9/1994 instituiu o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Uma das atividades desenvolvidas no programa é o monitoramento de patógenos de importância em plantéis de avicultura industrial, avicultura de subsistência, oestruticultura e aves ornamentais e selvagens; residentes e migratórias (MAPA 2016).

De particular atenção, pelas perdas econômicas causadas, são viroses que têm como reservatórios as aves selvagens e podem transmitir esses agentes para as aves de produção, como os avulavirus aviários (AAvV), se destacando entre eles o vírus da doença de Newcastle sorotipo 1 (*Avian avulavirus* 1) bem como os subtipos de vírus da Influenza aviária (CAMPITELLI et al., 2004).

Recentemente, o ICTV modificou a taxonomia do gênero Avulavírus da família Paramyxoviridae. O vírus de Newcastle e todos os paramixovirus aviários 2-13 foram modificados para avulavírus aviário (AAvV) 1 a 13, respectivamente (WAJID et al., 2017).

A família *Paramyxoviridae* é ampla e diversa, incluindo vírus que têm sido isolados de uma ampla variedade de espécies de mamíferos e aves em todo mundo (STALLKNECHT et al., 1991; MILLER et al., 2010). Todos paramixovirus isolados de aves estão classificados no gênero *Avulavirus*, em que estão classificados os Avian avulavirus (ICTV, 2017)). De acordo com provas da inibição da hemaglutinação e inibição da neuraminidase os AAvV estam, distribuídos em treze especies; Avulavirus aviário -1 a Avulavirus aviário -13 (ALEXANDER, 2003; MILLER et al., 2010; BRIAND et al., 2012; TERREGINO et al., 2013). Entretanto, outras espécies foram propostas, Avulavirus aviário -14 e Avulavirus aviário -15 YAMAMOTO et al., 2015; THAMPAISARN et al., 2017; THOMAZELLI et al., 2017). Além desses, três AAvV isolados a partir de amostras fecais de pinguins gentoo (*Pygoscelis papua*) na antártica, também foram propostos (NEIRA et al., 2017).

Através de trabalho de monitoramento da circulação em aves selvagens migratórias e residentes, foram isolados e caracterizados pela primeira vez no Brasil, a partir de amostras fecais de pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), resgatados no litoral do Espírito Santo, em 2008: duas cepas de AAvV: Avulavirus aviário -10 cepa ES-2/*Spheniscus magellanicus*/Espírito Santo/Brasil/2012 (Genbank HQ687899) e Avulavirus aviário -2 cepa ES-3/*Spheniscus magellanicus* /Espírito Santo/Brasil/2012 (Genbank HQ687900) (FORNELLS et al., 2012). A cepa ES-2/AAvV -10, apresentou 93% de homologia com o AAvV -10 isolado nas ilhas Falklands (MILLER et al., 2010). A cepa ES-3 apresentou 93% de homologia com a cepa AAvV-2/Bangor. Estas análises foram baseadas em estudos de homologia com o gene da proteína de matriz (M) e comparadas às cepas padrões de cada sorotipo (FORNELLS et al., 2012).

Testes de patogenicidade de novas cepas de avulavirus são critérios importantes, recomendados pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) e MAPA, que devem ser realizados para avaliar os riscos em potencial que esses vírus representam para a avicultura e saúde pública. Dessa forma, para avaliar melhor os riscos que essas possam causar à avicultura nacional e a saúde pública, o trabalho teve como proposta utilizar diferentes sistemas hospedeiros (aves e mamíferos) para realizar infecções experimentais que

possam auxiliar num melhor conhecimento da susceptibilidade, grau de virulência e patogenicidade dessas cepas.

2 - REVISÃO LITERATURA

2.1 – CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES GERAIS DOS AVULAVIRUS

A família *Paramyxoviridae* é ampla e diversa, incluindo vírus que tem sido isolado de uma variedade de espécies de mamíferos e aves em todo o mundo (STALLKNECHT et al., 1991; MILLER et al., 2010; BRIAND et al., 2012; TERREGINO et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2015; THAMPAISARN et al., 2017). Baseado na sua estrutura, organização e sequenciamento genômico, a família está dividida em sete gêneros: *Aquaparamyxovirus* com uma espécie; *Avulavirus*, com treze espécies; *Ferlavirus*, com uma espécie; *Henipavirus*, com cinco espécies; *Morbillivirus*, com sete espécies; *Respirovirus*, com cinco espécies; *Rubulavirus*, com dezessete espécies (ICTV, 2017).

Todos os Avulavirus estão classificados nos gêneros: *Avulavirus*, em que estão classificados os Avian avulavirus (Avulavirus aviário – AAvV). De acordo com as provas de inibição da hemaglutinação e inibição da neuraminidase os AAvV estavam distribuídos em treze espécies; Avulavirus aviário-1 a Avulavirus aviário -13 (ALEXANDER, 2003; MILLER et al., 2010; BRIAND et al., 2012; TERREGINO et al., 2013). Entretanto, outras foram propostas Avulavirus aviário -14 e Avulavirus aviário -15, (YAMAMOTO et al., 2015; THAMPAISARN et al., 2017; THOMAZELLI et al., 2017).

Classificação: De acordo com o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2017).

Ordem: *Mononegavirales*

Família: *Paramyxoviridae*

Gênero: *Avulavirus*

Espécies: 13

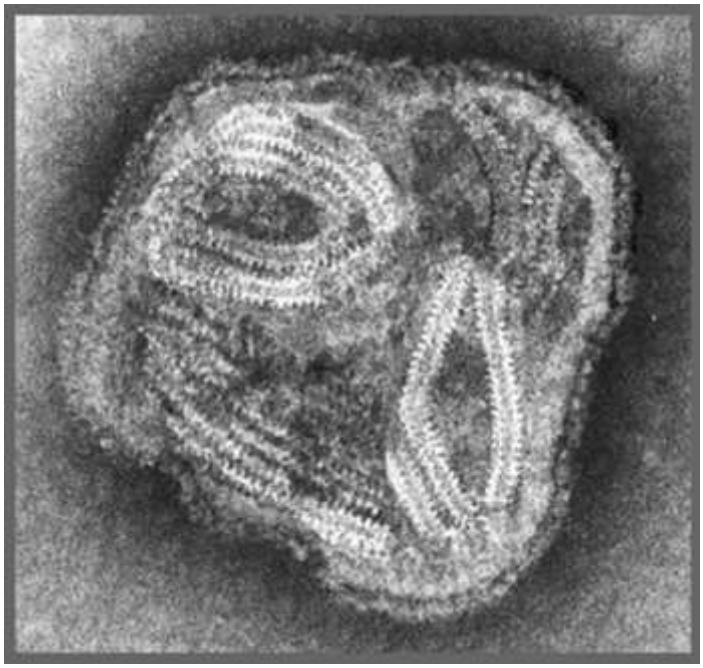


Figura 1: Microscopia Eletrônica do Avulavirus Aviário. Foto: Microbiologybook

Sua composição consiste em vírus pleomórficos, envelopados, fita genômica de RNA negativo não segmentado e cadeia simples (LAMB et al., 2007). Os genomas de todos os avulavirus variam entre 15 e19 kb de comprimento e contêm 6-10 genes que codificam até 12 diferentes proteínas (LAMB et al., 2006). A replicação do vírus é intracitoplasmática, no qual o RNA viral tem sentido negativo. Uma replicação eficiente requer do nucleotídeo um comprimento de genoma múltiplo de seis, conhecida como "regra de seis" (CALAIN e ROUX, 1993). Os genomas dos AAvV são muito semelhantes em organização, todos os membros contêm seis genes na ordem de 3'-N-P-M-F-HN-L-5' com a exceção do AAvV -6, que contém uma pequena proteína hidrofóbica (SH) de um gene adicional no seu genoma. Os AAvV codificam proteína de: nucleocapsideo (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusão (F), proteína hemaglutinina neuraminidase (HN) e proteína polimerase (L). (SHIN-HEE et al., 2012).

O gênero avulavirus possui a capacidade biológica particular que caracteriza este grupo. A aglutinação de glóbulos vermelhos é uma delas, isso ocorre pela ligação das proteínas hemaglutinina-neuraminidase aos receptores de superfície das hemácias. Esta propriedade e a inibição

especifica da aglutinação por antissoro são utilizadas como testes de diagnósticos. (SILVA, 2016).

De acordo com provas da inibição da hemaglutinação e inibição da neuraminidase os AAvV estão distribuídos em quinze sorotipos (Avian avulavirus-1 a Avian avulavirus-15) (ALEXANDER E SENNE, 2008; THAMPAISARN et al., 2017; THOMAZELLI et al., 2017).

Os AAvV podem ser neutralizados por agentes físicos e químicos, os utilizados normalmente são: calor, radiação, solventes lipídicos, hipoclorito e amônia quaternária. Uma neutralização efetiva dependerá da espécie do vírus, tempo de exposição ao agente, concentração do vírus e interações entre as substâncias (ALEXANDER E SENNE, 2008).

2.2 – AVULAVIRUS NO MUNDO

Os AAvV estão entre os mais importantes vírus que infectam espécies aviárias em todo o mundo. Muitos surtos devastadores foram notificados de diferentes partes do mundo com prejuízos econômicos consideráveis (MUNIR et al., 2012, UMALI et al., 2013; MARKS et al., 2014; PEDERSEN et al., 2014). As principais áreas endêmicas de incidência dos AAvV residem no subcontinente Africano, China, Índia, Paquistão, Bangladesh e Malásia. Ocasionalmente também foram notificados casos de surtos nos EUA, Austrália e Europa e muitos destes vírus foram isolados por programas de vigilância epidemiológica (tabela 1) (GOGOI et al., 2017). Relatos descreveram a presença do vírus em população de aves migratórias no Brasil (FORNELLS et al., 2013). Entretanto as aves normalmente encontram-se assintomáticas na maioria das infecções por AAvV, o que aumenta a incidência em populações de aves selvagens, representando uma ameaça para as aves domésticas e aves de capoeira. No Japão, os avulavirus foram descritos em aves aquáticas migratórias, sugerindo um padrão específico da espécie de AAvV (UMALI et al., 2014), da mesma forma, pombos têm sido sugeridos como reservatórios de AAvV (TIAN et al., 2012, TESKE et al., 2013).

Apesar da intensa vacinação contra o vírus do Newcastle, sua endemia é um problema em toda Ásia, África e América Central. Trabalhos recentes descrevem que estão se espalhando do Sudeste Asiático, para o Oriente Médio, a Europa Oriental e África do Norte e podendo causar mortalidade em aves de capoeira mal vacinadas (MILLER et al., 2015; REHMANI et al., 2015; DIMITROVE al., 2016).

Foi detectada a presença do vírus virulento em aves vacinadas em fazendas comerciais (REHMANI et al., 2015) e sua constante evolução ao longo do tempo sugere a existência de uma carga viral de alta potência com replicação contínua. (MILLER et al., 2009).

Aves exóticas mantidas em cativeiro e as aves de estimação também foram infectadas com cepas de NDV virulentas (NOLEN, 2002; PEDERSEN et al., 2004) e são consideradas uma ameaça à biossegurança para o mercado interno e para o comércio de aves de granja.

Tabela 1: Isolados dos Avulavirus aviário com seus respectivos anos de isolamento, locais e autores. GOGOI et al., 2010

Tipo	Ano de isolamento	Espécie	Patogenicidade em frango	Local	Referência
APMV 1	1926	Galinha	Virulento	Java (Indonésia)	Doyle (1927), Kraneveld (1926)
APMV 2	1956	Galinha e Pato	Avirulento e Virulento	Yucaipa and California (USA), Inglaterra e Quênia	Bankowski et al. (1960), Subbiah et al. (2008, 2010)
APMV 3	1967	Peru e Avestruz	Avirulento	Ontario, Wisconsin (USA), Inglaterra e França	Tumova et al. (1979), Macpherson et al. (1983) Andral and Toquin (1984)
APMV 4	1976	Pato selvagem, Galinha e Ganso	Avirulento	Hong Kong, Coreia e África do Sul	Webster et al. (1976), Shortridge and Alexander (1978), Jeon (2008), Abolnik et al. (2012)
APMV 5	1974	Periquito	Avirulento	Japão e Rússia	Mustaffa-Babjee et al. (1974) Boisseau (1993)
APMV 6	1977	Pato doméstico e Ganso	Avirulento	Hong Kong, Taiwan, Itália e Nova Zelândia	Shortridge et al. (1980) Stanislawek et al. (2002) Chang et al. (2001) Xiao et al. (2010)
APMV 7	1975	Pombo e Peru	Virulento	Tennesse (EUA)	Alexander et al. (1981), Saif et al. (1997), Woolcock et al. (1996)
APMV 8	1976	Ganso e Pato	Avirulento	EUA e Japão	Yamane et al. (1982), Cloud and Rosenberger (1980)
APMV 9	1978	Pato doméstico e selvagem	Virulento	Nova York e Itália	Capua et al. (2004), Sandhu and Hinshaw (1981)
APMV 10	2007	Pinguim saltador de rocha	Avirulento	Ilhas Falklands	Miller et al. (2010)
APMV 11	2010	Narceja comum	Avirulento	França	Briand et al. (2012)
APMV 12	2005	Pato selvagem	Avirulento	Itália	Terregino et al. (2013)
APMV 13	2000	Ganso	Avirulento	Japão	Yamamoto et al. (2015)
APMV 14	2011	Pato	Avirulento	Japão	Thampaisarn et al. (2017)
APMV 15	2012	Maçarico branco	Avirulento e Virulento	Rio Grande do Sul (BR), Coreia	Thomazelli et al. (2017), Lee et al.(2017)

2.3 - PATOGENICIDADE E PATOGENIA DOS AVULAVIRUS AVIÁRIOS

A patogenicidade do vírus depende de inúmeros fatores como: espécie hospedeira, idade, estado imunológico, estirpe infectante, condições ambientais, quantidade de vírus transmitida, via de transmissão e virulência da cepa.

O período de incubação da infecção até o desenvolvimento da doença varia de 2 a 15 dias e a via de transmissão pode ser um fator determinante na gravidade da doença clínica (ALEXANDER et al., 2004). Existem cinco classificações para os sinais clínicos da doença (Tabela 2) (ALEXANDRE e SENNE, 2008; DINAPOLI et al., 2009; TAN et al., 2009).

Tabela 2: Classificação da patogenicidade quanto aos sinais clínicos (OIE 2017).

Classificação da patogenicidade	Gravidade
Velogênico viscerotrópico	Caracterizada por infecções letais agudas, geralmente com lesões hemorrágicas em vários órgãos e tecidos
Velogênico neurotrópico	Caracterizada pela alta mortalidade que acompanha a doença neurológica, mas lesões intestinais estão ausentes.
Mesogênico	Caracterizado por sinais clínicos respiratórios e neurológicos, com baixa mortalidade
Lentogênico	Causam infecções subclínicas do aparelho respiratório
Entérico assintomático	Cepas avirulentas (não causam nenhum sintoma ou doença)

A principal via de transmissão ocorre por ingestão do material fecal contaminado ou por sua inalação. O processo de replicação do vírus ocorre na via respiratória das aves infectadas, o que permite a disseminação por descarga nasal, mas também, foram observadas replicações no intestino, o que sugere a disseminação por excreção fecal. Muitos autores descrevem alta concentração viral no material fecal (COLLIER et al., 1998; SAIF et al., 2008; LI et al., 2009). Na Grã-Bretanha, no ano de 1984 foi observada a transmissão direta do vírus, por água e alimentos contaminados pelas fezes de aves doentes, proveniente da importação de

animais exóticos, aves comerciais, aves de caça, aves de esporte (pombo correio e galo de briga). (SAIF et al, 2008).

Apesar de ter como hospedeiro natural e poder infectar aves, os AAvV são capazes de replicar-se em espécies não aviárias, como répteis, mamíferos não humanos e humanos e podendo, ainda, disseminar-se a outras espécies de animais. Os sinais clínicos mais prevalentes em humanos, geralmente, envolvem quadros de conjuntivites, que podem ser transitórios e/ou auto limitantes. Já em aves observa-se a capacidade de penetração na casca do ovo, o que o torna um potencial disseminador viral. (SAMAL, 2011)

De acordo com Hines e Miller (2012), aves migratórias têm demonstrado a transmissão para aves de capoeira por contato direto ou por contaminação de alimentos e até pela água. Estirpes de baixa virulência foram isoladas com frequência em aves selvagens na Grã-Bretanha; só no ano de 1984, estavam ligadas aos onze surtos deste vírus descritos nesta região (ALEXANDER et al., 2004; KILLIAN, 2009).

Samal (2011) descreve o potencial de patogenicidade causada pelos AAvV-10 aAAvV-15, como pouco conhecidos, devido a muitos destes vírus terem sido isolados a partir de aves em quarentena, aves de caça, aves selvagens capturadas com armadilhas que estavam aparentemente saudáveis, sem sintomas ou sinais clínicos, além de aves exóticas e aves migratórias. Mas em diversos estudos foi realizada a caracterização dos sorotipos do AAvV-2 aoAAvV-15 utilizando o sequenciamento completo de seus genomas, o que permitiu expandir conhecimento sobre estes sorotipos (ALEXANDER e SENNE, 2008; ROUT e SAMAL et al., 2008; MILLER et al., 2010; SAMUEL et al., 2011; SAMAL, 2011; THOMAZELLI et al., 2017).

Dentre as aves, os frangos são os mais susceptíveis à infecção e desenvolvimento da doença pelo AAvV 1, sendo a família das ratitas (avestruz, emu e calau) os menos susceptíveis a infecção. As aves aquáticas selvagens são consideradas como reservatório natural, sendo consideradas resistentes ao avulavirus aviário-1 (ALEXANDER et al., 2004). Jeon et al. (2008) relataram que os AAvV-2 e AAvV-3 foram a causa de doenças em aves selvagens, enquanto que os AAvV-4 ao -9 são limitados ao efeito patogênico nas diferentes espécies, causando doença em algumas e apresentando baixo potencial patogênico em outras. Já os

AAvV-10, 11, 12, 13, 14 e 15 ainda não apresentam estudos significantes sobre o potencial patogênico, porém testes realizados em frangos não apresentaram graus de patogenicidade (MILLER et al., 2010; BRIAND et al., 2012; TERREGINO et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2015; THAMPAISARN et al., 2017; GOGOI et al., 2017).

