

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

INFECÇÃO POR PARAMIXOVÍRUS TIPO 1 EM POMBOS (*Columba livia*) NO  
SUL DO BRASIL

SUYENE OLTRAMARI DE SOUZA

PORTO ALEGRE

2016

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

INFECÇÃO POR PARAMIXOVÍRUS TIPO 1 EM POMBOS (*Columba livia*) NO  
SUL DO BRASIL

SUYENE OLTRAMARI DE SOUZA

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

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

PORTO ALEGRE

### CIP - Catalogação na Publicação

Oltramari de Souza, Suyene  
Infecção por Paramixovírus tipo 1 em pombos  
(Columba livia) no sul do Brasil / Suyene Oltramari  
de Souza. -- 2016.  
52 f.

Orientador: David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. PPMV-1. 2. Doença de Newcastle. 3.  
Columbiformes. 4. Encefalomielite. I. Driemeier,  
David, orient. II. Título.

2016

Suyene Oltramari de Souza

INFECÇÃO POR PARAMIXOVÍRUS TIPO 1 EM POMBOS (*Columba livia*) NO  
SUL DO BRASIL

Aprovada em 26 de fevereiro de 2016.

APROVADA POR:

---

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Renata Assis Casagrande

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais que me deram a vida e que permitem que eu a conduza sempre a minha maneira, enquanto eles me apoiam a cada momento, tentativas, erros e acertos. Agradeço aos meus irmãos, Jerônimo, Tayene, José Amarílio e ao meu primo Manoel, por serem meus companheiros de sempre e por serem responsáveis pelos sentimentos mais lindos que existem em mim. Agradeço aos meus avôs, tios e tias pela participação intensa em todos os meus bons e maus momentos. Somos uma grande família e eu agradeço pelo respeito, confiança e sobretudo pelo amor verdadeiro.

Agradeço ao meu orientador, professor David Driemeier pela oportunidade confiança, inspiração, pelos ensinamentos e dedicação. A professora Luciana Sonne e aos meus colegas do Setor de Patologia, pelos ensinamentos, convívio diário e trocas de conhecimento. Aos amigos patológicos, que estiveram ao meu lado em algum momento desta trajetória, Renata, Gabriela, Daniele, Marcele, Danilo e Gabriel, a companhia de vocês sempre tornou o percurso mais agradável.

Agradeço ao professor Saulo Pavarini pela sua dedicação e colaboração na construção não só deste trabalho, mas do meu conhecimento e formação. Agradeço a professora Renata Assis Casagrande, por me dar a honra de conviver e aprender com alguém tão especial, por me incentivar, encorajar, ajudar e pelos ensinamentos. Vocês são fontes de inspiração e entusiasmo.

Agradeço aos meus amigos, que compreendem minha ausência, apoiam minha caminhada, me acolhem a qualquer momento, renovam minhas energias e me fazem extremamente feliz. Agradeço a todas as forças, as coincidências, as ajudas físicas e espirituais que contribuíram para mais uma etapa da minha evolução profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de mestrado.

## Resumo

RESUMO- A doença de Newcastle, causada por cepas patogênicas de paramixovírus aviário 1 (APMV-1), é uma doença de aves importante por causar altos índices de mortalidade e perdas econômicas. Em aves da ordem Columbiformes, vários surtos têm sido relatados ao longo de 30 anos, em diferentes partes do mundo, causados por uma cepa denominada pigeon paramyxovirus tipo 1 (PPMV-1). Este trabalho descreve um surto de mortalidade em pombos domésticos (*Columba livia*), provenientes de uma praça pública, no município de Porto Alegre, no Sul do Brasil, ocorrido no mês de novembro de 2014. Aves moribundas e mortas, no intervalo de cinco semanas, foram submetidas ao exame de necropsia, exame histopatológico, imuno-histoquímico anti-Newcastle, de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), exame de sequenciamento e análise filogenética. Foram acometidas aves adultas, de ambos os sexos e a mortalidade foi estimada em 80%, os sinais neurológicos apresentados foram tremores da cabeça, torcicolo, dificuldade em manter-se em estação, dificuldade de locomoção, paresia, paralisia, asas caídas e vômito. As lesões encontradas no exame macroscópico eram inespecíficas e no exame histológico do sistema nervoso central eram caracterizadas por encefalite e encefalomielite não supurativas. No rim, fígado e pâncreas foi observado infiltrado inflamatório mononuclear, que por vezes era associado à necrose. No baço, além de necrose, foi observado depleção linfóide e infiltrado de macrófagos. Das 24 aves testadas para a RT-PCR, seis foram positivas para a proteína da matriz (M) e através do sequenciamento destas amostras, pode-se identificar que todas as aves foram acometidas pela mesma cepa viral. Para confirmação de que a cepa encontrada tratava-se de uma cepa virulenta, foi feita a análise por sequenciamento do sítio de clivagem da proteína F, comparando a sequência de aminoácidos encontrada, <sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup>, com outras cepas já conhecidas. Observou-se que as amostras analisadas apresentaram aminoácidos na região do sítio de clivagem da proteína F, compatíveis com cepas virulentas. De acordo com a análise filogenética, o vírus foi classificado como pertencente à classe II e ao genótipo VI. Ao exame imuno-histoquímico, a marcação foi observada no cérebro, no citoplasma de astrócitos e no núcleo de neurônios; no fígado, associada ao infiltrado inflamatório no interior de macrófagos; em células epiteliais do pâncreas exócrino e no citoplasma de células epiteliais do rim.

**Palavras chaves:** PPMV-1, Doença de Newcastle, Columbiformes, encefalomielite.

### *Abstract*

*The Newcastle disease caused by avian paramyxovirus 1 strains (APMV-1) is an important avian disease involved into high rates of mortality and economic losses. Over the last 30 years several outbreaks have been reported in the order Columbiformes in many parts of the world caused by a strain, known as pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV-1). This paper describes a mortality outbreak in free-living pigeons (Columba livia) from a public square in a city in Southern Brazil, occurred in November 2014. Moribund or freshly dead pigeons, within five weeks interval, were submitted to necropsy, histopathological, immunohistochemical (anti-Newcastle), Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), sequencing analysis and phylogenetic analysis. It was affected only adult free-living pigeons of both sexes, and the mortality was estimated at 80%. Neurological signs presented by the pigeons were head tremors, stiff neck, lack of balance, incoordination, paresis, paralysis, drooped wings, and vomit. Gross findings were nonspecific. Histological findings in the central nervous system were characterized by encephalitis and encephalomyelitis nonsuppurative. In the kidney, liver and pancreas was observed mononuclear inflammatory infiltrate, which sometimes was associated with necrosis. In the spleen was observed necrosis, lymphoid depletion and macrophage infiltration. Out of 24 pigeons examined by RT-PCR, 6 pigeons had positive signal for the presence of matrix (M) protein gene and by sequencing analysis it appears that the sequences were identical to each other. The complete genome sequence and the complete coding sequence of the fusion (F) gene according to the unified NDV classification system showed that isolate had cleavage site <sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup> which is characteristic of velogenic strains. Phylogenetic analysis showed that this strain could be classified into class II and genotype VI. Immunohistochemical analysis showed that the virus antigens were detected in astrocytes and in neurons in the brain, in liver macrophages, in exocrine pancreas epithelial cells, and in kidney epithelial cells.*

**Key words:** PPMV-1, Newcastle disease, encephalomyelitis, Columbiformes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Caracterização clínico-patológica da Infecção por paramixovírus em Columbiformes: **A.** Pomba: ave com dificuldade de locomoção, apoiando-se nas asas. **B.** Pomba, medula espinhal: corte transversal, áreas de hemorragias subdurais. ....48
- Figura 2.** Caracterização das lesões histológicas e imuno-histoquímicas da infecção por paramixovírus em Columbiformes: **A.** Encéfalo: infiltrado inflamatório perivascular de linfócitos e plasmócitos, além de microgliose moderada, Obj. 20x, HE. **B.** Medula espinhal: microgliose nodular moderada, Obj. 40x, HE. **C.** Rim: infiltrado intersticial multifocal moderado, composto por linfócitos e plasmócitos e raros macrófagos, observa-se ainda necrose multifocal do epitélio tubular discreta, Obj. 40x, HE. **D.** Fígado: área focal de infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e heterófilos periportal moderado, além de proliferação moderada de ductos biliares, Obj. 40x, HE. **E. Pâncreas:** área focal de necrose de ácinos pancreáticos, Obj. 40x, HE. **F.** Encéfalo: imunomarcção positiva no interior do citoplasma de astrócitos, Obj. 40x, AEC..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3.** Análise filogenética molecular da proteína F do paramixovírus tipo I, pelo método de Maximum Likelihood. A análise filogenética demonstrou que a cepa descrita pode ser classificada como pertencente à classe II e genótipo VI, o qual inclui a cepa de referência AY734536.1 / Pigeon-Argentina.....50



## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b> Primers selecionados para o gene da proteína F.....	46
<b>Table 2.</b> Relação dos animais, período do surto em que foram avaliados, resultados dos exames de RT-PCR e de Imuno-histoquímica.....	47
<b>Table 3.</b> Comparação entre amostras, das sequências de aminoácidos no sítio de clivagem da proteína F.....	47

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
<b>2.1 Histórico</b> .....	11
2.1.1 Panorama mundial .....	12
2.1.2 A doença no Brasil .....	13
<b>2.2 Etiologia</b> .....	14
<b>2.3 Epidemiologia</b> .....	16
<b>2.4. Patogenia</b> .....	17
<b>2.5 Sinais clínicos</b> .....	18
<b>2.6 Achados de necropsia</b> .....	19
<b>2.7 Histopatologia</b> .....	19
<b>2.8 Diagnóstico e diagnóstico diferencial</b> .....	20
REFERÊNCIAS .....	22
<b>3. ARTIGO</b> .....	31
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

Endêmica em muitos países, e conhecida como Doença de Newcastle (DN), a infecção causada por cepas virulentas de paramixovírus aviário 1 (APMV-1), é considerada uma das mais importantes viroses aviárias, e gera impactos econômicos diretos à produção avícola e resulta em embargos à comercialização (OIE 2012). Faz parte da lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) e, em casos de suspeita, deve ser notificada ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1994a).