2.3.1 - Testes de Patogenicidade

De acordo com a OIE são preconizados três testes para classificação dos AAvV, quanto a sua patogenicidade. São eles:

Tempo Médio de Morte Embrionária (TME) – são realizadas diluições decimais, na faixa de 10-6 a 10-9 do líquido alantóico infeccioso, em solução salina, inocular 0,1ml de cada diluição em no mínimo 5 ovos embrionados SPF de 09 dias de idade, pela via alantóica, após incubar os ovos a 35ºC. Deixar uma amostra do mesmo líquido alantóico na geladeira, por 8 horas e depois inocular 0,1 ml de cada diluição em no mínimo, 5 ovos da mesma idade e incubar a 35ºC. Observar os ovos durante sete dias, duas vezes por dia. Registrar o tempo de morte dos embriões. A dose letal mínima será a maior diluição que mata todos os embriões. TME é um tempo médio, em horas, para a dose letal mínima matar os embriões e se classificar em: velogênica / menos de 60 horas para matar, mesogênica / entre 60 e 90 horas para matar e lentogênica / mais de 90 horas para matar.

Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC) - a partir do líquido alantóico infeccioso, com título HA maior que 24, diluído a 1:10 em salina isotônica estéril, inocular 0,05 ml, pela via intracerebral, em 10 pintos SPF, de um dia de idade. Examinar os pintos, diariamente, por 8 dias, anotando-se o resultado: pintos saudáveis = 0, pintos doentes = 1 e pintos mortos = 2. Decorridos os 08 dias, calcular o índice médio do período. Amostras mais virulentas (velogênicas) este índice se aproxima de 2.0 enquanto nas cepas lentogênicas este índice se aproxima de 0.0.

Índice de Patogenicidade Intravenosa (IPIV) - Este índice é calculado a partir de inóculos intravenosos em frangos SPF, com seis semanas de idade. São utilizados 10 animais, inoculação realizada pela via intravenosa com 0,1 ml do

líquido alantóico, com título HA maior que 24, diluído a 1:10 em salina isotônica estéril. Observam-se os frangos durante 10 dias consecutivos e anota-se o resultado: frangos normais = 0, frangos doentes = 1, frangos paralíticos = 2 e frangos mortos = 3. O IPIV é o resultado da média das anotações sendo consideradas lentogênicas e algumas mesogênicas quando o IPIV se aproxima do zero e velogênicas quando o IPIV se aproxima de 3,0.

2.4 - OS SOROTIPOS

2.4.1 – AVULAVIRUS AVIÁRIO-1

É o único sorotipo bem caracterizado, pelo fato de causar doença de notificação obrigatória e devido a sua alta morbidade, mortalidade e perdas econômicas causadas por estirpes altamente virulentas. Isolados de Newcastle Disease Virus (NDV) variam muito o seu índice de patogenicidade nos animais, que vão desde ausência de doença a graves problemas respiratórios e doença neurológica que causa 100% de mortalidade do plantel (PEDERSEN et al., 2004). O NDV foi relacionado a várias pandemias (1926, 1960, 1970, 1980), desde que foi isolado em Java, na Indonésia, em 1926 e no mesmo ano na Inglaterra. Hanson et al. (1972) descreveram três hipóteses para esse surgimento e deslocamento do vírus para a região do sudeste da Ásia: a primeira seria que o vírus fosse endêmico nas aves, e com sua comercialização começou a se disseminar; a segunda seria o vírus presente nas aves da floresta tropical contaminando aves de capoeira e se disseminando devido à comercialização das mesmas; e por fim; a terceira hipótese seria uma grande mutação permitindo uma alteração da patogenicidade de baixa virulência para alta virulência, o que poderia infectar todas as aves (HANSON et al., 1972; HINES e MILLER 2012).

Em 1930 uma doença denominada “pneumoencefalite” foi diagnosticada no EUA, sorologicamente era o avulavirus aviário-1, que entrou no país devido a importações de aves exóticas para o estado da Califórnia, ocasionando uma série de regulamentações para importação, não só de aves exóticas, como também de qualquer outra ave. Esse regulamento diminuiu o aparecimento da doença no país,

pois as aves ficavam em quarentena, o que facilitou o monitoramento do vírus. (SEAL et al., 2000)

No ano de 1991 seis estados foram acometidos devido à entrada de aves ilegais, felizmente não foram descritas transmissões a outros animais (SEAL et al, 2000)

Em 2002/2003 um grande surto no estado da Califórnia, pela prática da disputa de “briga de galo” ocasionou a mais significativa perda econômica com mais de 3 milhões de aves mortas. Ainda neste ano, o transporte de material infectado dessas aves levou a um surto no estado do Texas, onde foram gastos 360 milhões de dólares para a erradicação do surto, e desde então, os EUA têm sido livres do NDV em aves de granja. (KIM et al., 2008)

Em 2010 foi isolado também no estado da Califórnia uma estirpe do NDV neurotrópico velogênico em corvos, que causou doença clínica no sistema nervoso (SLEEMAN, 2010).

O vírus permanece endêmico em vários países devido à falta de vacinação, e alguns autores atribuem a disseminação à cultura de criação e torneios de pombos correio sem vacinação. Segundo a OIE é difícil acompanhar a distribuição geográfica e o monitoramento da NDV, devido à limitada informação, e que, alguns países só relatam após a ocorrência da doença com grandes perdas. (SAIF et al., 2008).

2.4.2 – AVULAVIRUS AVIÁRIO-2

Entre os AAvV-2 existem duas estirpes bem caracterizadas: a 1°estirpe foi isolada pela primeira vez de frangos em Yucaipa, EUA, onde apresentavam laringotraqueíte no ano de 1956, sendo identificados como hospedeiros naturais os perus e passeriformes, além de hospedeiros acidentais galinhas e psitacídeos (ZHANG et al., 2007). A 2° estirpe de AAvV-2 Bangor foi isolada na Inglaterra e Quênia de animais em quarentena como passeriformes, galinhas e patos. Países como EUA, Canadá, Costa Rica, França, Itália, Inglaterra, Escócia, Espanha, Rússia, Quênia, China, Japão, Índia, Israel, Arábia Saudita e Cazaquistão relataram a ocorrência de surtos de AAvV-2 (ALEXANDER e SENNE, 2008).

Passeriformes e psitaciformes são descritos como reservatórios e responsáveis por espalhar a doença (ZHANG et al., 2007), porém em 2012 foi relatado no Brasil a ocorrência do vírus em pinguins de Magalhães, o que mostrou a imprevisibilidade e a capacidade da transferência de avulavirus a aves não habituais e que demostram um padrão de migração (FORNELLS et al., 2012). Os estudos do AAvV sugerem a prevalência do AAvV-2 em aves de capoeira e aves selvagens (ALKHALAF, 2009).

Estudos de patogenicidade das duas cepas de AAvA-2, Yucaipa e Bangor, em galinhas e perus, demostraram que o TME em ovos de galinhas inoculados foi de 168 horas para ambas as cepas e o ICPI foi zero, indicando, dessa forma, que esses vírus não foram patogênicos para galinhas de produção. (SUBBIAH et al., 2010).

Foi observado ainda que essas cepas ocasionam leves doenças respiratórias, diminuição da produção de ovos e infertilidade em galinhas, perus e aves selvagens (ZHANG et al., 2006).

2.4.3 – AVULAVIRUS AVIÁRIO-3

O AAvV-3 foi isolado pela primeira vez de perus em Ontário e depois em Wisconsin, nos EUA em 1967 (TUMOVA et al., 1979). Desde então, vem sendo isolado a partir de aves selvagens e domésticas como galinhas e perus (KUMAR e SAMAL, 2012).

Infecções com esse sorotipo têm sido associadas à encefalite com alta mortalidade em aves domésticas de gaiola. O avulavirus foi associado à pancreatite aguda em passeriformes e psitaciformes (BECK et al., 2003). Em frangos de corte pode ocasionar um retardo de crescimento e sintomas que envolvem o SNC.

A infecção pelo AAvV-3 é a segunda mais importante depois do NDV no que diz respeito a galinhas poedeiras, pois, leva rapidamente a uma baixa na produção de ovos e a infertilidade (ALEXANDER e SENNE, 2008).

Em infecções experimentais com aves de produção (galinhas e patos) baseados nos testes TME e IPCI foram considerados avirulentos apesar de ser neurotrópicos (SAIF et al., 1997). Em infecções experimentais com hamster e

camundongo (KHATTAR et al., 2011) foi possível a replicação viral sem ocasionar sintomatologia, sendo assim considerado avirulento.

2.4.4 – AVULAVIRUS AVIÁRIO-4

O AAvV-4 foi isolado pela primeira vez em pato na cidade de Hong Kong em 1975 (SHORTRIDGE e ALEXANDER, 1978). Essa cepa tem sido associada à galinha, pato e ganso (KHATTAR et al., 2011). A ordem anseriforme (pato, ganso e marreco) tem sido a mais acometida por esse sorotipo, principalmente patos e gansos comerciais (STANISLAWEK et al., 2002; KHATTAR et al., 2011).

Foi isolado de aves aquáticas, mas o seu potencial epidemiológico é pouco conhecido. Em infecção experimental com frangos resultou em pneumonia intersticial leve e traqueíte catarral (SAMUEL et al., 2011).

Esse vírus pode se replicar em mamíferos, como hamster e camundongo, (KHATTAR et al., 2011) mas foi considerado avirulento, pois não causou sintomatologia nestes animais.

2.4.5 – AVULAVIRUS AVIÁRIO-5

Isolado em 1974 a partir de periquitos (*Melopsittacus undulatus*), que apresentaram sinais clínicos como prostração, dispneia, diarreia, torcicolo e enterite aguda fatal em filhotes, conduzindo a uma alta mortalidade (NERONE et al., 1978). Estudos realizados em fazendas de aves comerciais pelo departamento de vigilância sanitária nos EUA em 2008, obteve prevalência de todos os sorotipos, menos o do AAvV-5 (WARKE et al., 2008). No ano de 1993 um surto na Austrália e no Reino Unido envolvendo periquitos, com taxa de mortalidade de 95-100% apresentando sinais de diarreia, vômito seguido de morte (GOUGH et al., 1993).

Em infecção experimental com galinhas e pombos não foi observado nenhum sinal de doença, mas em filhote de periquitos foram observadas enterites. Em hamster e camundongo foi observada a replicação do vírus, sem causar sinais

clínicos de doença (KHATTAR et al., 2011). Esse AAvV-5 é diferente dos demais, pois não provoca hemaglutinação, não replica em cavidade alantoide de ovo de galinha embrionado, mas pode ser cultivado na cavidade amniótica de ovos de galinha embrionados de 8 dias (NERONE et al., 1978).

2.4.6 – AVULAVIRUS AVIÁRIO-6

Isolado pela primeira vez a partir de um pato doméstico em 1977 em Hong Kong, os AAvV-6 podem causar doença respiratória leve e queda na produção de ovos em perus, mas foram considerados avirulentos em experimento realizado com frangos (SAMUEL et al., 2009). O mesmo foi observado em experimento realizado com mamíferos (hamster e camundongo) (KHATTAR et al., 2011). Outra cepa do AAvV-6 foi isolada em Taiwan em 1998, de um pato doméstico que estava saudável. Em 2003 o mesmo vírus foi isolado de um ganso no extremo oriente da Rússia. Esse avulavirus continua sendo isolado em todo o mundo, e parece ser avirulento em frangos (WARKE et al., 2008).

2.4.7 – AVULAVIRUS AVIÁRIO-7

O AAvV-7 foi isolado pela primeira vez a partir de uma pomba morta por caçador, em 1975, no Tennessee, EUA. Esse vírus também foi isolado 1997 de um foco natural de doença respiratória em perus onde os animais apresentavam doença respiratória caracterizada por aerossaculite linfocítica leve, aumento do fígado e do baço e diminuição da produção de ovos. Porém foi considerado avirulento em infecção experimental em pintos de um dia de aves de produção (galinhas e patos) (SAIF et al., 1997). Ocorre em maior prevalência em animais como pombo, peru e frango, mas vem sendo relatado em outras aves. Em 2008, nos EUA, 27% das aves comerciais (frango) foram detectadas com AAvV-7, sugerindo uma alta prevalência. Embora o vírus não cause infecções graves em frangos, pode provocar doença respiratória e queda na produção de ovos em perus (WARKE et al., 2008).

Em experimento realizado por Khattar et al., (2011), foi observada a replicação viral em hamster e camundongo, mas não foram observados sinais clínicos e ou sintomatologia de doença.

2.4.8 - AVULAVIRUS AVIÁRIO -8

Foi isolado pela primeira vez em 1976 de um ganso canadense e de um pato selvagem (ALEXANDER et al., 2003), depois foi relatado em patos no Japão (YAMANE et al. 1982). Um estudo em 2008 mostrou que 48% dos frangos comerciais nos EUA apresentavam anticorpos a este sorotipo. O AAvV-8 pode replicar-se fora de um hospedeiro que não seja ave, sendo encontrado em macacos rhesus (*Macaca mulatta*), ratos selvagens, camundongos e hamsters, mas em experimento não causaram doença clínica (KHATTAR et al., 2013).

2.4.9 - AVULAVIRUS AVIÁRIO -9

Isolado pela primeira vez de patos domésticos em Nova York, Estados Unidos através de um programa de vigilância epidemiológica de monitoramento da gripe (SAND-HU e HINSHAW, 1981) e posteriormente isolado de aves aquáticas migratórias na Itália (CAPUA et al., 2004). Em infecção experimental o vírus se replicou em frangos e em mamíferos (hamster e camundongo), mas não produziu doença clínica (KIM et al., 2012). Em hospedeiros não aviários, o vírus pode provocar doença leve em macaco rhesus e rato selvagem (SAMUEL et al., 2011).

2.5.0 - AVULAVIRUS AVIÁRIO -10

Relatado pela primeira vez em uma ave marinha, o pinguim saltador de rocha (*Eudyptes chrysocome*), durante uma rotina do programa de vigilância da saúde das aves marinhas nas ilhas Falklands (MILLER et al., 2010). O vírus foi isolado de suabes orofaríngeos e cloacais de pinguins juvenis, sendo caracterizado como um novo sorotipo com base no ensaio cruzado HI entre amostras de soro de outros

avulavirus aviários. Posteriormente, esse sorotipo foi relatado em outra ave marinha, o pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) na costa do Brasil (FORNELLS et al., 2012). Testes de patogenicidade em frango mostraram baixa virulência do AAvV-10, caracterizando-o como avirulento. O real impacto da patogenicidade em frango comercial e em outras espécies ainda não foi estabelecido (MILLER et al., 2010).

2.5.1 - AVULAVIRUS AVIÁRIO -11

Isolado pela primeira vez de ave selvagem, a narceja - comum (*Gallinago gallinago*) na França (BRIAND et al., 2012). Seu genoma mostrou uma compatibilidade com o AAvV-2, mas sua patogenicidade e virulência em espécies aviárias ainda não foram determinadas.

2.5.2 - AVULAVIRUS AVIÁRIO -12

Isolado de um suabe cloacal de um pato selvagem (*Eurasian wigeon*) durante um surto na Itália pelo programa de vigilância sanitária durante o monitoramento de um surto de gripe (TERREGINO et al., 2013). Esse vírus apresenta semelhanças genômicas com o AAvV-1 lentogênico. Em experimento com frangos de granja (corte) este vírus foi considerado avirulento, pois não causou doença clínica nos animais (TERREGINO et al. 2013). Nenhuma outra cepa do AAvV-12 foi relatada até o presente momento.

2.5.3 - AVULAVIRUS AVIÁRIO -13

Isolado a partir de fezes de ganso no Japão no ano de 2000, este sorotipo demostrou ser avirulento no teste de ICPI em pintos de um dia em um experimento realizado (YAMAMOTO et al., 2015 e 2016).

Esse virus foi identificado durante a vigilância epidemiologia anual de populações de aves selvagens no norte do Cazaquistão em 2013, isolado de um ganso branco (*Anser albifrons*) (KARAMENDIN et al., 2016). O isolado em 2011 na Ucrânia em um ganso de fonte branca obteve 97% de homologia com o vírus identificado no Cazaquistão e 98% de homologia com o vírus identificado no Japão. (GORAICHUK et al., 2016).

2.5.4 - AVULAVIRUS AVIÁRIO -14

Isolado de pato no Japão em 2011, este sorotipo foi proposto após análise genética e sorológica. Demonstrou atividade cruzada com o AAvV - 6. Em experimento realizado com o TME, não foi detectada virulência (THAMPAISARN et al., 2017).

2.5.5 - AVULAVIRUS AVIÁRIO -15

Isolado a partir de suabes cloacais e traqueais do maçarico-branco *(Calidris fuscicollis),* uma ave migratória norte americana, que realiza invernada no Brasil na região do Rio Grande do Sul, em 2012.

Em experimento, essa cepa foi considerada avirulenta baseados nos testes de no ICPI e no TME em pintos de um dia e lentogênico (THOMAZELLI et al., 2017).

Na Coreia, em 2014, através do monitoramento de um programa de vigilância sanitária aviária, foi detectada uma nova cepa em patos migratórios (espécie desconhecida) em experimento, o teste de patogenicidade realizado por Lee et al. (2017). Esta cepa apresentou virulência em frangos.

Em resumo, os AAvV2, 3 e 7 têm sido associados a doenças respiratórias leves e problemas de queda na produção de ovos em frangos de produção (SAIF et al., 1997).

Não existem relatos de isolamento de AAvV-5, 8 e 9 em aves selvagens (ALEXANDER et al., 2003).

Entretanto uma pesquisa sorológica com aves comerciais em fazendas nos EUA indicou uma possível prevalência de todos os sorotipos, com exceção do AAvV-5 (WARKE et al., 2008; SUBBIAH et al., 2010).

No entanto, testes de replicação, patogenicidade e neurovirulência de AAvV-2 a 14 não foram plenamente estudadas (KUMAR et al., 2010; GOGOI et al., 2017).

Os AAvV circulam em todas as aves no mundo, incluindo as aquáticas. O processo de migração contribui para transmissão do vírus em caráter intercontinental e demonstram sua distribuição em subgrupos, fornecendo assim, evidências da evolução da diversidade genética (KUMAR et al., 2010; SUBBIAH et al., 2010; XIÃO et al., 2010; RAMEY et al., 2013; SUAREZ et al., 2013; BUI et al., 2014; MUZYKA et al., 2014; KARAMENDIN et al., 2015).

2.6 – ROTA MIGRATÓRIA

O Brasil é o segundo país do mundo em diversidade de aves, com 1.901 espécies e destas, 197 espécies apresentam algum padrão de deslocamento considerado migratório. Desse total, 53% (104 espécies) reproduzem no Brasil e 47% (93 espécies) em outros países. Devido à distribuição não contínua, as espécies migrantes geralmente se concentram em áreas especificas. Esses locais têm importância fundamental para conservação dessas espécies, uma vez que ao realizarem grandes migrações elas necessitam destas áreas para se alimentarem nas longas viagens (CEMAVE 2016).