Os paramixovírus aviários são vírus com genoma RNA, fita simples e podem ser divididos em nove sorogrupos, APMV-1 ao APMV-9 (ALEXANDER, 1987). A DN é definida pela OIE como uma doença infecciosa de aves causada por um APMV-1, que apresenta um dos seguintes critérios de virulência: o vírus tem um índice de patogenicidade intracerebral (IPIC) em pintos de um dia (*Gallus gallus*) igual ou superior a 0,7, ou a presença de múltiplos aminoácidos básicos é demonstrada no vírus (diretamente ou por dedução) na porção C-terminal da proteína F2 e um resíduo de fenilalanina na posição 117, a qual está localizada na porção N-terminal da proteína F1. O termo ‘múltiplos aminoácidos básicos’ se refere a pelo menos três resíduos de arginina ou lisina entre os resíduos 113 e 116 (OIE, 2012).

Aves migratórias e aves silvestres frequentemente podem carrear estirpes de baixa virulência do APMV-1, e podem disseminá-las para aves comerciais (ALEXANDER, 2000a; ZHU *et al.*, 2010). Há relatos de acometimento de avestruzes e outras ratitas, tanto de forma experimental como natural, bem como de psitacídeos e passeriformes pelo vírus da DN (ALEXANDER, 2000b; CLAVIJO *et al.*, 2000).

Em aves da ordem Columbiformes vários surtos têm sido relatados ao longo de 30 anos, em diferentes partes do mundo, causados por uma cepa específica de APMV-1, denominada *pigeon paramyxovirus type 1* (PPMV-1) (ALEXANDER, 2011). Estas aves ocorrem praticamente em todo o mundo e percorrem grandes distâncias. Sua provável origem é a região tropical do Velho Mundo. Vivem solitárias ou em pequenos grupos e frequentam ambientes terrestres e/ou arborícolas. Em diversas cidades do mundo, as pombas urbanas (*Columba livia*) podem servir de reservatório, como portadoras e transmissoras de diversos agentes patogênicos de importância para criações comerciais de outras aves ou de risco para a saúde pública (WERTHER, 2007).

Os Columbiformes podem estar infectados pela DN sem mostrar quaisquer sinais clínicos (WAKAMATSU *et al.*, 2006) e o vírus pode ser disseminado por um período considerável de tempo (CARRASCO *et al.*, 2008; CATROXO *et al.*, 2011). Esta variante já foi anteriormente descrita em surtos com alta mortalidade em todo o mundo em aves de diferentes espécies (ALEXANDER *et al.*, 1985; ALEXANDER, 1987; ALEXANDER *et al.*, 1997; ZANETTI *et al.*, 2001; IRVINE *et al.*, 2009) e, após transmissão natural para galinhas, estas estirpes podem tornar-se mais virulentas, levar a surtos importantes (DORTMANS, 2011) e causar lesões severas nesta espécie (KOMMERS *et al.*, 2002).

No ano de 2009, foi criada a opção de notificar a doença junto a OIE, em aves silvestres e em animais domésticos de forma discriminada. Esta mudança constitui um avanço considerável para melhorar a transparência e o conhecimento sobre a situação sanitária dos animais domésticos e silvestres em todo mundo, sem que se criem barreiras comerciais injustificadas aos países que informam a presença da doença somente em animais silvestres (OIE, 2013).

No Brasil são tomadas inúmeras medidas para o controle e erradicação da doença, o transporte de material genético para plantéis avícolas é monitorado por testes sorológicos e virológicos (BRASIL, 2008). Para o transporte de aves ornamentais e ovos férteis, as aves são quarentenadas por um período mínimo de quinze dias, em quarentenário oficial ou credenciado pelo MAPA, sob supervisão de veterinário oficial e, nesta ocasião, deverão ser submetidas à pesquisa virológica para DN e Influenza Aviária ou outro teste recomendado pela OIE e aprovado pelo Departamento de Sanidade Animal (DSA) (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010b). Já em casos de aglomerações de animais, se faz necessário a emissão do guia de transporte animal (GTA), e é necessário avaliar a vacinação do mesmo (BRASIL, 1994b).

A DN é considerada uma zoonose menor, causando conjuntivite em humanos, normalmente leve e auto-limitante (OIE, 2013). Em pombos, a forma mais frequente acomete o sistema nervoso e os sinais clínicos são principalmente, tremores, torcicolo, dificuldade de locomoção e, por vezes, diarreia (CATTOLI *et al.*, 2011). O objetivo deste trabalho consiste em relatar um surto de infecção por paramixovírus sorotipo 1 (APMV-1) em uma população de pombos domésticos (*Columba livia*) no Sul do Brasil.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

O primeiro surto de mortalidade em galinhas, cujos sinais clínicos se assemelhavam aos apresentados na DN ocorreu em 1926, na Indonésia (KRANEVELD, 1926). No entanto, apenas em um surto em Newcastle-upon-Tyne na Inglaterra foi possível a confirmação por isolamento viral (DOYLE, 1927). Há relatos de uma enfermidade similar na Europa Central anteriormente a esta data. O vírus espalhou-se do sudeste asiático para a Europa, África e América. Um segundo surto, na década de 60, iniciou no Oriente Médio e disseminou-se rapidamente (ALEXANDER & SENNE, 2008).

Na década de 70, com surtos ocorrendo no mundo todo, vacinas foram desenvolvidas para o controle da panzootia. Nesta época surgiu a hipótese de que aves silvestres poderiam servir de reservatório de cepas não patogênicas, para aves comerciais, e iniciaram-se estudos sobre a base molecular da virulência do agente (ALEXANDER *et al.*, 2012).