As rotas migratórias são agrupadas e denominadas como “flyways”. Uma “flyway” pode ser definida como “a completa extensão na qual uma espécie migratória aviária ou uns grupos ou espécies relacionadas ou populações distintas de uma mesma espécie se locomovem anualmente de uma área de reprodução para uma área de não reprodução, incluindo lugares intermediários de descanso e alimentação, bem como áreas de ocorrência das mesmas” (BOERE e STROUD, 2006).

O monitoramento da circulação de viroses nessas áreas de rotas deve ser constante, para detectar entrada de vírus exóticos no país e prevenir a disseminação desses agentes (CEMAVE 2006).

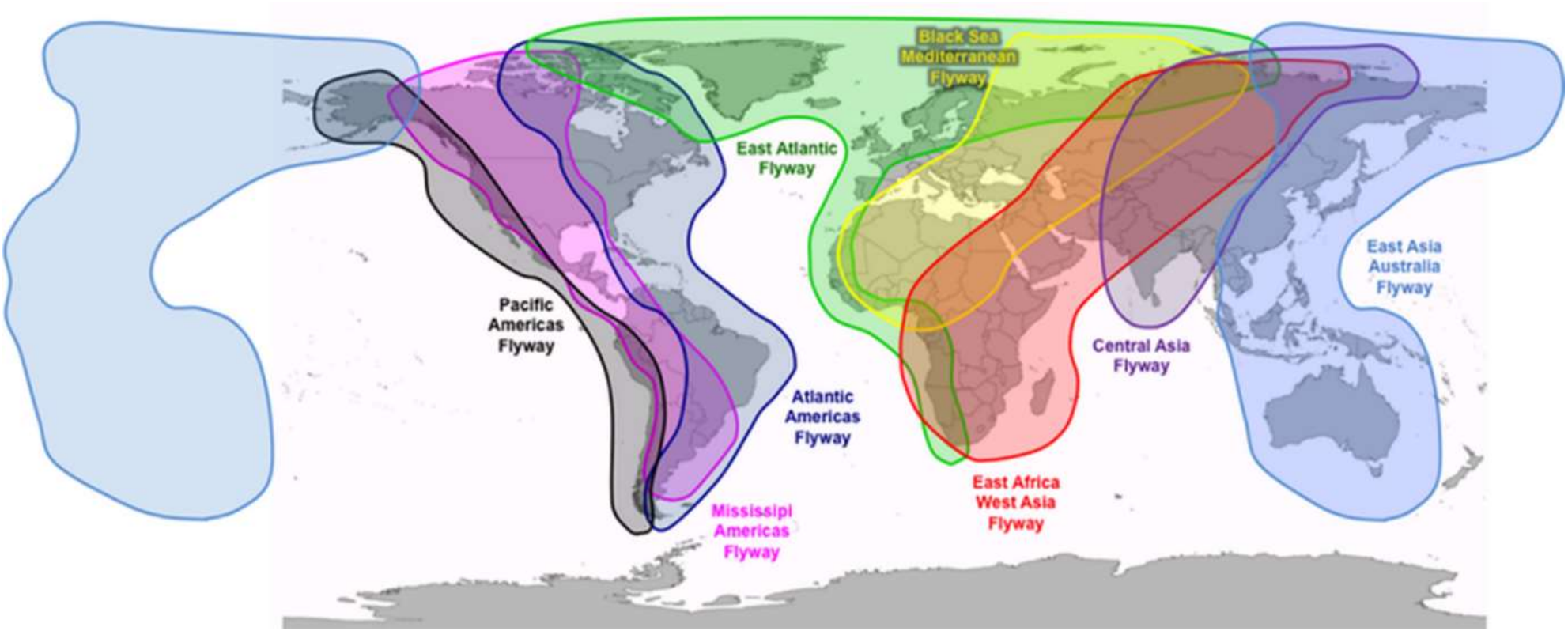


Figura 2: Principais rotas migratórias (flyways) de aves que se deslocam entre os Hemisférios Norte e Sul em 2014.

2.7 – PINGUINS

Os pinguins são classificados como sendo da: (IUCN, 2016).

Ordem: *Sphenisciformes*

Família: *Spheniscidae*

Gênero: *Spheniscus*

Espécies: *Spheniscus magellanicus*

O pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) é uma espécie de ave marinha classificada como quase ameaçada na lista da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN 2016). Reproduz-se em colônias numerosas distribuídas pela Argentina, Ilhas Falkland (Malvinas) e Chile, realizando anualmente movimentos migratórios sazonais para o Brasil em busca de alimento (LANCTOT et al., 2002).

Os pinguins são sentinelas do ambiente marinho e, a partir de sua observação e estudo, é possível aprender sobre a natureza e intensidade dos impactos humanos nos oceanos do hemisfério sul (BOERSMA, 2008). Atualmente existem 18 espécies reconhecidas de pinguins e, embora nenhuma delas se reproduza na costa brasileira, quatro já foram registradas em nosso litoral durante a migração invernal: pinguim rei (*Aptenodytes patagonicus*), pinguim de penacho amarelo (*Eudyptes chrysocome*), pinguim de testa amarela (*Eudyptes chrysolophus*) e pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (SICK, 1997). O pinguim-de-Magalhães é a espécie mais comumente registrada no litoral brasileiro e migra desde suas colônias reprodutivas na região da Patagônia, pelas correntes oceânicas, em busca da abundância de alimento na plataforma continental brasileira (VALIM et al., 2004).

Esta espécie é uma das quatro que compõem o gênero *Spheniscus*, todas de clima subtropical. A espécie é particularmente sensível à presença humana, e há sinais que comprovam declínio populacional nas últimas décadas em várias de suas populações monitoradas (BOERSMA, 2008). Sabe-se que a grande maioria dos animais encontrados no litoral brasileiro são juvenis, de modo que se sugere que este seria o estágio de vida mais sensível aos impactos ambientais durante a migração no litoral brasileiro (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2010; MÄDER et al., 2010).

A ocorrência do pinguim-de-Magalhães no Brasil apresenta sazonalidade anual. Esses pinguins permanecem nas colônias do sul da América do Sul desde meados de setembro até meados de abril, quando então adultos iniciam sua migração em direção ao norte, utilizando a plataforma continental (PÜTZ et al., 2007). Já os pinguins jovens parecem migrar mais tarde, começando a aparecer em junho e permanecendo até novembro em águas brasileiras (PETRY e FONSECA, 2002; MÄDER et al., 2010) e estes podem ficar vagando durante até quatro anos em alto mar.

Figura 3: Mapa da rota dos pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) Fonte: Revista Pesquisa da FAPESP.

A espécie se distribui pelas costas leste e oeste da América do Sul. Suas colônias estão distribuídas desde a Ilha de Algarrobo no Chile até a região da Península Valdés, na Província de Rio Negro Argentina, passando pelo Cabo Horn, no extremo sul da América do Sul. As colônias reprodutivas nas Ilhas Falklands (Malvinas), distantes cerca de 483 km da costa Argentina, complementam a população atlântica (SCHIAVINI et al., 2005). Os movimentos sazonais migratórios

dos indivíduos da espécie na costa do Oceano Atlântico (principalmente das populações das colônias localizadas nas menores latitudes), são provavelmente influenciados pela intensificação da força da Corrente das Falkland/Malvinas (VOOREN e BRUSQUE, 1999).

Figura 4: Área de ocorrência e distribuição do pinguim- de- Magalhães (*Spheniscus magellanicus*). Fonte: Elaine Akst.

Durante a migração para o norte, alguns indivíduos alcançam a costa brasileira, sendo comum os registros dessas aves no litoral do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (PETRY e FONSECA, 2002; PINTO et al., 2007; SANDER et al., 2008; MÄDER et al., 2010). Alguns autores consideram normal a ocorrência da espécie na costa do Brasil, o que equivale ao litoral do Rio de Janeiro e Espírito Santo (PÜTZ et al., 2000 e 2007). Embora vague apenas ocasionalmente no litoral nordestino do Brasil, há registros de ocorrência na costa da Bahia (SICK, 1997), Alagoas e Pernambuco (CARLOS et al., 2005). Contudo, pinguins monitorados com transmissores de sinal via satélite não atingiram a costa brasileira em diversos estudos (PÜTZ et al., 2000, 2002 e 2007).

Durante o ano de 2008, a ocorrência da espécie no litoral brasileiro foi intensificada, com registro de mais de 4.500 aves vivas que atingiram desde o litoral gaúcho, ao Sul, até o Estado da Paraíba, ao Norte, incluindo praticamente todos os Estados da costa brasileira nas regiões Nordeste (Rio Grande do Norte, Paraíba,

Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia), Sudeste e Sul. Explica-se a existência de um ciclo interanual que leva a episódios atípicos de encalhe de animais, tais como registrados em 2008 e em outros anos (GARCÍA-BORBOROGLU et al., 2010.)

Figura 5: Mapa de registros da espécie pinguim-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no litoral do Brasil. Fonte: IBGE/ICMBIO.

Durante a migração invernal, diversos desafios de origens distintas são enfrentados por estes animais. Em decorrência destas situações, o grande número de carcaças encontradas nas praias brasileiras sugere que nosso litoral seja uma importante área de ocorrência da espécie (PETRY e FONSECA 2002; GARCIA-BORBOROGLU et al., 2010). Apesar deste cenário, ainda há poucos dados sobre as enfermidades e as causas de mortalidade dos animais ao longo da plataforma continental brasileira e sua costa (MÄDER et al., 2010).

Alguns fatores têm sido apontados como particularmente importantes no enfraquecimento e mortalidade dos pinguins-de-Magalhães durante a migração, entre eles a contaminação dos oceanos com petróleo e derivados, os acidentes com redes de pesca, a ingestão de detritos antropogênicos e parasitoses gastrointestinais (FONSECA et al., 2001; MADER et al., 2010). Em 37% dos estômagos coletados

entre 2002-2003 no Rio Grande do Sul, foram registrados itens não orgânicos (MADER et al., 2007) e em 62% nas coletas mais recentes entre 2007-2009 (MÄDER et al. 2010).

Dentre as doenças de maior importância estão a aspergilose e a malária, porém outras desordens, infecciosas ou não, interferem e dificultam o processo de reabilitação (CLARKE e KERRY, 1993; ELLIS e BRANCH, 1994; CRANFIELD, 2003). O diagnóstico preciso e a instituição precoce de tratamento adequado podem contribuir favoravelmente para o sucesso na recuperação e conservação dessas aves.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1- AMOSTRAS VIRAIS

Foram utilizados dois sorotipos de avulavirus aviário: avulavirus aviário-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo/Brasil/2012 (Genbank HQ687899) e Avulavirus aviário-2 cepa ES-3/ *Spheniscus magellanicus* /Espírito Santo/Brasil/2012 (Genbank HQ687900). Esses vírus foram isolados a partir de material fecal coletados com suabes de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), em 2008, no litoral do Estado do Espírito Santo (FORNELLS et al., 2012).

3.2- PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE VÍRUS

As amostras armazenadas foram centrífugas a 1200*xg* e 0,2ml do sobrenadante de cada amostra foi inoculado na cavidade alantoide de ovos embrionados, SPF, entre 9 e 11 dias. Após a inoculação, os ovos foram incubados em estufa (NAPCO 4200) a 37 °C por 72 horas. O líquido alantoico coletado foi fracionado e analisado através dos testes de hemaglutinação (HA).

As amostras com um título de 128UHA foram selecionadas e agrupadas para ser submetido ao processo de purificação por ultracentrifugação, segundo metodologia descrita por (FORNELLS et al., 2012). Esta metodologia consiste em clarificação por 2800*xg* por 30 minutos a 6°C (centrífuga refrigerada microprocessada de bancada NT 815 Nova Técnica SP) depois foi concentrado a 65.000*xg* por uma hora a 6°C (rotor P50AT2 /ultra centrífuga CP90W X Hitachi.) e por fim purificado em gradiente de sacarose de 20% a 60% a 80.000*xg* por duas horas a 4°C (rotor P40ST). Após a purificação foram titulados por HA, fracionados e armazenados a -20°C.

3.3- PRODUÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES

Para produção dos soros policlonais IgG de camundongo anti AAV-10 e anti AAV-2 produzido no laboratório foi seguido o protocolo utilizado por Khattar et al. (2011). Cada cepa purificada por ultracentrifugação foi quantificada pelos seguintes métodos: método do ácido bicinconínico para a dosagem de proteína da suspensão viral; e a hemaglutinação para a obtenção de um título de 256UHA. Foi inoculado por via intraperitoneal 500µl da suspensão viral/animal contendo 100µg de proteína a um título de 256UHA em camundongos suíços, macho, com 21 dias de vida, de acordo com o seguinte protocolo: 4 inoculações com zero dias pós-inoculação (dpi), 21 dpi, 35 dpi, 50 dpi e 60 dpi, com posterior eutanásia para a coleta do sangue total. Os animais foram dispostos em mini isoladores multi espécies da marca Alesco de tamanho 42,5×23,5×17,5cm. Alojados 5 animais em cada caixa totalizando 10 animais em duas caixas, mantidos com água e comida *ad libitum*.

Os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico xilazina (10mg/Kg) associada à cetamina (80mg/Kg), e foi coletado sangue direto do coração, estes foram centrifugados a 600*xg*/10 minutos em centrífuga de bancada para obtenção de soro e armazenados a 4°C para posterior analise por imunohistoquímica.

O soro policlonal IgY de galinha SPF anti AAvV-10 foi gentilmente cedido por Dr. P. Miller (USDA, NVSL, Athens, GA), já o soro policlonal (IgY de galinha SPF anti-AAvV-2) foi adquirido do Animal and Plant Health Inspection Service/National Veterinary Services Laboratories (P. O. Box 844, Ames, IA 50010).

3.4- ÍNDICE DE PATOGENICIDADE EM CAMUNDONGOS

Para verificar o processo de replicação viral e patogenicidade nesse sistema hospedeiro foram utilizados, para cada vírus isolado, 12 camundongos machos Balb/C de quatro semanas de idade. Os animais foram alocados em mini isoladores multiespécies (ALESCO) de tamanho 42,5×23,5×17,5cm disposto em estante ventilada dentro de um isolador, mantido com pressão negativa com nível de segurança biológica compatível para o agente etiológico, mantidos com alimento e

água *ad libitum* para cada vírus separadamente. Os animais foram divididos em 04 grupos de 3 animais: 1 grupo controle negativo e 3 grupos infectados.

Os animais foram observados diariamente e pesados no início e ao final do experimento. Os camundongos contidos fisicamente foram inoculados por via oral com 150µL de líquido alantóico contendo um título de 256UHA. O grupo controle foi inoculado com líquido alantóico não infeccioso. A eutanásia foi realizada com um camundongo do grupo controle e 03 camundongos do grupo infectado por dose letal de anestésico xilazina (10mg/kg) associada a cetamina (80mg/kg) com 03 dpi e os outros com 7dpi e 14 dpi.

As necropsias foram realizadas imediatamente e amostras teciduais de cérebro, pulmão, intestino, rins, baço, coração e fígado foram coletadas. O fragmento de cada órgão foi armazenado em formalina neutra 10% por 48 horas para posterior análise por técnicas histopatológicas e imunohistoquímicas.

Figura 6: Foto da disposição dos camundongos acomodados em caixas multiespécies Alesco, dentro do isolador mantido com pressão negativa. Arquivo pessoal.

3.5- ÍNDICES DE PATOGENICIDADE EM AVES

Para verificar o processo de replicação viral e patogenicidade nesse sistema hospedeiro foram utilizados, para cada vírus isolado, 12 pintos de um dia de idade SPF. Os animais foram alocados em mini isoladores multiespécies (ALESCO) de tamanho 42,5×23,5×17,5cm e mantido com pressão negativa dispostos em estante ventilada com nível de segurança biológica compatível com o agente etiológico, mantidos com alimento e água *ad libitum* para cada vírus separadamente. Os animais foram divididos em 04 grupos de 3 animais: 1 grupo controle negativo e 3 grupos infectados.

Os animais foram observados diariamente e pesados no início e ao final do experimento. Os pintos contidos fisicamente foram inoculados por via oral com 200µL/animal de líquido alantóico com 256UHA e em outro experimento foi utilizado 50µl/animal por via respiratória a um título 256UHA. O grupo controle foi inoculado com líquido alantóico não infeccioso. A eutanásia foi realizada com um pinto do grupo controle junto com os 03 pintos do grupo infectado por dose letal de anestésico xilazina (10mg/kg) associado a cetamina (80mg/kg) com 03 dpi e os outros com 7dpi e 14 dpi.

As necropsias foram realizadas imediatamente e amostras de tecido cerebral, pulmão, intestino, rins, coração, fígado, traqueia, proventrículo e baço foram coletadas. O fragmento de cada órgão foi armazenado em formalina neutra 10% por 48 horas para posterior análise por técnicas histopatológicas e imunohistoquímicas.

Figura 7: Foto da disposição dos pintos acomodados em caixas multiespécies Alesco, dentro do isolador mantido com pressão negativa. Arquivo pessoal.

3.6- HEMAGLUTINAÇÃO (HA)

A atividade hemaglutinante das amostras foi verificada pela prova de hemaglutinação (HA), conforme normas preconizadas no Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (OIE, 2012). O título hemaglutinante foi definido a partir da maior diluição capaz de exercer atividade hemaglutinante completa (LENNETTE et al., 1995).

3.7- HISTOPATOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE CAMUNDONGO

Os tecidos (cérebro, pulmão, intestino, rim, baço, coração e fígado) de camundongos infectados e não infectados foram colocados em formalina neutra 10% por 48h e depois utilizados para os testes de histopatologia e imunohistoquímica.

Os tecidos foram cortados a 4µ submetidos ao processamento automático para as etapas de desidratação em banhos de álcoois, clarificação ou diafanização

em banhos de xilol, embebição em parafina, inclusão em parafina, seguido da microtomia, coloração usada na rotina, que foi a Hematoxilina e Eosina (HE), montagem das lâminas.

As observações por imunohistoquímica, dos cortes dos tecidos para detectar a proteína N dos avulavirus aviário foi realizada através do corte de seções de 4µ dos tecidos de camundongos infectados com cepa AAvV -2 e 10, fixados com formol a 10% por 48h, inclusas em parafina. São cortadas em lâminas histológicas silanizadas (Silano, Sigma-Aldrich, MO, USA). Após a desparafinização e procedimentos histológicos, a peroxidase endógena foi bloqueada por imersão em uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% durante 30 min. A recuperação antigênica foi realizada por incubação das amostras em tampão citrato (2,1 g de ácido cítrico em um litro de água destilada, pH 6,0) a 98 ° C durante 20 min. O material foi então, saturadas por uma solução de bloqueio com PBS 0,01 M (solução salina tamponada com fosfato) suplementada com 1% de leite em pó desnatado (Molico®) e 1% de BSA (albumina de soro bovino) durante 1 hora a 37 ° C, o material foi inativado e a solução de bloqueio descartada. Em seguida foram incubadas utilizando soro policlonal IgY de galinha SPF anti AAV-10 e anti AAV-2 com diluição (1:1000) em solução de bloqueio e , incubado a 4 C durante overnight em uma câmara úmida, no dia seguinte lavado com PBS tween por cinco minutos. O complexo de antigeno-anticorpo foi detectado com anticorpo secundário goat anti chicken IgY- HRP biotinilado por incubação durante 30 min à temperatura ambiente, seguido de tratamento com kit de conjugado de streptavidina peroxidase e lavados PBS tween. Revelados com kit cromógeno DAB (Dako, Carpentaria, EUA), A atividade da peroxidase foi detectada com solução de substrato tamponada e DAB (3,3'-diaminobenzidina). Os espécimes resultantes foram contracorados com hematoxilina Harris (Sigma-Aldrich - St. Lois - EUA) e montados com Permount (Fisher Chemical - EUA) para exame histológico. Foram incluídos controles negativos com omissão do anticorpo primário.

3.8- HISTOPATOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE PINTO

Os tecidos (coração, fígado, intestino, cérebro, pulmão, rim, baço e traqueia) de pintos de um dia infectados e não infectados foram colocados em formalina neutra 10% por 48h e depois utilizados para os testes de histopatologia e imunohistoquímica.

Os tecidos foram cortados a 04 µ e submetidos ao processamento automático para as etapas de desidratação em banhos de álcoois, clarificação ou diafanização em banhos de xilol, embebição em parafina, inclusão em parafina, seguido da microtomia, coloração usada na rotina, que foi a Hematoxilina e Eosina (HE), montagem das lâminas.

As observações por imunohistoquímica, dos cortes dos tecidos para detectar a proteína N dos avulavirus aviário avian foram realizadas através do corte de seções de 4µ dos tecidos de pintos infectados com ao cepa avulavirus aviário -2 e 10, fixados com formol a 10% por 48h, inclusas em parafina, contendo lesões teciduais. São cortados em lâminas histológicas silanizadas (Silano, Sigma-Aldrich, MO, USA). Após a desparafinização e procedimentos histológicos, a peroxidase endógena foi bloqueada por imersão em uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% durante 30 min. A recuperação antigênica foi realizada por incubação das amostras em tampão citrato (2,1 g de ácido cítrico em um litro de água destilada, pH 6,0) a 98 ° C durante 20 min. O material foi então, saturadas por uma solução de bloqueio com PBS 0,01 M (solução salina tamponada com fosfato) suplementada com 1% de leite em pó desnatado (Molico ®) e 1% de BSA (albumina de soro bovino) durante 1 hora a 37 C °, o material foi inativado e a solução de bloqueio descartada. Após. Então foram incubadas utilizando soro policlonal IgG de camundongo anti AAV-10 e AAV-2 utilizado (1:1000) diluído em solução de bloqueio e, incubado a 4 ° C durante overnight em uma câmara úmida, no dia seguinte lavado com PBS tween por cinco minutos. O complexo de antígeno-anticorpo foi detectado com anticorpobiotinilado de kit LSAB – HRP da DAKO (CA, USA) por incubação durante 30 min à temperatura ambiente, seguido de tratamento com kit de conjugado de streptavidina peroxidase e lavados com PBS tween. Revelados com kit cromógemo DAB (Dako, Carpentaria, EUA) durante 30 min. A atividade da peroxidase foi detectada com solução de substrato tamponada e DAB (3,3'-

diaminobenzidina). Os espécimes resultantes foram contracorados com hematoxilina Harris (Sigma-Aldrich - St. Lois - EUA) e montados com Permount (Fisher Chemical - EUA) para exame histológico. Foram incluídos controles negativos com omissão do anticorpo primário.

4 – RESULTADOS

AAvV-2/cepa ES-3

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Nos camundongos infectados com cepa ES-3 (AAvV-2), foi observada apenas uma leve prostração nos primeiros dias pós-inoculação, em seguida os animais não desenvolveram sinais clínicos aparentes até o final dos experimentos (14dpi).

Em pintos de um dia, essa alteração não foi observada e os animais não desenvolveram sinais clínicos aparentes até o final dos experimentos (14dpi).

HISTOPATOLOGIA

Nos dois experimentos (camundongos e pintos de um dia), não foi observada nenhuma lesão patológica passível de nota em nenhum dos órgãos avaliados em qualquer etapa dos estudos com 3, 7 e 14dpi.

IMUNOHISTOQUÍMICA

Análise por imunohistoquímica de tecidos coletados dos camundongos com 3dpi, o animal 1 foi positivo no fígado e intestino; o animal 2 foi positivo no fígado, intestino e rim; no animal 3, foram observados resultados positivos em todos os tecidos, exceto no coração. Nos animais com 7 dpi, o 1 animal foi positivo no fígado, intestino, baço e rim; o animal 2 foi positivo somente no intestino; o animal 3 foi positivo no coração, intestino, rim e cérebro. Nos animais com 14dpi, o animal 1 foi positivo no intestino, pulmão, rim e cérebro; os outros dois animais foram positivos apenas no intestino e rim. Todos os tecidos dos animais não infectados (controles negativos) com 3, 7 e 14dpi foram negativos. Esses resultados estão apresentados na tabela 3, figura 8.

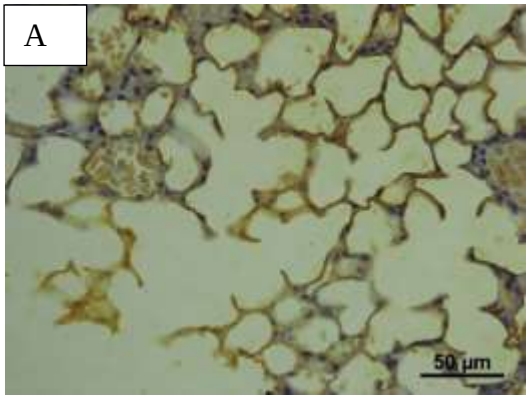
As análises dos tecidos coletados dos pintos de um dia com 3dpi, o animal 1 foi positivo no intestino e pulmão; o 2 no proventrículo; o 3 no proventrículo. Com 7dpi, o animal 1 foi positivo no intestino; o animal 2 foi positivo no proventrículo; o animal 3 foi positivo no intestino. Nos animais com 14dpi, o animal 1 foi positivo no

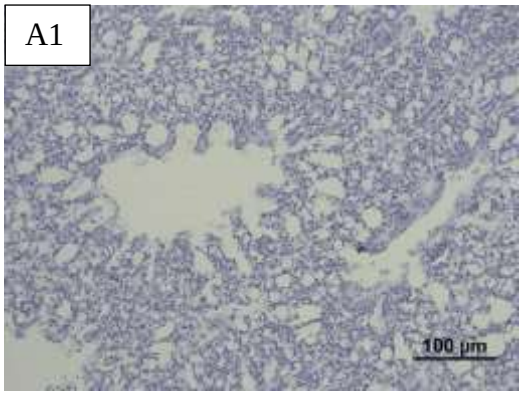
intestino e proventrículo; o animal 2 foi positivo no intestino e proventrículo; o animal 3 foi positivo somente no proventrículo. Todos os tecidos dos animais não infectados (controles negativos) com 3, 7 e 14dpi foram negativos. Os resultados podem ser visualizados na tabela 4, figura 9.

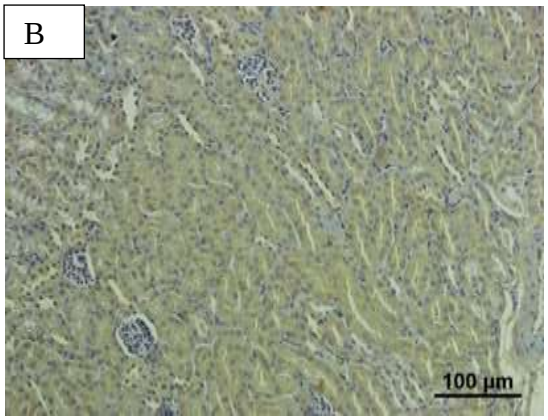
Tabela 3: Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de camundongos inoculado via oral com Avian avulavirus-2 cepa ES-3 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.

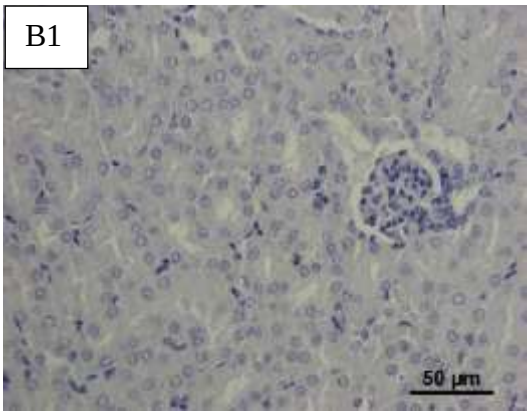
Dpi	Animal	Coração	Fígado	Baço	Intestino	Rim	Pulmão	SNC
3	1	-	+	-	+	-	-	-
	2	-	+	-	+	+	-	-
	3	-	+	+	+	+	+	+
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-
7	1	-	+	+	+	+	-	-
	2	-	-	-	+	-	-	-
	3	+	-	-	+	+	-	+
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-
14	1	-	-	-	+	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	-	-
	3	-	-	-	+	+	-	-
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-

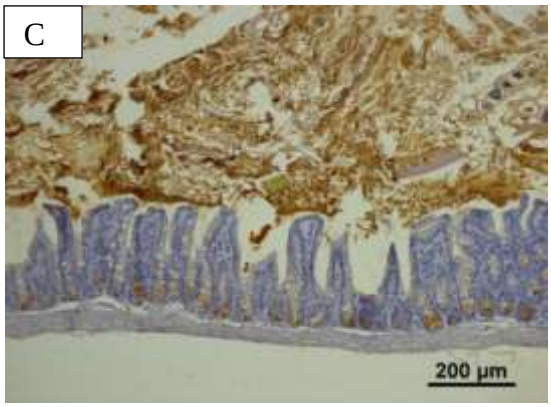
c.neg. = Controle negativo.

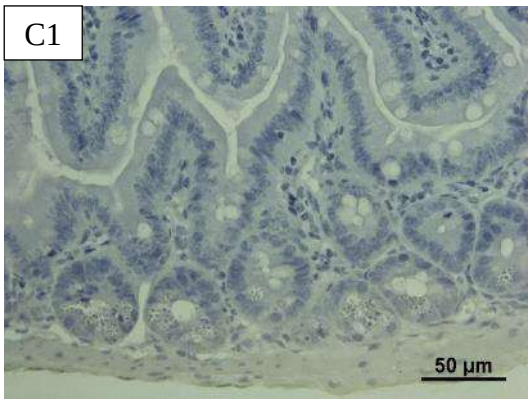


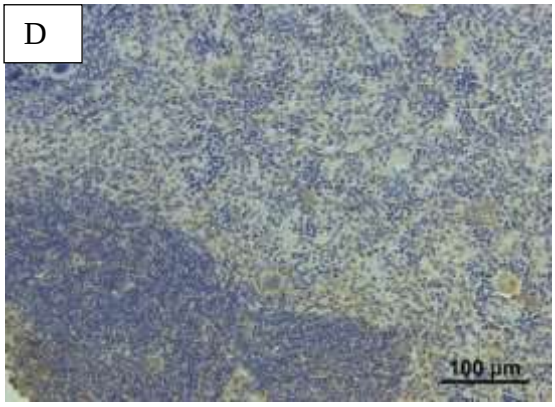


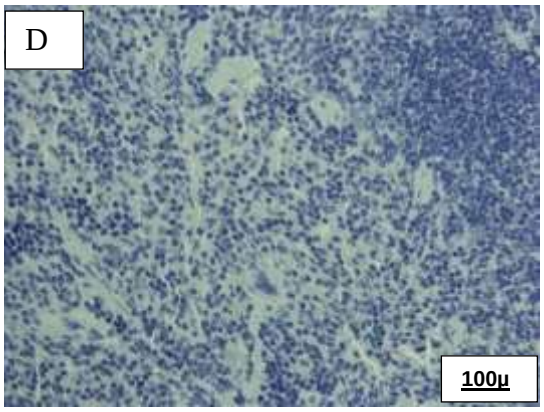

B
100 µm

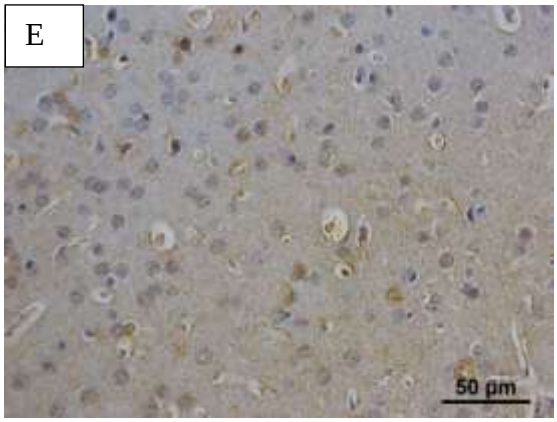

B1
50 µm

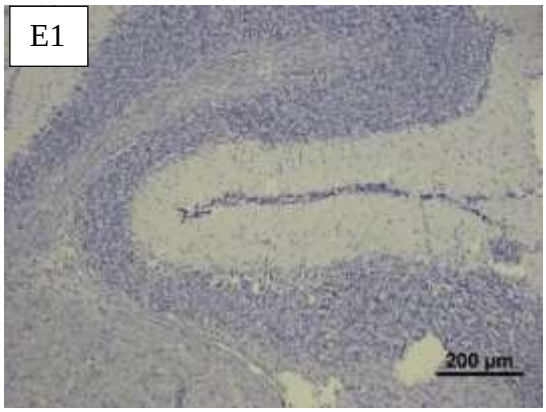

C
200 µm


C1
50 µm


D
100 µm


D
100µ


E
50 µm


E1
200 µm

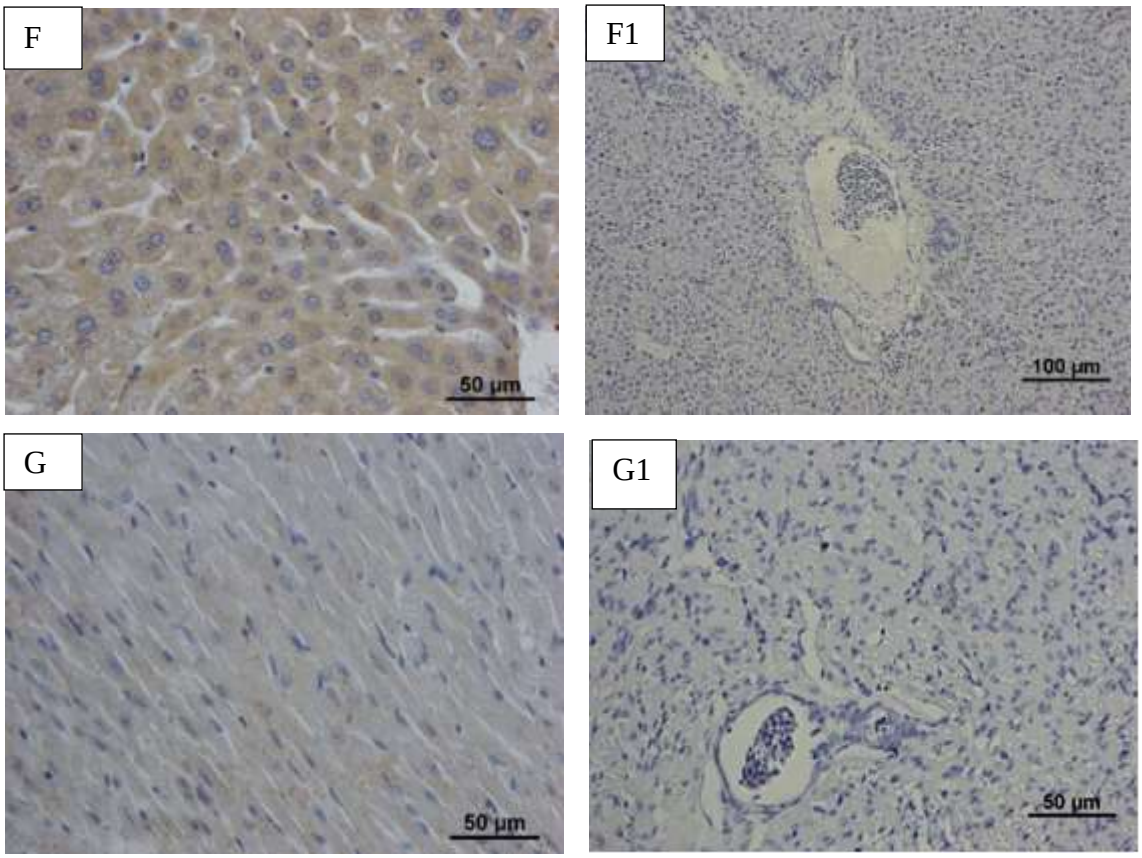
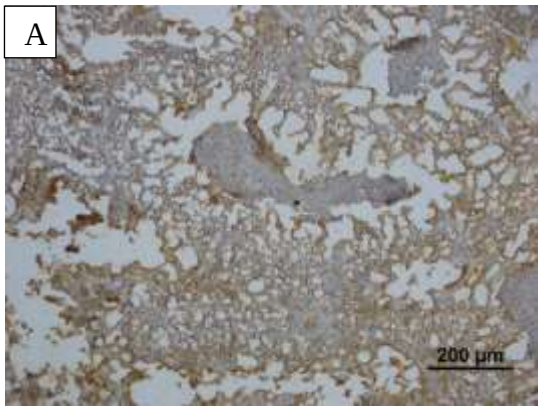


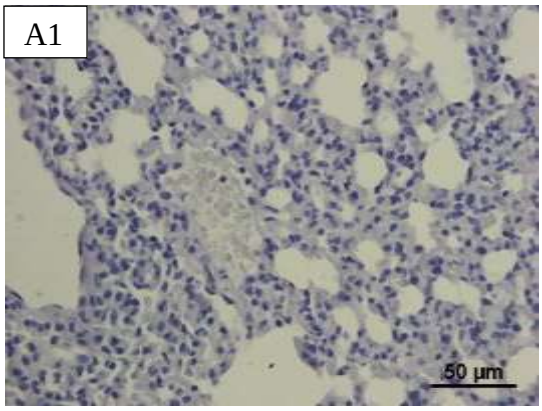
Figura 8: Imunohistoquímica em cortes de tecidos de camundongo inoculados via oral com Avian avulavirus -2 cepa ES-3 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA. **(A)** Pulmão – Presença de células escamosas, revestimento alveolar com citoplasma fortemente marcado pelo anticorpo; **(A1)** Pulmão - controle negativo, ambos com 3dpi; **(B)** Rim – Presença de túbulos renais corticais fortemente marcados pelo anticorpo; **(B1)** Rim - controle negativo, ambos com 3dpi; **(C)** Intestino – Presença de células epiteliais caliciformes com citoplasma fortemente marcado pelo anticorpo; **(C1)** Intestino - controle negativo, ambos com 14dpi; **(D)** Baço – Presença de linfócitos difusamente e modernamente marcados pelo anticorpo; **(D1)** Baço – controle negativo, ambos com 3dpi; **(E)** Sistema Nervoso Central – Presença de camada molecular e substância branca fortemente marcada pelo anticorpo; **(E1)** SNC – controle negativo, ambos com 14dpi; **(F)** Fígado – Presença de hepatócitos fortemente marcados pelo anticorpo; **(F1)** Fígado – controle negativo, ambos com 7dpi; **(G)** Coração – miocardiócitos fortemente marcado pelo anticorpo; **(G1)** Coração – controle negativo, ambos com 7dpi.