Na década de 80, anticorpos monoclonais para a realização do exame de inibição de hemaglutinação (HI) foram desenvolvidos. Nos anos 90, inúmeros estudos utilizando técnicas moleculares confirmam a relação da proteína viral de fusão (F) com a virulência da cepa e, nesta mesma década, alguns surtos podem ter ocorrido devido a uma mutação de cepas não virulentas para cepas virulentas, provenientes, principalmente, de cepas de aves aquáticas e silvestres transmitidas para aves comerciais (ALEXANDER *et al.*, 2012).

A partir do ano 2000 estudos dividiram os isolados em classes I e II (ALDOUS *et al.*, 2003; CZEGLEDI *et al.*, 2006). Os dados produzidos, ajudaram na compreensão da ocorrência de panzootias, da evolução, das interações e das relações entre vírus de aves selvagens com surtos em aves de capoeira e de estirpes ou linhagens emergentes (ALEXANDER *et al.*, 2012).

Em pombos, a infecção por APMV-1 foi observada pela primeira vez em 1981, em pombos correios do Mediterrâneo, e os primeiros casos relatados ocorreram na Itália (BIANCIFIORE & FIORINI, 1983). Contudo, é provável que a doença tenha surgido no Iraque em 1977 com disseminação para o Egito em 1981, na época erroneamente diagnosticada como encefalite por herpesvírus (KALETA *et al.*, 1985).

A enfermidade espalhou-se rapidamente na Bélgica e na Alemanha, e em abril de 1983, a Grã-Bretanha em uma tentativa ineficaz de controle proibiu a importação de pombos do Continente à Grã-Bretanha. Atingindo inúmeros países, o vírus foi então isolado de pombos selvagens e de corrida na maior parte da Europa, bem como em Israel, Egito, Sudão, Índia, Uganda, África do Sul, Hong Kong, Japão, Canadá e América do Norte. Por fim, no ano de 1984, aves domésticas, alimentadas com ração contaminada por carcaças e fezes de pombos, foram infectadas por esta variante de pombos na Grã-Bretanha (CROSS, 1995).

### 2.1.1 Panorama mundial

Atualmente a DN velogênica é considerada endêmica na Ásia, Oriente Médio, África, América Central, América do Sul e em partes do México. As cepas lentogênicas são isoladas de aves domésticas em todo o mundo (CFSPH, 2008).

Existem relatos de cepas altamente patogênicas circulantes no Vietnã (CHOI *et al.*, 2014), Malásia (TAN *et al.*, 2010), Indonésia (XIAO *et al.*, 2012) e Camboja (CHOI *et al.*, 2013). Ainda na Indonésia, uma linhagem antiga do vírus da DN foi identificada em mosquitos da espécie *Culex tritaeniorhynchus*, contudo acredita-se que seja em decorrência de uma contaminação cruzada, já que não há relatos de envolvimento de vetores (FORRESTER *et al.*, 2013). Estudos de genotipagem realizados na África central e ocidental, demonstraram a existência de uma ampla variação genética e de mutações em epítomos neutralizantes das cepas estudadas. Esta ampla variabilidade representa uma grande ameaça ao controle da enfermidade (SNOECK *et al.*, 2013a; SNOECK *et al.*, 2013b).

Em um zoológico de Israel, foi realizado o diagnóstico de DN em 100% das aves mortas em um surto ocorrido no ano de 2011 (HADDAS *et al.*, 2014). Países da Europa realizam estudos sorológicos de aves aquáticas com resultados positivos (LINDH *et al.*, 2012; TOLF *et al.*, 2013) e notificam surtos da doença (LINDH *et al.*, 2012).

Na China, o agente foi identificado em aves de vida livre (XIE *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013). No Japão, cepas lentogênicas de aves silvestres e aquáticas já foram identificadas (UMALI *et al.*, 2014). Na Austrália, por sua vez, o último surto ocorreu no ano de 2010 em aves comerciais (WESTBURY *et al.*, 2001).

A doença é exótica em aves domésticas nos Estados Unidos, porém o vírus já foi associado a surtos em aves silvestres (DIEL, 2012a). No Peru, foi realizada a primeira

caracterização completa de uma cepa virulenta da DN na América do Sul (DIEL, 2012b).

Em pombos, a doença é enzoótica em inúmeros países e continua sendo uma ameaça para as aves comerciais (ALEXANDER & SENNE, 2008). Na ilha de Porto Santo, medidas de contingência vêm sendo aplicadas em um foco de mortalidade de pombos infectados pela DN (PORTAL MADEIRA, 2015). Há ainda relatos de um surto ocorrido em uma população de pombos na Argentina por cepas de PPMV-1 (ZANETTI *et al.*, 2001) e de um pombo doméstico acometido no Uruguai (CASTRO *et al.*, 2012).

No ano de 1997, através de uma portaria, o Brasil suspendeu a entrada em território Nacional, de avestruzes, aves ornamentais domésticas e silvestres e ovos férteis das mesmas, em decorrência às notificações de DN e Influenza de alta patogenicidade em inúmeros países (BRASIL, 1997).