Tabela 4: Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pinto de um dia inoculado via oral com Avian avulavirus-2 cepa ES-3/*Spheniscus magellanicus*/Espírito Santo/Brasil/2012 com título de 256 UHA.

Dpi	Animal	Coração	Fígado	Traquei a	Intestino	Rim	Pulmão	SNC	Proventrículo
3	1	-	-	-	+	-	+	-	-
	2	-	+	-	+	-	-	-	+
	3	-	+	-	+	-	-	-	+
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	-	-	-	+
	3	-	-	-	+	-	-	-	-
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1	-	-	-	+	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	-	-	-	+
	3	-	-	-	-	-	-	-	+
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-	-

C. neg – Controle negativo.





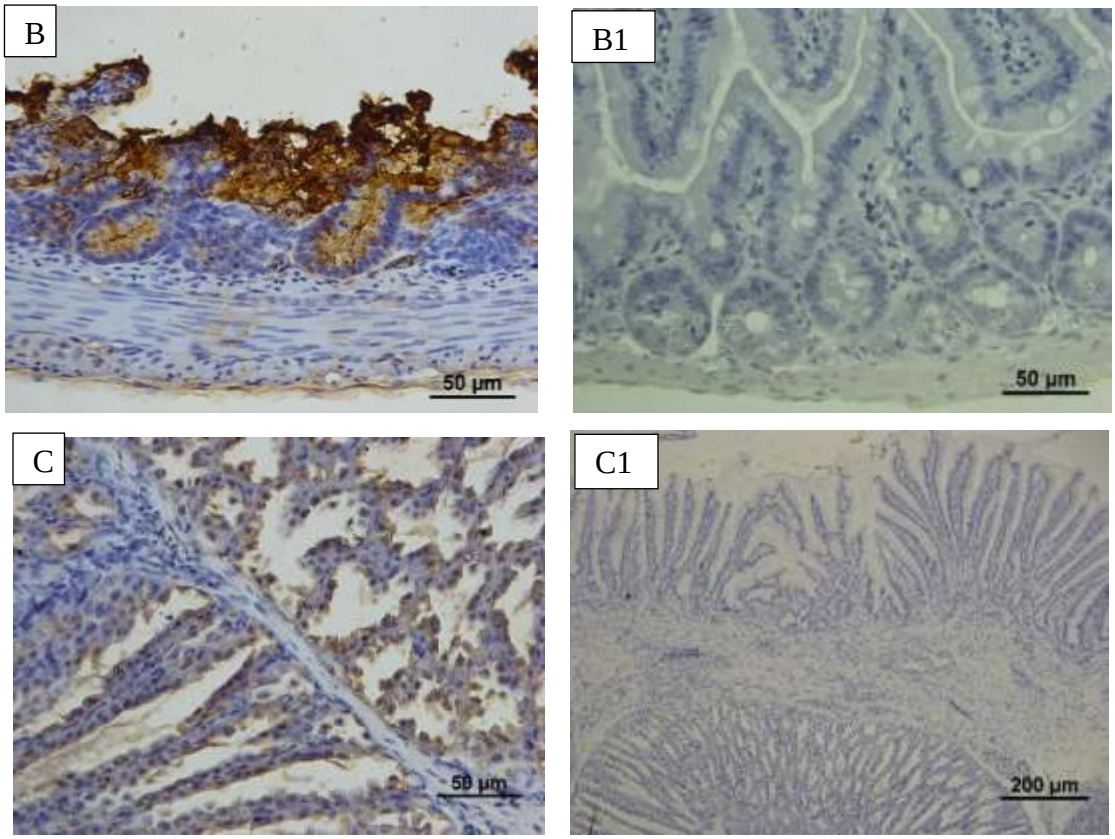


Figura 9: Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculados via oral com Avian avulavirus -2 cepa ES-3 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA. **(A)** Pulmão – Presença de células parenquimatosas e estromais fortemente marcados pelo anticorpo; **(A1)** Pulmão – controle negativo**,** ambos com 3dpi; **(B)** Intestino – Presença de células epiteliais caliciformes com citoplasma fortemente marcado pelo anticorpo; **(B1)** Intestino – controle negativo, ambos com 7dpi; **(C)** Proventrículo – Presença de glândula proventricular moderadamente marcada pelo anticorpo; **(C1)** Proventrículo - controle negativo, ambos com 14dpi.

AAvV-10/cepa ES-2

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Nos camundongos infectados com a cepa ES-2 (AAvV-10), não foi observada nenhuma alteração de comportamento, não desenvolveram sinais clínicos aparente até o final dos experimentos (14 dpi).

Em pintos de um dia, não foi observada nenhuma alteração e os animais não desenvolveram sinais clínicos aparentes até o final dos experimentos (14dpi).

HISTOPATOLOGIA

Nos dois experimentos (camundongos e pintos de um dia), não foi observado nenhuma lesão patológica passível de nota em nenhum dos órgãos avaliados em qualquer etapa dos estudos com 3, 7 e 14dpi.

IMUNOHISTOQUÍMICA

Todos os tecidos analisados por IHQ dos camundongos que foram inoculados com o vírus via oral com 3 dpi, foram negativos; dos animais com 7dpi, o animal 1 apresentou teste positivo no fígado e rim; o animal 2 apresentou teste positivo apenas no fígado; o animal 3 foi negativo em todos os tecidos. Nos tecidos dos animais com 14dpi, o animal 1 foi positivo no fígado, intestino e rim; o 2 foi positivo apenas no rim; o 3 foi negativo em todos os tecidos.

Todos os tecidos dos animais não infectados (controles negativos) com 3, 7 e 14dpi foram negativos. Os resultados das análises por imunohistoquímica estão apresentados na tabela 5 e figura 10.

Tabela 5: Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de camundongos inoculado via oral com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.

Dpi	Animal	Coração	Fígado	Baço	Intestino	Rim	Pulmão	SNC
3	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-
7	1	-	+	-	-	+	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	-	-	+	-	-
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-
14	1	-	+	-	+	+	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	+	-	-
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-

C. neg – Controle Negativo

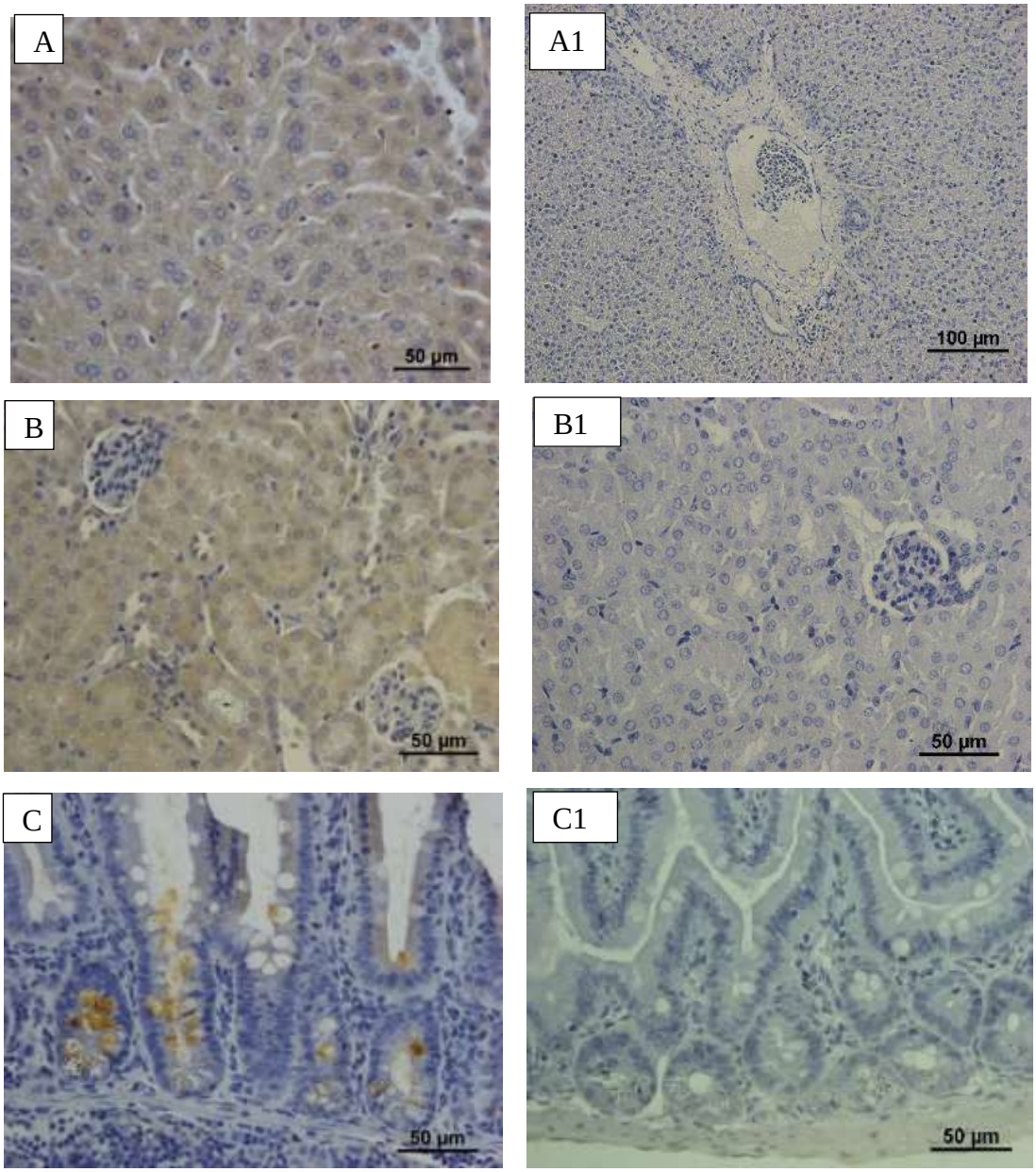


Figura 10: Imunohistoquímica em cortes de tecidos de camundongo inoculados via oral com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA. **(A)** Fígado – Presença de hepatócitos fortemente marcados pelo anticorpo; **(A1)** Fígado – controle negativo, ambos com 7dpi; **(B)** Rim - Presença de túbulos renais corticais fortemente marcados pelo anticorpo; **(B1)** Rim – controle negativo, ambos com7dpi; **(C) Intestino -** Presença de células epiteliais caliciformes com citoplasma fortemente marcado pelo anticorpo; **(C1)** Intestino -controle negativo, ambos com 14dpi.

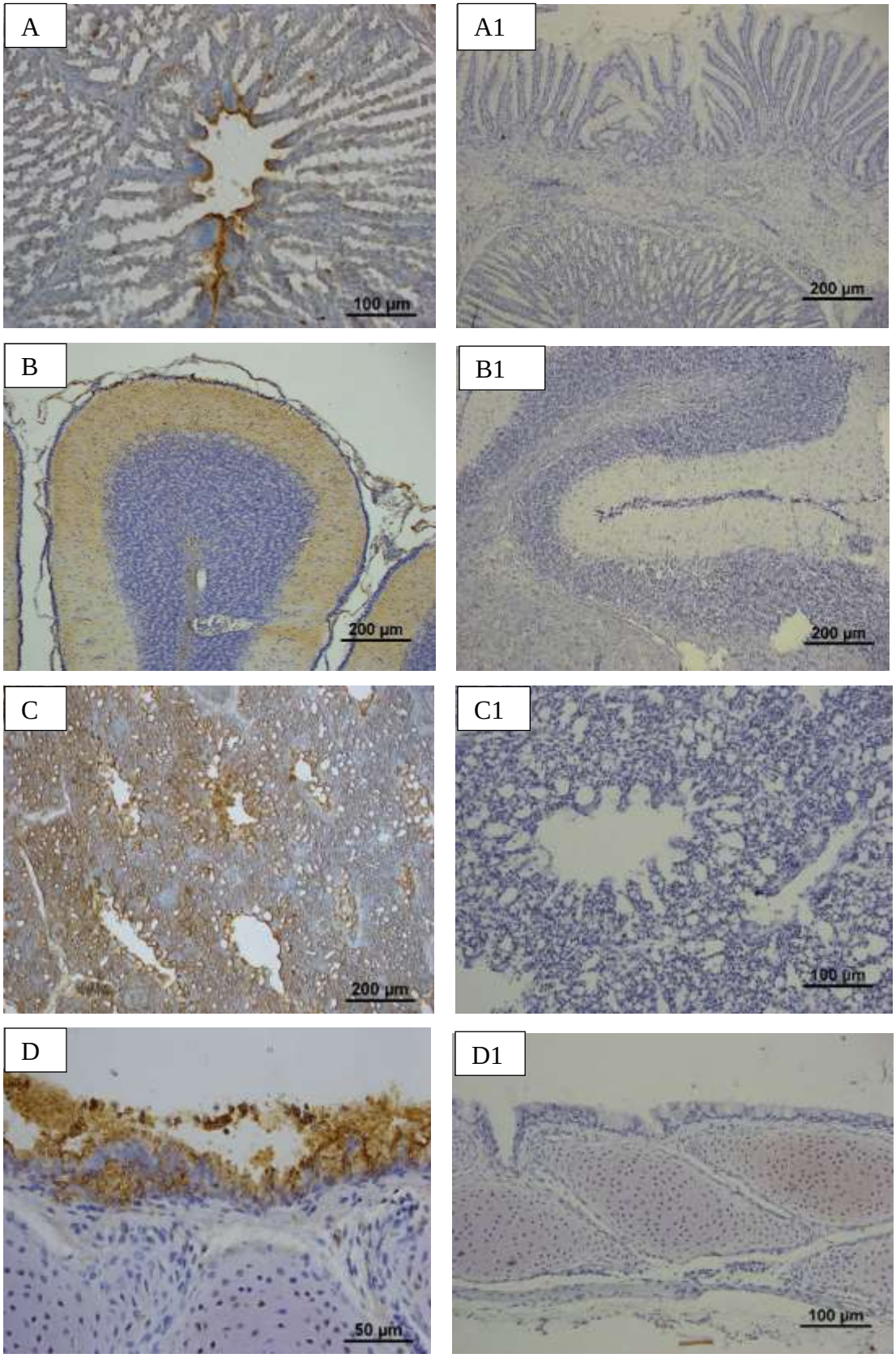
As análises por IHQ dos tecidos coletados dos pintos de um dia que foram inoculados com o vírus por via oral, foram: com 3dpi, o animal 1 foi positivo no intestino, pulmão, cérebro e proventrículo; o animal 2 positivo no coração, fígado, intestino, pulmão, cérebro e proventrículo; o animal 3 foi positivo no coração, fígado, traqueia, intestino, pulmão, cérebro e proventrículo. Nos tecidos dos animais com 7dpi, o animal 1 foi positivo no fígado, cérebro e proventrículo; o animal 2 foi positivo no coração, fígado, intestino, pulmão, cérebro e proventrículo; o animal 3 foi positivo no coração, fígado, intestino, pulmão, cérebro e proventrículo. Nos animais com 14dpi, o animal 1 foi positivo no coração, fígado, intestino, pulmão, cérebro e proventrículo; o animal 2 foi positivo no coração, fígado, intestino, pulmão, cérebro e proventrículo; o 3 foi positivo no coração, fígado, pulmão, cérebro e proventrículo.

Todos os tecidos dos animais não infectados (controles negativos) com 3, 7 e 14dpi foram negativos. Os resultados das análises por imunohistoquímica estão apresentados na tabela 6 e figura 11.

Tabela 6: Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculado via oral com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.

Dpi	Animal	Coração	Fígado	Traqueia	Intestino	Rim	Pulmão	SNC	Proventrículo
3	1	-	-	-	+	-	+	+	+
	2	+	+	-	+	-	+	+	+
	3	+	+	+	+	-	+	+	+
	c. neg	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1	-	+	-	-	-	-	+	+
	2	+	+	-	+	-	+	+	+
	3	+	+	-	+	-	+	+	+
	c. neg	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1	+	+	-	+	-	+	+	+
	2	+	+	-	+	-	+	+	+
	3	+	+	-	-	-	+	+	+
	c.neg.	-	-	-	-	-	-	-	-

C. neg – Controle negativo


A
100 µm
A1
200 µm
B
200 µm
B1
200 µm
C
200 µm
C1
100 µm
D
50 µm
D1
100 µm

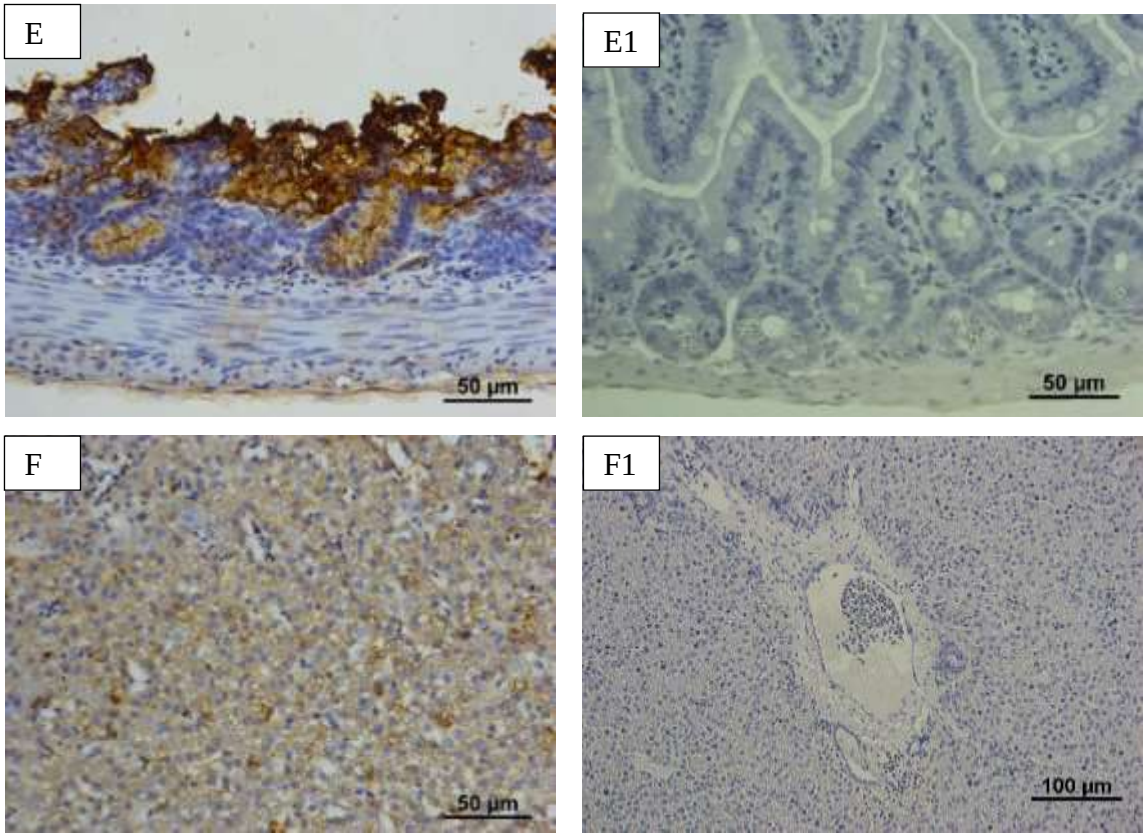


Figura 11: Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculados via oral com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA. **(A)** Proventrículo – Presença de glândula proventricular moderadamente marcada pelo anticorpo; **(A1)** Proventrículo – controle negativo, ambos com 7dpi; **(B)** Sistema Nervoso Central – Presença de camada molecular e substância branca fortemente marcada pelo anticorpo; **(B1)** SNC – controle negativo, ambos com 7dpi; **(C)** Pulmão – Presença de região atrial fortemente marcada pelo anticorpo; **(C1)** Pulmão – controle negativo, ambos com 3dpi; **(D)** Traquéia – Presença de mucosa traqueal fortemente marcado; **(D1)** Traquéia – controle negativo, ambos com 3dpi; **(E)** Intestino – Presença de células epiteliais caliciformes com citoplasma fortemente marcado pelo anticorpo; **(E1)** Intestino – controle negativo, ambas com 14dpi; **(F)** Fígado – Presença de hepatócitos fortemente marcado pelo anticorpo; **(F1)** Fígado - controle negativo, ambos com 14dpi.

As análises por IHQ dos tecidos coletados dos pintos de um dia que foram inoculados com o vírus via respiratório, foram: com 3dpi, o animal 1 foi positivo no fígado, traqueia, pulmão, cérebro e proventrículo; o animal 2 foi positivo no fígado, traqueia, pulmão, intestino, cérebro e proventrículo; o animal 3, foi positivo no fígado,

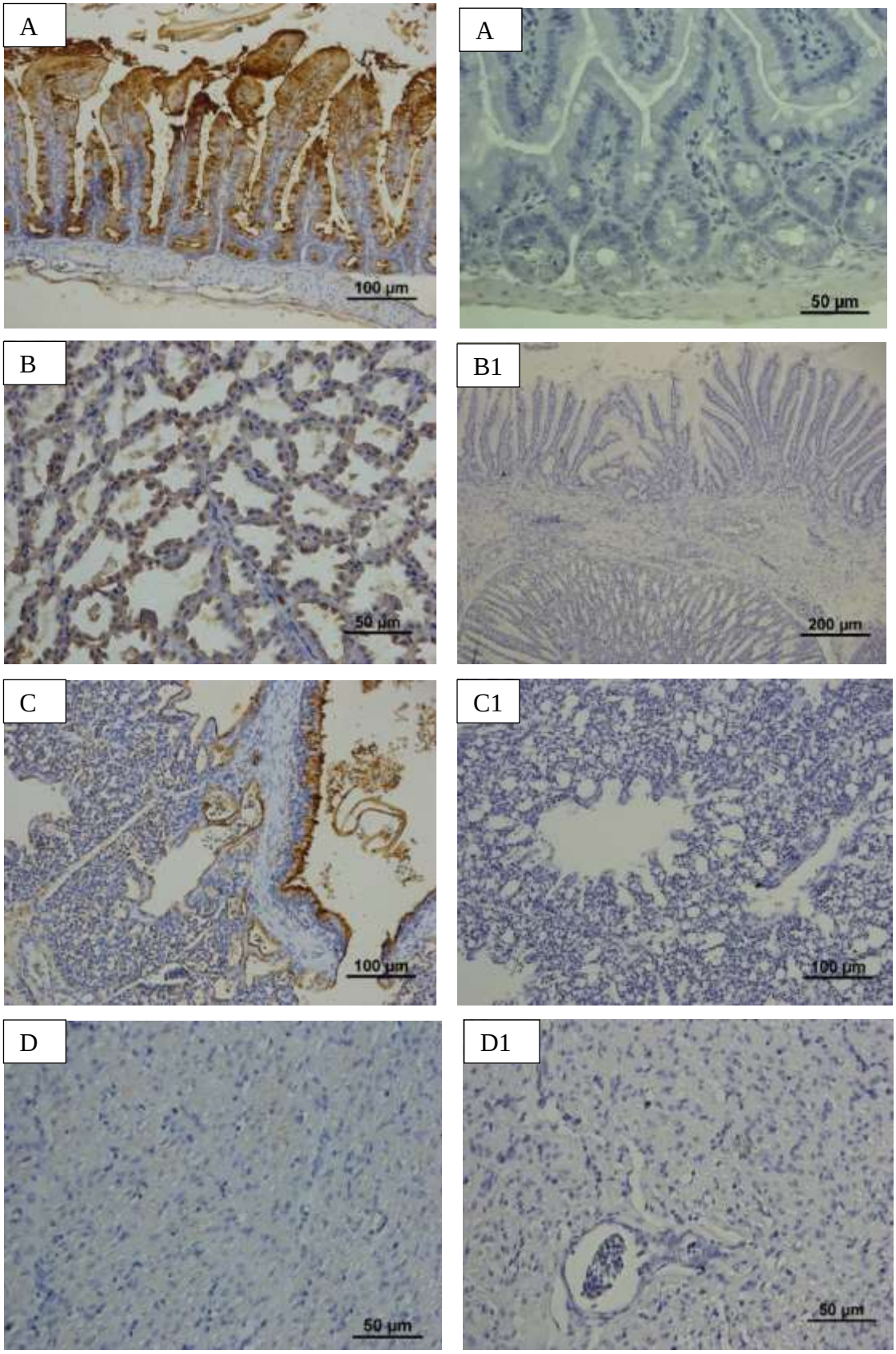
traqueia, intestino e proventrículo. Nos tecidos dos animais com 7dpi, o animal 1 foi positivo no coração, fígado, intestino, pulmão, cérebro e proventrículo; o animal 2 foi positivo no fígado, traqueia, intestino, pulmão, cérebro e pró-ventrículos; o animal 3 foi positivo no coração, fígado, traqueia, pulmão, cérebro e proventrículo. Nos animais com 14dpi, o animal 1 foi positivo no coração, pulmão, cérebro e proventrículo; o 2 foi positivo no coração, fígado, intestino, pulmão, cérebro e proventrículo; o animal 3 foi positivo no coração, fígado, traqueia, pulmão, cérebro e proventrículo.

Todos os tecidos dos animais não infectados (controles negativos) com 3, 7 e 14dpi foram negativos. Os resultados das análises por imunohistoquímica estão apresentados na tabela 7 e figura 12.

Tabela 7: Resultados das análises por Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculado via respiratória com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA.

Dpi	Animal	Coração	Fígado	Traqueia	Intestino	Rim	Pulmão	SNC	Proventrículo
3	1	-	+	+	-	-	+	+	+
	2	-	+	+	+	-	+	+	+
	3	-	+	+	+	-	-	-	+
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1	+	+	-	+	-	+	+	+
	2	-	+	+	+	-	+	+	+
	3	+	+	+	-	-	+	+	+
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-	-
14	1	+	-	-	-	-	+	+	+
	2	+	+	-	+	-	+	+	+
	3	+	+	+	-	-	+	+	+
	c. neg.	-	-	-	-	-	-	-	-

C.neg – Controle Negativo.


A
100 µm
A
50 µm
B
50 µm
B1
200 µm
C
100 µm
C1
100 µm
D
50 µm
D1
50 µm

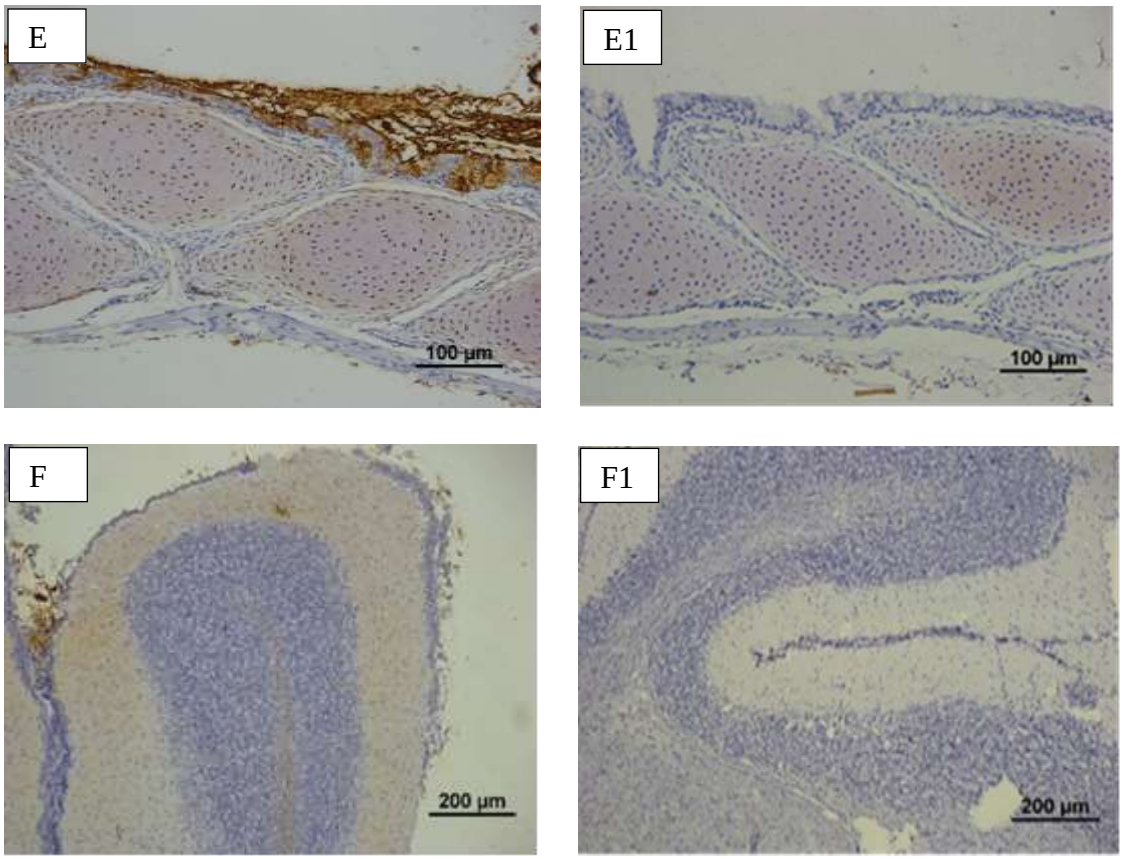


Figura 12: Imunohistoquímica em cortes de tecidos de pintos de um dia inoculados via respiratório com Avian avulavirus-10 cepa ES-2 /*Spheniscus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 com título de 256 UHA. **(A)** Intestino – Presença de células epiteliais caliciformes com citoplasma fortemente marcado pelo anticorpo; **(A1)** Intestino - controle negativo, ambos com 3dpi; **(B)** Proventrículo – Presença de glândula proventricular moderadamente marcada pelo anticorpo; **(B1)** Proventrículo – controle negativo, ambos com 3dpi; **(C)** Pulmão – Presença de células escamosas, revestimento alveolar com citoplasma fortemente marcado pelo anticorpo; **(C1)** Pulmão – controle negativo, ambos com 7dpi; **(D)** Coração - miocardiócitos fortemente marcado pelo anticorpo; **(D1)** Coração – controle negativo, ambos com 7dpi; **(E)** Traquéia – Presença de mucosa traqueal fortemente marcado; **(E1)** Traquéia – controle negativo, ambos com 14dpi; **(F)** Sistema Nervoso Central – Presença de camada molecular e substância branca fortemente marcada pelo anticorpo; **(F1)** SNC - controle negativo, ambos com 14dpi.

5 – DISCUSSÃO

Os camundongos foram avaliados quanto à susceptibilidade, doença clínica, local de replicação em diferentes tecidos por análise histopatológicas e imunohistoqúimica. Nos animais infectados, foi observada apenas uma breve prostração nos primeiros dias pós-inoculação e em seguida, não desenvolveram sinais clínicos aparentes até o final dos experimentos (14dpi). Esse resultado não está de acordo ao observado por Kattar et al., (2011) onde utilizando o AAvV-2 cepa chicken/Yucaipa/Califórnia/56, inoculados por via respiratória em camundongos BALB/c causou perda de peso acentuada e desenvolvimento de sinais clínicos moderados em alguns animais.

As análises histopatológicas não revelaram nenhuma lesão passível de nota em nenhum dos órgãos avaliados em qualquer etapa do estudo (3, 7 e 14dpi) apesar de ter sido detectado, por IHQ, a presença de antígenos em vários órgãos. Por exemplo, nos animais infectados com o AAvV-2 com 3dpi foi detectada a presença de antígenos virais no fígado, baço, intestino, pulmão, rim e cérebro. Nos animais com 7dpi detectamos a presença de antígenos virais no coração, fígado, baço, intestino, rim e cérebro. Nas amostras dos animais com 14dpi detectamos a presença de antígenos virais no intestino, pulmão, rim e cérebro.

No presente estudo, por ordem de magnitude, a detecção de antígenos virais foi: intestino, onde todos os animais 9 de 9, em qualquer período (3, 7 e 14dpi) foram positivos; seguido do rim (7 de 9 animais positivos, 2 com 3dpi, 2 com 7dpi e 3 com 14dpi), fígado (4 animais positivos até 7dpi), cérebro (3 positivos, um em cada período), baço (2 positivos até 7dpi), pulmão (2 positivos, um com 3dpi e outro com 14dpi) e coração (um animal com 7dpi). Esses resultados demonstraram que o vírus foi disseminado para vários órgãos inclusive o cérebro. Assim é possível afirmar que o Avian avulavirus-2 cepa ES-3 /*Sphenicus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 quando inoculado via oral, é viscerotrópico e neurotrópico. Os resultados estão em contraste com os achados utilizando dois sistemas hospedeiros (camundongos e hamster), inoculados via respiratória com AAvV-2 cepa chicken/Yucaipa/Califórnia/56,

onde a detecção de antígenos virais foi restrita ao sistema respiratório: turbinados nasais e pulmão (KATTAR et al., 2011; SAMUEL et al., 2011).

As discrepâncias podem ser devido a: diferenças entre as respostas imunes das vias de inoculação (respiratória X oral); pequenas alterações genéticas do vírus podem ocorrer entre isolados de espécies hospedeiras diferentes – o AAvV-2 cepa ES-3 utilizada apresenta 93% de homologia com o AAvV-2 cepa Bangor de acordo com Fornells et al., (2012). Essas diferenças levantam a hipótese de uma maior capacidade do AAvV-2 cepa ES-3 /*Sphenicus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 ocasionar infecção generalizada em camundongos quando inoculado por via oral, comparada ao AAvV-2 (cepa Yucaipa) inoculado por via respiratória. Entretanto, análises complementares se fazem necessárias para confirmação da hipótese.

Em pintos SPF de um dia, as análises histopatológicas dos tecidos dos animais inoculados, via oral, com o Avian avulavirus -2 cepa ES-3 /*Sphenicus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012 não revelaram nenhuma lesão patológica passível de nota em nenhum dos órgãos avaliados em qualquer etapa do estudo (3, 7 e 14dpi). Entretanto, as análises por IHQ revelaram a presença de antígenos virais em alguns órgãos. Por exemplo, dos nove (9) animais infectados: seis foram positivos no proventrículo; cinco foram positivos no intestino; e apenas um animal foi positivo no pulmão. Não foi detectada a presença de antígenos virais, em nenhum animal nos outros tecidos analisados (coração, fígado, traqueia, rim e cérebro). Diante desses resultados, concluímos que o sistema hospedeiro pintos de um dia de vida é susceptível ao AAvV-2 (cepa ES-3) quando inoculados por via oral; foi disseminado e detectado por IHQ no intestino, proventrículo e pulmão.

Comparando os resultados com os encontrados por Kim et al. (2012), o qual utilizou o AAvV-2 (cepa Yucaipa), foi possível observar que existem diferenças entre os dois experimentos. No presente estudo, a detecção de antígenos virais por IHQ, foi quase que restrita ao intestino e proventrículo. No trato respiratório, apenas um animal, foi detectada por IHQ, a presença de antígenos virais no pulmão. Resultados diferentes apresentados por Kim et al. (2011), onde a detecção de antígenos virais foi restrita ao trato respiratório. Essa diferença provavelmente está, como sugerida no experimento com camundongos, relacionada às respostas imunes das vias de

inoculação utilizadas nos estudos. De qualquer maneira, os resultados apresentados nos dois estudos estão coerentes com a via de inoculação escolhida.