#### 2.1.2 A doença de Newcastle no Brasil

A primeira descrição da doença ocorreu no Amapá em 1953, onde carcaças de frango congeladas, provenientes dos Estados Unidos, foram relacionadas como a fonte mais provável de transmissão (ARNS *et al.*, 2007). No ano de 1975, no Rio de Janeiro foi isolada uma cepa altamente patogênica para frangos de corte (FERNANDES *et al.*, 2014), e durante os anos 70, vários focos da doença com apresentação velogênica neurotrópica foram registrados, o que perdurou pelos 20 anos seguintes (PAULILLO & JÚNIOR, 2008).

Focos da enfermidade com manifestação de sinais clínicos ocorreram em aves de criatórios de fundo de quintal nos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso no ano de 2006. Como resultado de uma vigilância ativa realizada em aves residentes, identificou-se nos 10 km circundantes ao sítio de aves migratórias em Manaus - AM, quatro focos, totalizando 79 aves soro positivas, entre patos e galinhas, com o diagnóstico de apenas um caso por foco através de isolamento viral. Nesta ocasião, não foram relatados sinais clínicos (OIE, 2015).

Em 2003, o governo brasileiro declarou livre os plantéis avícolas comerciais dos principais estados produtores, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal, com reconhecimento da OIE (BRASIL, 2003).

Em inquéritos epidemiológicos realizados em populações de aves silvestres e migratórias do Brasil, cepas altamente patogênicas têm sido detectadas (ARNS *et al.*, 2007). No Brasil a doença é controlada por vacinação facultativa e frangos de corte e obrigatória em aves de vida longa, que leva em consideração a situação epidemiológica da doença no local, além da realização de vigilância sanitária e de medidas de contenção da doença em caso de surto (BRASIL, 2002).

## 2.2 Etiologia

A DN é causada por um vírus RNA fita simples, envelopado, pertencente à ordem *Mononegavirales*, que compreende todos os vírus que possuem o genoma formado por uma única molécula de RNA de polaridade negativa. Dentro desta ordem, o vírus da DN é classificado na família *Paramyxoviridae*, dividida em duas subfamílias *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*. São classificados em cinco gêneros: *Respirovirus*, *Morbillivirus*, *Rubulavirus*, *Henipavirus* e, por fim o *Avulavirus*, do qual o APMV-1 faz parte (ARNS *et al.*, 2007).

Ainda no gênero *Avulavirus*, existem outros oito sorotipos de paramixovírus, designados de 2 a 9. Os paramixovírus infectam uma ampla gama de hospedeiros, tanto natural como experimentalmente (ARNS *et al.*, 2007). Os vírions da DN são pleomórficos e, muitas vezes, esféricos, com diâmetro de aproximadamente 180 nm. Diversas glicoproteínas estão presentes no envelope viral, e são chamadas de proteínas de superfície (ARNS *et al.*, 2007).

A glicoproteína F está envolvida na ligação aos receptores e na fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular, o que permite a entrada do nucleocapsídeo na célula hospedeira. É sintetizada como um precursor e se torna ativa pela sua clivagem em F1 e F2, o que é determinante na patogenicidade viral. O nucleocapsídeo é formado por um complexo formado pelo genoma RNA, conjugado com aproximadamente 2.500 cópias da proteína N, responsável pela proteção do genoma, ao qual estão associadas 300 cópias da proteína P e 50 moléculas da proteína L. Ambas, P e L são necessárias para a atividade de polimerização do RNA e desempenham um papel significativo na determinação da virulência do vírus da DN (DORTMAN, 2011). Os vírions contêm, ainda, múltiplas cópias da proteína de matriz (M), que preenche o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope (ARNS *et al.*, 2007). A atividade de neuraminidase dada pela presença da enzima neuraminidase na



glicoproteína HN, não está totalmente esclarecida, porém parece participar da patogênese viral, além de parecer determinar o tropismo do vírus por diferentes tecidos e órgãos. Dentre as propriedades biológicas deste vírus, está a capacidade de hemaglutinar hemácias, característica utilizada para o diagnóstico da enfermidade (HUANG *et al.*, 2004).

Com base na análise filogenética ou no sequenciamento parcial ou completo do gene da proteína de fusão (F), os isolados do vírus da DN são classificados em linhagens ou genótipos (ALDOUS *et al.*, 2003; CZEGLÉDI *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007, 2008; SNOECK *et al.*, 2009). Primeiramente foram descritas seis linhagens com treze sublinhagens (ALDOUS *et al.*, 2003), acrescidas de uma sétima linhagem com sete sublinhagens (CATTOLI *et al.*, 2010; SNOECK *et al.*, 2009). Um segundo sistema de classificação, divide os isolados em dois grupos, denominados de classe I e classe II (SEAL *et al.*, 1995; CZEGLÉDI *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2010). A classe I é subdividida em nove genótipos (1-9), e a classe II é dividida em onze genótipos (I–XI) (CZEGLÉDI *et al.*, 2006; MAMINIAINA *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2010). Alguns genótipos da classe II são ainda subdivididos (KIM *et al.*, 2007).

Por fim, uma análise recente de cepas registradas no *Genbank* revelou que os vírus de classe I contêm um único genótipo e que os isolados da classe II podem ser divididos em 15 genótipos (DIEL, 2012c). Genótipos I, II, III, IV e IX surgiram, entre 1930 e 1960, foram os primeiros descobertos e são responsáveis por surtos ocorridos na Alemanha (WEHMANN *et al.*, 2003; CZEGLÉDI *et al.*, 2006). O genótipo V surgiu em 1970 e é frequentemente isolado na América do Sul e Central a partir de diversas espécies de aves e na América do Norte em corvos-marinhos (WEHMANN *et al.*, 2003; PEDERSEN *et al.*, 2004; RUE *et al.*, 2010). O genótipo VI, inclui vírus isolados de várias espécies de aves (WEHMANN *et al.*, 2003; CZEGLÉDI *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008; ALEXANDER, 2011). Os vírus deste genótipo são particularmente importantes devido à sua frequente associação com pombos e consequente risco de sua introdução em bandos de aves de capoeira (KOMMERS *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2008; ALEXANDER, 2011).

Os isolados são classificados, ainda, de acordo com a sua patogenicidade. As amostras velogênicas apresentam alta virulência; as mesogênicas possuem virulência moderada e as lentogênicas são pouco ou nada virulentas (ALEXANDER, 2008).

O vírus é inativado após três horas a 56°C ou 30 minutos a 60°C, e por ação de pH ácido. É sensível ao éter e inativado por desinfetantes contendo formol e ou fenol, porém pode sobreviver por longos períodos a temperatura ambiente, especialmente nas fezes (ARNS *et al.*, 2007).

### **2.3 Epidemiologia**

Nos últimos anos, as amplas variações antigênicas e genéticas do vírus evidenciaram a grande dificuldade em compreender a epidemiologia da DN (ARNS *et al.*, 2007). As principais formas de introdução e propagação do vírus em uma área livre são: o movimento de aves selvagens migratórias e silvestres, com papel significativo na propagação do vírus em áreas onde a enfermidade já esteja estabelecida, já que a maioria das cepas circulantes nessas espécies é de baixa virulência (ALEXANDER, 2000a; ZHU *et al.*, 2010), não sendo, entretanto, excluído a possibilidade de infecção primária; o comércio mundial de aves de cativeiro e de caça, pombos correios e aves domésticas mantidas para fins de recreação; a comercialização de aves comerciais vivas (HINES & MILLER, 2012) e produtos avícolas; o movimento de pessoas e equipamentos (ARNS *et al.*, 2007); alimentos avícolas, água contaminada e propagação aérea (ALEXANDER & SENNE, 2008).

Após a introdução do vírus em uma determinada área ainda há o risco de cepas de baixa virulência tornarem-se patogênicas, após repetidas passagens em portadores assintomáticos (SHENGQING *et al.*, 2002). Quanto a susceptibilidade à infecção, galinhas (*Gallus gallus*) estão entre as aves mais susceptíveis, as aves aquáticas entre as mais resistentes (ARNS *et al.*, 2007) e estudos experimentais mostram que pombos podem apresentar maior resistência a infecção do que outras espécies (WAKAMATSU *et al.*, 2006). A infecção ocorre pela via intestinal ou respiratória (ALEXANDER, 1988). O vírus é excretado durante a fase de incubação, na fase clínica e na convalescença, está presente no ar expirado, nas secreções respiratórias, fezes, ovos e em tecidos de aves doentes (ARNS *et al.*, 2007).

A doença é endêmica em muitos países, ou ainda, epizootica ou esporádica em outros. No Brasil o último surto da doença ocorreu no ano de 2006, em uma criação de aves de subsistência no Rio Grande do Sul (OIE, 2015). Sabe-se da presença de alguns sorotipos de paramixovírus em pinguins que migram da costa da América do Sul para o sul do Brasil (STOKES, 1998; FORNELLS *et al.*, 2012).

Columbiformes devem ser considerados uma potencial fonte de infecção da DN e de outras enfermidades para aves comerciais (KOMMERS *et al.*, 2002). Galinhas em contato com pombos infectados desenvolvem anticorpos, o que demonstra a capacidade de transmissão do vírus entre estas espécies. A infecção pode ocorrer em casos naturais por estar associada a fatores ambientais e imunológicos (ALEXANDER & PARSON, 1984). Em pombos, a morbidade e mortalidade são baixas (BRANCIFIORE & FIORONI, 1983; KALETA *et al.*, 1985), embora existam registros de um surto, em aves de vida livre, com mortalidade de 80% (WERTHER, 2007). De forma experimental, a cepa PPMV-1, causa alta morbidade e mortalidade em pombos, ao passo que, não produz sinais clínicos ou lesões em frangos (GUO *et al.*, 2014). O PPMV-1 provavelmente se originou como resultado de vários eventos de transmissão entre espécies (UJVARI *et al.*, 2003).

Dentre os fatores de provável envolvimento na manutenção da infecção citam-se a presença de indivíduos portadores, a introdução de aves susceptíveis, o convívio entre diferentes espécies, principalmente entre aves silvestres e domésticas e a heterogeneidade de estirpes virais (AWAN *et al.*, 1994).

Existe grande investimento por parte da avicultura industrial para a prevenção da doença, porém a principal ameaça advém das espécies animais não vacinadas, que atuam como reservatório. É importante que o monitoramento e o diagnóstico da doença sejam eficientes (ARNS *et al.*, 2007). As vacinas atualmente utilizadas são vivas atenuadas e inativadas e, embora existam muitos estudos em desenvolvimento, incluindo a criação de vacinas recombinantes, existe ainda a busca por uma vacina que confira uma maior proteção diante de um desafio (YUSOFF, 2010).