O objetivo do presente estudo foi realizar infecção experimental de camundongos e pintos de um dia com AAvV-10, cepa ES-2 /*Sphenicus magellanicus*/ Espírito Santo / Brasil / 2012. Os camundongos foram inoculados por via oral; nos pintos, FORAM REALIZADOS dois experimentos: um os animais foram inoculados via oral o outro por via respiratória. Os animais foram avaliados quanto à susceptibilidade, doença clínica, local de replicação em diferentes tecidos por análise histopatológicas e imunohistoquímica.

Nos três experimentos, os animais não desenvolveram sinais clínicos aparentes até o final dos experimentos (14 dpi).

As análises histopatológicas nos três experimentos não revelaram nenhuma lesão passível de nota em nenhum dos órgãos avaliados em qualquer etapa do estudo (3, 7 e 14 dpi) apesar de ter sido detectado, por IHQ, a presença de antígeno viral em vários órgãos.

Nos camundongos infectados com 3dpi, em todos os tecidos analisados por imunohistoquímica, não foi detectada a presença de antígenos virais. Os animais com 7dpi: um animal foi positivo no fígado e rim e outro apenas no fígado. Com 14dpi dois animais foram positivos, um no fígado, intestino e rim e o outro apenas no rim. Por ordem, a detecção de antígenos virais foi: fígados, três animais positivam dois com 7 dpi e um com 14 dpi; rim com três animais positivos, um com 7 dpi e dois com14 dpi; intestino apenas um animal foi positivo com 14dpi. Esses achados demostram que o sistema hospedeiro camundongos foi susceptível ao AAvV-10 cepa ES-2, o vírus foi disseminado para vários órgãos, porém os animais infectados não desenvolveram sintomas clínicos, caracterizando uma infecção subclínica.

As análises por IHQ dos tecidos dos pintos inoculados via oral, revelaram a presença de antígenos virais em vários órgãos. Por exemplo, dos nove (9) animais infectados, nove foram positivos no cérebro e proventrículo; oito foram positivos no fígado e pulmão; sete foram positivos no coração e intestino; um foi positivo na traqueia. Não foi detectada a presença de antígeno viral no rim em nenhum animal nesse experimento.

Resultados semelhantes foram observados nos pintos inoculados por via respiratória: nove animais foram positivos no proventrículo; oito foram positivos no cérebro, pulmão e fígado; seis foram positivos na traqueia; cinco no intestino e coração. No rim, todos foram negativos. Comparando os resultados por IHQ nos experimentos (via oral x via respiratória) não observamos diferenças significativas com exceção da traqueia, onde seis animais foram positivos quando inoculados por via respiratória, entretanto, apenas um animal foi positivo quando inoculado via oral.

No presente estudo, apesar de não termos realizado o teste de morte embrionária, os ovos embrionados (aproximadamente 60 ovos) inoculados via cavidade alantoide para produção e posterior purificação de vírus, não APRESENTARAM morte embrionária até 72 horas pós-inoculação e boa parte dos líquidos alantóicos coletados os títulos variaram de 64 a 256 UHA. Diante desses resultados, concluímos que o sistema hospedeiro (pintos de um dia de vida), foram susceptível ao AAvV-10 (cepa ES-2) inoculado por ambas as vias (oral e respiratória) e que, apesar de ter sido disseminado para vários órgãos, inclusive o cérebro, sugerimos que essa cepa seja de baixa virulência. Os resultados, de certa forma, parecem estar de acordo com os resultados apresentados por Miller et al. (2017) com a cepa de AAvV-10 isolada de pinguins-saltador-de-rochas (*Rockhopper penguins*) nas Ilhas Falklands, a qual apresenta 93% de homologia com a cepa AAvV-10 ES-2 utilizada neste estudo. Os mesmos autores demonstraram que o tempo médio de morte embrionária foi superior a 90 h, sem mortalidade após 7 dias, sugerindo um vírus de baixa virulência para galinhas; quando o vírus foi inoculado no cérebro de frangos SPF de um dia, o valor do índice de patogenicidade intracerebral (ICPI) obtido foi 0,00, sem sinais clínicos de doença. Além disso, após inoculação intravenosa de vírus vivo em aves adultas para a produção de antissoro, o título hemaglutinante do soro após 18 dias foi de 1024 e as aves permaneceram clinicamente normais sem sinais de doença.

6 – CONCLUSÃO

O sistema hospedeiro – camundongo foi susceptível às cepas de avulavirus aviário-10/ES-2/*Spheniscus mangellanicus*/2012 e avulavirus aviário -2/ES-3/*Spheniscus magellanicus*/2012 inoculados pela via oral;

O sistema hospedeiro – pintos de um dia de idade, foi susceptível às cepas de avulavirus aviários-10/ES-2/*Spheniscus mage*ll*anicus*/2012 e avulavirus aviário -2/ES-3/*Spheniscus magellanicus*/2012 inoculados pela via oral;

O sistema hospedeiro – pintos de um dia de idade, foi susceptível à cepa avulavirus aviário-10/ES-2/*Spheniscus magellanicus*/2012 inoculado pela via respiratória;

Ambos os vírus, apesar de serem infecciosos para os dois sistemas hospedeiros, não induziram nenhum sintoma clínico aparente e sendo assim sugere-se que podem ser considerados de baixa virulência, mas novos estudos devem ser realizados;

Ambos os vírus causaram infecção generalizada nos dois sistemas hospedeiros, uma vez que, a presença dos antígenos virais foi detectada em vários órgãos.

7 - REFERÊNCIAS:

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2015**. Relatorioanual_UBABEF_2015_digital.pdf. 2015.

Alexander, D. J., Bell, J. G., Alders, R. G. **Review: Newcastle Disease — With Special Emphasis on Its Effects on Village Chickens,** Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome chapter 1–3. 2004.

Alexander, D. J., Senne, D. A. **Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections**, p. 75–116. In Saif, Y. M., Fadly, A. M., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Nolan, L. K., and Swayne, D. E. Diseases of poultry, 12th ed. Iowa State University Press. 2008.

Alexander. D.J. **Avian paramyxoviruses 2–9**. In: Saif, Y.M. Diseases of Poultry, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, 88–92. 2003.

Alexander. D.J.**Newcastle disease**, In: Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE, eds. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**, 3rd ed. Pp. 114–120. The American Association of Avian Pathologists, Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque. 1989.

Alkhalaf, A. N. **Serological evidence of avian paramyxovirus- 2 infection in backyard and commercial poultry birds in Saudi Arabia**. Pak. Vet. J. 29, 107–109. 2009.

Beck, I., Gerlach, H., Burkhardt, E., Kaleta, E. F. **Investigation of several selected adjuvants regarding their efficacy and side effects for the production of a vaccine for parakeets to prevent a disease caused by a paramyxovirus type 3. Vaccine**, 21:1006-1022. 2003.

Boere, G. C., Stroud, D. A. **The Flyway Concept: What It Is and What It Isn't.** In: Boere, G. C., Galbraith, C. A., Stroud, D. A. **The Genesis and Evolution of the**

Caspian Sea Lagoons as Avifauna Refuges at the Transboundary Scale. Eds., Waterbirds around the World, The Stationery Office, pp.40-47. 2006.

Boersma, P.D. **Penguins as Marine Sentinels**. Bioscience 58: 597–607. 2008.

Briand, F.X., Henry, A., Massin, P., Jestin, V. **Complete genoma sequence of a novel avian paramyxovirus**. J. Virol. 86, 7710. 2012.

Briand, F. X., Henry, A., Massin, P., Jestin, V. **Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus.** J. Virol. 86, pp.7710. 2012.

Bui, V. N., Mizutani, T., Nguyen, T. H., Trinh, D. Q., Awad, S. S., Minoungou, G. L., Yamamoto, Y., Nakamura, K., Saito, K., Watanabe, Y., Runstadler, J., Huettmann, F., Ogawa, H., Imai, K. **Characterization of a genetic and antigenic variantof avian paramyxovirus 6 isolated from a migratory wild bird, the red-neckedstint (Calidris ruficollis).** Arch. Virol. 159, 3101–3105. 2014.

Calain, P., Roux, L. **The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA**. J Virol 67: 4822–4830. 1993.

Campitelli, L., Mogavero, E., De Marco, M. A., Delogu, M., Puzelli, S., Frezla, F., Fachini, M., Chiapponic, C., Foni, E. **Interspecies transmission of na H7N3 influenzavirus from wild birds to intensively reared domestic poultry in Italy.** Virology, 323, pp. 24-26. 2004.

Capua, I., De Nardi, R., Beato, M. S., Terregino, C., Scremin, M., Guberti, V. **Isolation of an avian paramyxovirus type 9 from migratory waterfowl in Italy**. Vet Rec, 155:156. 2004.

Carlos, C. J., Fedrizzi C. E., Azevedo-Junior, S. M. **Notes on some seabirds of Pernambuco state, north-east Brazil.** Bulletin of British Ornithological Club, 125 (2): 140-147. 2005.

CEMAVE/ICMBio – Centro Nacional de Pesquisa para Conservação das Aves Silvestres. Aves Migratória na Amazônia e a Gripe Aviária, boletim 35/2006. 2006.

Clarke, J., Kerry, K. R. **Diseases and Parasites of penguins Korean**. Journal of Polar Research. v. 4 (2) p. 79-96. 1993.

Collier, L., Balows, A., Sussman, M. **Virology in Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections,** vol.1, pp. 435–453, Oxford University Press, New York, NY, USA, 9th ed. 1998.

Cranfield, M. **Plasmodium juxtanucleare associado com mortalidade em pinguins de pata preta (Spheniscus demersus) admitidos em um centro de reabilitação**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 34(3): 250-255, 2003.

Dimitrov, K., Ramey, A, Qiu, X., Bahl, J., Afonso, C. **Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus).** Infect. Genet. Evol. 39, 22–34. 2016**.**

DiNapoli, J. M., Ward, J. M., Cheng, L. **Delivery to the lower respiratory tract is required for effective immunization with Newcastle disease virus-vectored vaccines intended for humans**. Vaccine, vol. 27, n°. 10, pp. 1530–1539. 2009.

Dufour-Zavala, D. E., Swayne, J. R., Glisson; **American Association of Avian Pathologists,** 5th ed., p. 135–141. 2008.

Ellis, S., Branch, S. **Penguin Husbandry Mamal**. Editora AZA, EUA, p. 134. 1994.

Estevez, C., King, D., Seal, B., Yu, Q. **Evualation of NewCastle disease vírus chimeras expressing the hemagglutinin-neuraminidase protein of velogenic strains in the contexto f a mesogenic recombinant vírus backbone**. Virus Res., 129:182-190. 2007.

Fonseca, V. S., Petry, M. V., Jost, A. H**. Diet os de Magellanic Penguin on the coast os Rio Grande do Sul, Brazil.** Waterbirds, vol. 24(2). Pp 290-293. 2001.

Fornells, L. A. M. G., Silva, T. F., Bianchi, I., Travassos, C. E. P.F., Liberal, M. H. T., Andrade, C. M., Petrucci, M. P., Veiga, V. F., Vaslin, M. F. S., Couceiro, J. N. S. S. **Detection of paramyxoviruses in Mangellanic pingüins (*Spheniscus magellanicus*) on the Brazilian tropical coast. Vet. Microbiology**. 156 p: 429-433. 2012.

Fornells, L. A., Travassos, C. E., Costa, C. M., Novelli, R., Petrucci, M. P., Soffiati, F. L., Bianchi, I., Souza, L. F., Veiga, V. F., Liberal, M. H., Couceiro, J. N. **Detection of avian paramyxoviruses in migratory and resident birds in the state of Rio de Janeiro, Brazil.** Avian Dis. 57, 780–784. 2013.

Ganar, K., Das, M., Sinha, S., Kumar, S**. Newcastle disease virus: current status and our understanding**. Virus Res. 187C, pp. 71–81. 2014.

García-Borboroglu, P., Boersma, P. D., Ruoppolo, V., Silva, R.P., Adornes, A.C., Conte-Sena, D., Velozo, R. Myiaji-Kolesnikovas, C., Dutra, G., Maracini, P., Carvalho-do-Nascimento, C., Ramos-Júnior, V., Barbosa, L., Serra, S. **Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast.** Marine Pollution Bulletin. 60 1652–1657. 2010.

Gogoi, P., Ganar, K., Kumar, S., **Avian Paramyxovirus: A Brief Review**, Indian Institute of Technology Guwahati, Transboundary and Emerging Diseases. 64/53–67. 2017.

Goraichuk, I., Sharma, P., Stegniy, B., Muzyka, D., Mary, J., Pantin-Jackwood, A., Gerilovych, O., Solodiankin, Bolotin, V., Miller, P. J., Kiril, M., Afonso, C. L. **Complete Genome Sequence of an Avian Paramyxovirus Representative of Putative New Serotype 13.** Genome Announcements. Vol. 4 pp. 4. 2016.

Gough, R. E., Manvell, R. J., Drury, S. E., Naylor, P. F., Spackman, D., Cooke, S. W. **Deaths in budgerigars associated with a paramyxovirus-like agent.** Vet. Rec. 133, 123. 1993.

Hanson, R. P. **World wide spread of viscerotropic Newcastle disease, in Proceedings of the 76th Meeting of the U.S**. Animal Health Association, p. 275–279, Miami Beach, Fla, USA. 1972.

Hines, N. L., Miller, C. L. **Review Article Avian Paramyxovirus Serotype-1: A Review of Disease Distribution, Clinical Symptoms, and Laboratory Diagnostics.** Veterinary Medicine International, Article ID 708216, pp. 17. 2012.

Hyun-Jeong, L., Ji-Ye, K., Youn-Jeong, L., Eun-Kyung, L., Byoung-Min, S., Hee-Soo, L., Kang-Seuk, C. **A Novel Avian Paramyxovirus (Serotype 15) Isolated from Wild Birds**. Frontiers in Microbiology, Vol 8, Article 786. 2017.

ICTV - https://talk.ictvonline.org/taxonomy/ 24/05/2017. 2017.

IUCN – **International Union for Conservation of Nature and Natural Resources.** Red list of threatened species. Available at: www.redlist.org. 2016.

Jeon, W. J., Lee, E.K., Kwon, J.H., Choi, K.S. **Full-length genome sequence of avain paramyxovirus type 4 isolated from a mallard duck**. Virus Genes 2008, 37:342-350. 2008.

Karamendin, K., Kydyrmanov, A., Seidalina, A., Asanova, S., Sayatov, M., Kasymbekov, E., Khan, E., Daulbayeva, K., Harrison, S. M., Carr, I. M., Goodman, S. J., Zhumatova K. **Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus (APMV - 13) Isolated from a Wild Bird in Kazakhstan.** Genome Announcements. Vol. 4, pp. 3. 2016.

Karamendin, K., Kydyrmanov, A., Seidalina, A., Asanova, S., Sayatov, M., Kasymbekov, E., Khan, E., Daulbayeva, K., Harrison, S. M., Carr, I. M., Goodman, S. J., Zhumatov, K., **Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus (APMV -13) isolated from a wild bird in Kazakhstan**. Genome Announc. 4. 2016.

Karamendin, K., Kydyrmanov, A., Seidalina, A., Jenckel, M., Starick, E., Grund, C., Asanova, S., Khan, E., Daulbayeva, K., Kasymbekov, Y., Zhumatov, K., Sayatov,M., Beer, M., Fereidouni, S. **Complete genome sequence of avian paramyxovirus strain APMV -6 from Kazakhstan.** Genome Announc. 3. 2015.

Khattar, S.K., Kumar, S., Xiao, S., Collins, P.L., Samal, S. **Experimental Infection of mice with avian paramyxovirus serotype 1 to 9.** PLos One 6 (2), 2011.

Khattar, S. K., B. Nayak, S. H., Kim, S., Xiao, S., Samal, A., Paldurai, U. J., Buchholz, P., Collins, L., Samal, S. K. **Evaluation of the replication, pathogenicity, and immunogenicity of avian paramyxovirus (APMV) serotypes 2, 3, 4, 5, 7, and 9 in rhesus macaques**. PLoS One. 8(10), 2013.

Killian, M. L. **National veterinary services laboratories avian influenza and newcastle disease diagnostics report.** In Proceedings of the 113th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, pp. 590–593. 2009.

Kim, L. M., King, D. J., Curry, P. E., Suarez, D. L., Swayne, D. E., Stallknecht, D. E., Slemons, R. D., Pedersen, J. C., Senne, D. A., Winker, K., Afonso, C. L. **Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates**. J. Virol. 81:12641–12653. 2007.

Kim, L. M., Suarez, D. L., Afonso, C. L. **Detection of a broad range of class and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay**, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, vol. 20, no. 4, pp. 414–425. 2008.

Kim, S. H., Xião, S., Shive, H., Collins, P. L., Samal, S. K. **Replication, neurotropism, and pathogenicity of avian paramyxovirus serotypes 1–9 in chickens and ducks.** PLoS One 7:(4). 2012.

Kumar, S., Dias, F. M., Nayak, B., Collins, P. L., Samal, S. K. **Experimental avian paramyxovirus serotype-3 infection in chickens and turkeys**. Vet Res 41: 72. 2010.

Kumar, S., Samal, S. K. **Pathogenicity of avian paramyxovirus serotype-3 in Chickens and Turkeys.** In: Perez- Marin, C. C. (ed.), A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine. pp. 587–596. In Tech, Croatia. 2012.

Lamb, R. A., Paterson, R. G., Jardetzky, T. S. **Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures**. Virology 344: 30–37. 2006.

Lamb, R., Parks, G. **Paramyxoviridae: the viruses and their replication**. In: Knipe, D. M, Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E., eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 1449–1496. 2007.

Lanctot, R. B., Blanco, D. E., Dias, R. A., Isacch, J. P., Gill, V. A., Almeida, J. B., Delhey, K., Petracci, P. F., Bencke, G. A., Balbueno, R. **Conservation status of the**

Buff-breasted Sandpiper: historic and contemporary distribution and abundance in South America. The Wilson Bulletin, 114: pp. 44-72. 2002.

Lee H. J., Kim, J. Y., Lee, Y. J., Lee, E. K., Song, B. M., Lee, H. S., Choi, K.S. **A Novel Avian Paramyxovirus (Putative Serotype 15) Isolated from Wild Birds.** Front. Microbiol. Vol. 8: pp 786. 2017.

Lennette, E. H., Lennette, D. A., Lennette, E. T. **Diagnostic Procedures for viral, Rickettsial and chlamydial infections**. 7° ed. Washington: American Public Health Association, p. 431-446. 1995.

Li, X., Qiu, Y., Yu, A. **Degenerate primers based RT-PCR for rapid detection and differentiation of airborne chicken Newcastle disease virus in chicken houses,** Journal of Virological Methods, vol. 158, no. 1-2, pp. 1–5. 2009.