O homem pode apresentar doença sob a forma de uma conjuntivite branda e auto-limitante (ARNS *et al.*, 2007). Porém, há relato de um caso de pneumonia fatal, em um humano imunossuprimido, causada por uma cepa de pombos (GOEBEL *et al.*, 2007).

#### **2.4. Patogenia**

O desenvolvimento da doença depende da espécie da ave, idade, *status* imunitário, rota de exposição e da patogenicidade do vírus. A infecção ocorre pela via intestinal ou respiratória, através da ingestão de partículas virais ou por inalação (ALEXANDER, 1988). Inicialmente, ocorre a multiplicação viral no local da

introdução. O segundo ciclo de multiplicação ocorre nas vísceras, no citoplasma das células e posteriormente ocorre sua liberação na circulação sanguínea. A fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula do hospedeiro ocorre pelo processo de clivagem da proteína F0 em F1 e F2 por proteases celulares e segue-se, então, o ciclo replicativo. A clivagem desta proteína é necessária para a infectividade dos vírions e ocorre com mais eficiência em moléculas de F0 que possuem diversos aminoácidos básicos no sítio de clivagem (ARNS *et al.*, 2007).

As moléculas de F0 das amostras virulentas da DN são clivadas em uma grande variedade de tecidos e órgãos do hospedeiro, resultando em uma infecção sistêmica, enquanto que moléculas F0 de vírus de baixa virulência são clivadas em tipos limitados de células, como no trato respiratório e intestinal (ROTT, 1979).

As cepas da DN podem ser classificadas em três patotipos (lentogênica, mesogênica e velogênica) baseando-se na severidade da doença em galinhas (ALEXANDER & SENNE, 2008). As amostras velogênicas apresentam alta virulência; as mesogênicas possuem virulência moderada e as lentogênicas são pouco ou nada virulentas (ARNS *et al.*, 2007). Dependendo do seu tecido de predileção podem ser classificadas ainda em viscerotrópica ou neurotrópica (ALEXANDER, 2000a). A virulência total do agente não é determinada apenas por poucos genes, mas pode ser o resultado de uma interação complexa entre todos os elementos do genoma viral (SUSTA *et al.*, 2010).

Em pombos, o período de incubação da enfermidade é de 10 a 14 dias (CATTOLI *et al.*, 2011). Cepas de pombos que por vezes demonstram-se altamente virulentas no exame de sequenciamento, em sua grande maioria apresentam IPIC baixo, no entanto tornam-se uma ameaça para a criação de aves domésticas, pois o sítio de clivagem da proteína F é propenso a sofrer mutações (MEULEMANS *et al.*, 2002).

## **2.5 Sinais clínicos**

Os sinais clínicos da DN não são patognomônicos e podem variar de uma apresentação subclínica até mortalidade de 100% das aves acometidas, dependendo da cepa envolvida (ARNS *et al.*, 2007).

Em estudos experimentais, com cepas velogênicas viscerotrópicas, os sinais clínicos consistem de diarreia, apatia e morte em até cinco dias (DIEL *et al.*, 2012b). Aves inoculadas com cepas velogênicas neurotrópicas em geral apresentam sinais

clínicos no segundo dia pós-infecção e morrem até o quinto dia. Cepas mesogênicas apresentam um curso clínico mais longo e por vezes, não desencadeiam sinais clínicos assim como as cepas lentogênicas (ECCO *et al.*, 2011).

Em pombos, os principais sinais clínicos são neurológicos, e incluem ataxia, desequilíbrio, tremores da cabeça, torcicolo, incoordenação para voar e, ocasionalmente, diarreia (BARTON, 1992). Estes sinais podem iniciar a partir do segundo dia de infecção (CATTOLI *et al.*, 2011). Aves experimentalmente infectadas quando jovens, podem apresentar sinais clínicos a partir do sétimo dia de infecção, e aves adultas, a partir do décimo oitavo dia (WAKAMATSU *et al.*, 2006).

## 2.6 Achados de necropsia

As lesões macroscópicas associadas ao vírus da DN em pombos variam de acordo com a virulência das cepas. Em geral, as cepas de galinhas causam alterações patológicas mínimas, enquanto que a variante de pombos (PPMV-1) pode causar uma série de lesões que variam de acordo com a idade e a via de infecção (CATTOLI *et al.*, 2011). Contudo, são encontradas com maior frequência em cepas viscerotrópicas. Caracterizam-se por congestão e hemorragias em órgãos da cavidade celomática, necrose multifocal, e hemorragias no intestino e tonsilas cecais, bem como manchas brancas e necrose multifocal no baço (GOHM *et al.*, 2000; DIEL *et al.*, 2012b). As cepas neurotrópicas não causam lesões perceptíveis ou, quando presentes, são inespecíficas (BARTON, 1992).

## 2.7 Histopatologia

As cepas velogênicas viscerotrópicas acarretam em depleção linfóide, necrose, acúmulo de macrófagos, detritos necróticos e heterófilos dispersos em órgãos da cavidade celomática (DIEL *et al.*, 2012b).