Lipkind, M. A., Weisman, Y., Shihmanter, E., Shoham, D., Aronovici, A. **The isolation of yucaipa-like paramyxoviruses from epizootics of a respiratory disease in turkey poultry farms in Israel**. Vet. Rec. 105: 577–578. 1979.

Mäder, A., Sander, M., Casa Junior, G. **Ciclo sazonal de mortalidade do pinguim de Magalhães, Spheniscus magellanicus influenciado por fatores antrópicos e climáticos na costa do Rio Grande.** Revista Brasileira de Ornitologia, v. 18, n. 3, p. 228- 233. 2010.

Mäder, A., Sander, M., Casa Junior, G. **Anthropogenic impacto of Magellanic Penguin (*Spheniscus magellanicus*) found dead on the north coast of Rio Grande do Sul.** In: Congresso Brasileiro de Ornitopatologia. Porto Alegre. Livro de Resumos. 2007.

MAPA - Ministério do Abastecimento Pecuária e Agricultura - Brasil. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos Legais, p.83. 1994.

MAPA – Ministério do Abastecimento Pecuária e Agricultura – Brasil. Programa Nacional de Sanidade Avícola Plano de Contingência de Influenza Aviária - Manual de Procedimentos. 2016.

Marks, F. S., Rodenbusch, C. R., Okino, C. H., Hein, H. E., Costa, E. F., Machado, G., Canal, C. W., Brentano, L., Corbellini, L. G. **Targeted survey of Newcastle disease virus in backyard poultry flocks located in wintering site for migratory birds from Southern Brazil**. Prev. Vet. Med. 116, 197–202. 2014.

Miller, P., Kim, L., Ip, H., Afonso, C. **Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus**. Virology 391, 64–72. 2009.

Miller, P. J., Afonso, C. L., Spackman, E., Scott, M. A., Pedersen, J. C., Senne, D. A., Brown, J. D., Fuller, C. M., Uhart, M. M., Karesh, W. B., Brown, I. H., Alexander, D. J., Swayne, D. E. **Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in Rockhopper penguins from the Falkland Islands**. J. virol. 84(21), 11496-11504. 2010.

Miller, P, Haddas, R., Simanov, L., Lublin, A., Rehmani, S., Wajid, A., Bibi, T., Khan,T., Yaqub, T., Setiyaningsih, S., Afonso, C**. Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features**. Infect. Genet. Evol. 29, 216–229. 2015.

Munir, M., Zohari, S., Berg, M. **Newcastle disease vírus in pakistan: genetic characterization and implication in molecular diagnosis**. Indian J. Virol. 23, 368–373. 2012.

Muzyka, D., Pantin-Jackwood, M., Stegniy, B., Rula, O., Bolotin, V., Stegniy, A., Gerilovych, A., Shutchenko, P., Stegniy, M., Koshelev, V., Maiorova, K., Tkachenko, S., Muzyka, N., Usova, L., Afonso, C. L. **Wild bird surveillancefor avian paramyxoviruses in the Azov-black sea region of Ukraine (2006 to2011) reveals epidemiological connections with Europe and Africa.** Appl.Environ. Microbiol. 80, 5427–5438. 2014.

Neira, V., Tapia, R., Verdugo, C., Barriga, G., Mor, S., Ng, T., Garcia, V., Rio, J., Rodrigues, P., Briceno, C., Medina, R., González-Acuña, D. **Novel Avulaviruses in Penguins, Antarctica.** Emerging Infectious Diseases vol 23, n° 7. 2017.

Nerome, K., Nakayama, M., Ishida, M., Fukum, H. **Isolation of a new avian paramyxovirus from budgerigar (*Melopsittacus undulatus*)**. J Gen Virol 38: 293–301. 1978.

Nichole, L. H., Cathy, L. M. Review Article: **Avian Paramyxovirus Serotype-1: A Review of Disease Distribution, Clinical Symptoms, and Laboratory Diagnostics.** Veterinary Medicine International, vol 10, p 17. 2012.

Nolen, R. **Exotic Newcastle disease strikes game birds in California**. J. Am. Vet. Med. Assoc. 221, 1369–1370. 2002.

OIE - World Organisation for Animal Health. **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines,** 6 °ed. 2008.

OIE - World Organisation for Animal Health. **Newcastle disease. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)**. Biological Standards Commission. Vol.1. 2017.

Pedersen, J. C., Senne, D. A., Woolcock, P. R., Kinde, H., King, D. J. **Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002–2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America**. J. Clin. Microbiol. 42: n 5, 2329–2334. 2004.

Pedersen, K., Marks, D. R., Arsnoe, D. M., Afonso, C. L., Bevins, S. N., Miller, P. J., Randall, A. R., DeLiberto, T. J. **Avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus), avian influenza virus, and Salmonella spp. in mute swans (*Cygnus olor*) in the Great Lakes region and Atlantic Coast of the United States.** Avian Dis. 58, 129–136. 2014.

Petry, M. V., Fonseca, V. S. **Effects of human activities in the marine enviroment on seabirds along the coast of Rio Grande do Sul**, Brazil. Ornitologia Neotropical Canadá, 13: 137-142. 2002.

Piacentini, V. Q., Aleixo, A., Agne, C. E., Maurício, G. N., Pacheco, J. F., Bravo, G. A., Brito, G. R. R., Naka, L. N. F., Olmos, S., Posso, L. F., Silveira, G. S., Betini, E., Carrano, I., Franz, A. C., Lees, L. M., Lima, D., Pioli, F., Schunck, F. R., Amaral, G. A., Bencke, M., Cohn-Haft, L. F. A., Figueiredo, F. C., Straube, E. **Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos**. Revista Brasileira de Ornitologia, 23(2): 91–298. 2015.

Pinto, M. B. L. C., Siciliano, S., Di Beneditto, A. P. M. **Stomach contents of hte Magellanic Penguin Spheniscus magellanicus from the northern distribution limit on the Atlantic coast of Brazil.** Marine Ornithology 35: 77-78. 2007.

Pütz, K., Ingham, R. J., Smith, J. G. **Satellite tracking of the winter migration of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) breeding in the Falkland Islands. Ibis:** a quarterly journal of ornithology. 142:614–622. 2000.

Pütz, K., Ingham, R. J., Smith, J. G. **Winter migration of Magellanic penguins (Spheniscus magellanicus) from the southernmost distributional range.** Marine Biology, Berlin, DE, v. 152, p. 1227–1235. 2007.

Pütz, K., Ingham, R. J., Smith, J.G. **Foraging movements of Magellanic penguins Spheniscus magellanicus during the breeding season in the Falkland Islands. Aquatic Conservation:** Marine and Freshwater Ecosystems, Chichester, Inglaterra, GB, v. 12, p. 75–87. 2002.

Ramey, A. M., Reeves, A. B., Ogawa, H., Ip, H. S., Imai, K., Bui, V. N., Yamaguchi, E., Silko, N. Y., Afonso, C. L. **Genetic diversity and mutation of avianparamyxovirus serotype 1 (Newcastle Disease Virus) in wild birds and evidencefor intercontinental spread.** Arch. Virol. 158, 2495–2503. 2013.

Rehmani, S., Wajid, A., Bibi, T., Nazir, B., Mukhtar, N., Hussain, A., Lone, N.A., Yaqub, T., Afonso, C**. Presence of virulent Newcastle disease virus in vaccinated chickens in farms in Pakistan.** J. Clin. Microbiol. 53, 1715–1718. 2015.

Rima, B., Alexander D. J., Billeter, M. A., Collins, P. L., Kingsbury, D. W. **Family *Paramyxoviridae***. In: Murphy FA, 5ªEd. 2007.

Rout, S. N., Samal, S. K. **The large polymerase protein is associated with the virulence of Newcastle disease virus**. J. Virol. 2008, 82:7828-7836. 2008.

Saif, Y. M., Fadly, A. M., Glisson, J. R., McDougald, L. R. **Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections.** Diseases of Poultry, pp. 75–93, 12ed. 2008**.**

Saif, Y. M., Mohan, R., Ward, L., Senne, D. A., Panigrahy, B., Dearth, R. N. **Natural and experimental infection of turkeys with avian paramyxovirus-7. Avian Disease**, 41:326-329. 1997.

Samal, S. K. **Newcastle disease and related avian paramyxoviruses**. p. 69–114. In Samal, S. K. **The Biology of Paramyxoviruses**. pp. 69–114. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2011.

Samal, S., Khattar, S. K., Kumar, S. P., Collins, L., Samal, S. K. **Coordinate deletion of N-glycans from the heptad repeats of the fusion F protein of Newcastle disease vírus yields a hyperfusogenic virus with increased replication, virulence, and immunogenicity.** J. Virol. 86, pp. 2501–2511. 2012.

Samuel, A. S., Kumar, S., Madhuri, S., Collins, P. L., Samal, S. K. **Complete sequence of the genome of avian paramyxovirus type 9 and comparison with other paramyxoviruses**. Virus. Res. 142: 10–18. 2009.

Samuel, A., Subbiah, M., Shive, H., Collins, P., Samal, S. **Experimental Infection of hamsters with avian paramyxovirus 1 to 9.** Veterinary Research 42:38. 2011.

Sand-hu, T., Hinshaw, V. **Influenza A virus infection of domestic ducks**. First Int Symp Avian Influenza. Pp.93–99. 1981.

Sander, M., Castro, A. G. S., Costa, E. S., Santos C. R. **Aves antárticas e patagônias registradas no litoral norte do Rio Grande do Sul - Brasil durante o período de maio de 2002 a maio de 2003.** Biodiversidade Pampeana PUCRS, Uruguaiana, 6(1): 3-8, 2008.

Silva, R. K., **Detecção e Caracterização Moleculares dos Paramixovirus Aviário tipo 1 em materiais provenientes de aves silvestres utilizando testes para a detecção dos vírus da família viral Paramyxoviridae** – Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Biblioteca da USP. 2016.

Schiavini, A., Yorio, P., Gandini, P., Rey, A. R., Boersma, P. D. **Los pingüinos de lãs costas Argentinas: estado poblacional y conservación.** Hornero 20 (1): 5-23. 2005.

Seal, B. S., King, D. J., Sellers, H. S. **The avian response to Newcastle disease vírus.** Developmental and Comparative Immunology, vol. 24, no. 2-3, pp. 257–268. 2000.

Shin-Hee, K., Xiao, S., Shive, H, Collins, P. L., Samal, S. K. **Replication, Neurotropism, and Pathogenicity of Avian Paramyxovirus Serotypes 1–9 in Chickens and Ducks**. PLoS ONE 7(4). 2012.

Shortridge, K. F., Alexander, D. J. **Incidence and preliminar characterisation of a hitherto unreported, serologically distinct, avian paramyxovirus isolated in Hong Kong**. Res. Vet. Sci. 25:128–130. 1978.

Sick, H. **Ornitologia brasileira: Uma Introdução.** 1 ed. Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 912 p. 1997.

Sleeman, J. **Virulent Newcastle disease virus found in doublecrested cormorants**. In: **Wildlife Health Bulletin**, National Wildlife Health Center, Madison, Wis, USA. 2010.

Stallknecht, D. E., Senne, D. A., Swang, P. J., Shane, S. M., Kearney, M. T. **Avian paramyxoviruses from migrating and resident ducks in coastal Louisiana**. J. Wildl. Dis. 27, 123-128. 1991.

Stanislawek, W. L., Wilks, C. R., Meers, J., Horner, G. W., Alexander, D. J., Manvell, R. J., Kattenbelt, J. A., Gould, A. R. **Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (Anas platyrhynchos) in New Zealand.** Arch. Virol. 147, 1287–1302. 2002.

Suarez, D. L., Miller, P. J., Koch, G., Mundt, E., Jones, R. C., Rautenschlein, S. **Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and avian metapneumovirusinfecctions.** In: Swayne, D. E., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Nolan, L. K., Suarez, D. L., Nair, V. **Disease of Poultry.** 13th ed. Wiley-Blackwell Ames, pp.89–138. 2013.

Subbiah, M., Xiao, S., Khattar, S. K., Dias, F. M., Collins, P. L. **Pathogenesis of two strains of avian paramyxovirus serotype 2, Yucaipa and Bangor, in chickens and turkeys**. Avian. Dis. 54: 1050–1057. 2010.

Tan, S. W. A., Ideris, A. R., Omar, K., Hair-Bejo, M. **Detection and differentiation of velogenic and lentogenic Newcastle disease viruses using SYBR Green I real-time PCR with nucleocapsid gene-specific primers**. Journal of Virological Methods, vol. 160, n. 1-2, pp. 149–156. 2009.

Terregino, C., Aldous, E. W., Heidari, A., Fuller, C. M., De Nardi, R., Manvell, R. J., Beato, M. S., Shell, W. M., Monne, I., Brown, I. H., Alexander, D. J., Capua, I. **Antigenic and genetic analyses of isolate APMV indicate that it representes a new avian paramyxovirus (APMV-12)**. Arch. Virol. 158, 2233– 2243. 2013.

Teske, L., Ryll, M., Rautenschlein, S. **Epidemiological investigations on the role of clinically healthy racing pigeons as a reservoir for avian paramyxovirus-1 and avian influenza virus.** Avian Pathol. 42, 557–565. 2013.

Thampaisarn, R., Vuong, N., Buic, D., Trinhc, Q., Nagai, M., Mizutani, T., Omatsu, T., Katayama, Y., Gronsang, D., Duong, H.T., Led, H. O. **Characterization of avian paramyxovirus serotype 14, a novel serotype, isolated from a duck fecal sample in Japan**. Virus Research Vol. 228, P 46–57. 2017.

Thomazelli, L. M., Araujo, J., Fabrizio, T., Walker, D., Reischak, D., Ometto, T., Barbosa, C. M., Petry, M. V., Webby, R. J., Durigon, E. L. **Novel avian paramyxovirus (AVIAN AVULAVIRUS-15) isolated from a migratory bird in South America.** PLoS ONE, vol 12, pp.5. 2017.

Thomazelli, L. M., **Vigilância Epidemiologia Do Vírus Da Doença De Newcastle Em Aves Domesticas E Selvagens Pelo Método de Real Time PCR**, Tese de doutorado, biblioteca da Universidade Federal de São Paulo. 2009.

Tian, Z., Chai, H., Li, F., Sun, J., Chen, G., Hu, X., Hua, Y., Xiang, W. **Complete nucleotide sequence of avian paramyxovirus type 6 strain JL isolated from mallard ducks in China.** J. Virol. 86, 13112. 2012.

Tong, S., Chern, S.W., Li, Y., Pallansch, M. A., Anderson, L. J. **Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays To Detect Novel Paramyxoviruses**. J. Clin. Microbiol. 46 (8) p. 2652-2658. 2008.

Tumova, B., Robinson, J. H., Easterday, B. C. **A hitherto unreported paramyxovirus of turkeys**. Res Vet Sci 27: 135–140. 1979.

Umali, D. V., Ito, H., Suzuki, T., Shirota, K., Katoh, H., Ito, T. **Molecular epidemiology of Newcastle disease virus isolates from vaccinated commercial poultry farms in non - epidemic areas of Japan.** Virol. J. vol.10, pp. 330. 2013.

Umali, D. V., Ito, H., Katoh, H., Ito, T. **Surveillance of avian paramyxovirus in migratory waterfowls in the san-in region of Western Japan from 2006 to 2012.** J. Vet. Med. Sci. 76, 423–430. 2014.

Valim, M. P., Silva, L. H. M., Amorim, M. **Encontro de *Spheniscus magellanicus* (Forster, 1781) (Aves: Sphenisciformes) parasitado por *Austrogoniodes bifasciatus* (Piaget, 1885) (Ischnocera: Philopteridae) na Região dos Lagos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** Entomol. Vect. vol.11, pp.191-194. 2004.

Vooren, C. M., Brusque, L. F. **As aves do ambiente costeiro do Brasil: biodiversidade e conservação.** Rio Grande, Fundação Universidade do Rio Grande (Pronabio). 1999.

Wajida, A., Dimitrov, K., Wasima, M., Rehmani, S., Basharat, A., Bibi, T., Arif, S., Yaqud, T., Tayyab, M., Ababnehe, M., Sharmac, P., Miller, P., Afonso, C. **Repeated isolation of virulent Newcastle disease viruses in poultry and captive non-poultry avian species in Pakistan from 2011 to 2016.** Preventive Veterinary Medicine 142; 1–6. 2017

Warke, A., Appleby, L., Mundt, E. **Prevalence of antibodies to different avian paramyxoviruses in commercial poultry in the United States**. Avian Dis., 52:694-697. 2008.

Xiao, S. M., Subbiah, S., Kumar, R., De Nardi, C., Terregino, P. Collins, L., Samal, S. K. **Complete genome sequences of avian paramyxovirus serotype 6 prototype**

strain Hong Kong and a recent novel strain from Italy: evidence for the existence of subgroups within the serotype. Virus Res. 150, 61–72. 2010.

Xiao, S., Khattar, S. K., Subbiah, M., Collins, P. L., Samal, S. K. **Mutation of the f-protein cleavage site of avian paramyxovirus type 7 results in furin cleavage, fusion promotion, and increased replication in vitro but not increased replication, tissue tropism, or virulence in chickens.** J. Virol. 86: 3828–3838. 2012.

Yamamoto, E., Ito, H., Tomioka, Y., Ito, T. **Characterization of novel avian paramyxovirus strain AVIAN AVULAVIRUS/Shimane67 isolated from migratory wild geese in Japan.** J. Vet. Med. Sci. 77(9): 1079–1085. 2015.

Yamamoto, E., Ito, T., Ito, H. **Completion of full length genome sequence of novel avian paramyxovirus strain AVIAN AVULAVIRUS/Shimane67 isolated from migratory wild geese in Japan.** J. Vet. Med. Sci. 78(10): 1583–1594. 2016.

Yamane, N., Arikawa, J., Odagiri, T., Ishida, N. **Characterization of avian paramyxoviruses isolated from feral ducks in northern Japan: the presence of three distinct viruses in nature.** Microbiol. Immunol. 26, 557–568. 1982.

Zhang, G. Z., Zhao, J. X. and Wang, M. **Serological survey on prevalence of antibodies to avian paramyxovirus serotype 2 in China.** Avian Dis. 51, 137–139. 2007.

Zhang, G. Z., Zhao, J. X., Wang, H. W., Yang, A. M., Bu, C. Y. **Isolation, identification, and comparison of four isolates of avian paramyxovirus serotype 2 in China.** Avian Dis. 50: 386–390. 2006.