Por sua vez, as cepas velogênicas neurotrópicas causam lesões de encefalite e/ou encefalomielite não supurativa, microgliose, necrose neuronal, infiltração perivascular com células mononucleares, malacia, desmielinização, infiltrado de células *Gitter* e hipertrofia endotelial no sistema nervoso central (BROWN, 1999; KUIKEN *et al.*, 1999; RUE *et al.*, 2010; ECCO *et al.*, 2011). Em outros órgãos, observa-se infiltrado mononuclear, por vezes necrose e depleção linfóide em baço e bursa de *Fabricius* (KUIKEN *et al.*, 1999). Em pombos, a cepa velogênica neurotrópica, além de encefalite

não supurativa, causa lesões de nefrite intersticial, associada à necrose tubular, além de infiltrado linfoplasmocitário em órgãos como fígado e pâncreas (BARTON *et al.*, 1992).

A marcação imuno-histoquímica anti-Newcastle ocorre principalmente no citoplasma das células como forma de grânulos, e em muitos casos, a marcação pode não ocorrer, mesmo quando associado a lesões acentuadas (KUIKEN *et al.*, 1999). Em infecções por cepas velogênicas viscerotrópicas há marcação intensa no interior de macrófagos e linfócitos de órgãos e agregados linfoides (DIEL *et al.*, 2012).

## 2.8 Diagnóstico e diagnóstico diferencial

Os principais objetivos do diagnóstico da DN incluem a tomada de decisão sobre a imposição ou não de medidas de controle, além da obtenção de provas para apoiar uma investigação epidemiológica (ALEXANDER & SENNE, 2008).

Em casos de mortalidade elevada em aves, recomenda-se a realização de coleta de amostras de órgãos e suabes para a realização de exames (OIE, 2012). Quando a obtenção de amostras for limitada, recomenda-se a coleta de suabes de cloaca e traqueia, junto de órgãos que são frequentemente acometidos, ou ainda deve-se realizar a associação dos exames aos sinais clínicos da doença (ALEXANDER, 2000).

O isolamento viral, atualmente, é o método diagnóstico indicado pela OIE, seguido do teste de hemaglutinação de hemácias (HA), atividade característica do vírus da DN e do teste de inibição da hemaglutinação (HI) com soro específicos. Testes moleculares são ainda utilizados para a determinação do patótipo e do genótipo viral (OIE, 2012).

Isolados do vírus da DN tem como particularidade, apresentar uma ampla gama de virulência. Esta variação na virulência do agente, não permite que a detecção do APMV-1 ou a evidência de infecção, sejam suficientes para um diagnóstico conclusivo (ALDOUS & ALEXANDER, 2001). Portanto, estes são classificados após testes de patogenicidade. A realização destes testes também é importante devido ao uso generalizado de vacinas em plantéis de aves comerciais (OIE, 2012).

Uma das maiores variações antigênicas ocorre no vírus responsável pela panzootia dos pombos, citado como "*pigeon* APMV-1" (PPMV-1). Este vírus é diferente do vírus padrão no teste de HI, mas não difere dos vírus utilizados nas vacinas

convencionais. Os métodos disponíveis para essa classificação permitem a distinção entre amostras com diferença acentuada no potencial patogênico (ARNS *et al.*, 2007).

Dentre os testes de patogenicidade estão o tempo de morte embrionária (TME) (HANSON & BRANDLY, 1955), o índice de patogenicidade intracerebral em pintos de um dia (IPIC) e o índice de patogenicidade intravenosa em galinhas com seis semanas (IPIV). Alternativamente, a virulência pode ser determinada pela avaliação da sequência de aminoácidos no sítio de clivagem da proteína F (posição 112–117) (ALEXANDER & SENNE, 2008; OIE, 2012). Para demonstrar a patogenicidade de cepas de Columbiformes o IPIC tem se demonstrado mais seguro, já que muitas cepas do vírus apresentam múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem da proteína F, no exame de sequenciamento, mas os resultados de IPIC não são similares aos de cepas patogênicas (COLLINS *et al.*, 1994; MEULEMANS *et al.*, 2002).

A OIE define DN como a doença resultante de infecção de aves com estirpes virulentas que apresente: um IPIC de pelo menos 0,7 em pintos de um dia ou a presença de múltiplos aminoácidos básicos, na fração C-terminal da proteína F2, ou o mesmo que a presença de fenilalanina no resíduo 117, que é a fração N-terminal da proteína F1. O termo "múltiplos aminoácidos básicos" se refere a pelo menos três resíduos de arginina ou lisina, entre os resíduos 113 e 116 (OIE, 2012).

No Brasil, nos casos de suspeita da doença, o MAPA deverá ser imediatamente comunicado e o diagnóstico é dado através das provas recomendadas pela OIE. Estas deverão ser realizadas em laboratório oficial ou credenciado pelo MAPA e confirmadas pelo Laboratório de Referência Nacional, o LANAGRO – SP (BRASIL, 2002).

Testes sorológicos, como ELISA podem ser utilizados, no entanto a grande variedade de cepas vacinais utilizadas ao longo dos anos pode dificultar a interpretação dos resultados. Além disso, o surgimento de novas cepas pode não ser identificado pelo painel de anticorpos (YUSSOF & TAN, 2010).

É importante uma abordagem multidisciplinar e um diagnóstico abrangente, que deve incluir, não apenas os novos testes da era genômica, mas também, técnicas mais tradicionais, como a histopatologia, imuno-histoquímica e isolamento do vírus (CATTOLI *et al.*, 2011).

Dentre os diagnósticos diferenciais devem ser levadas em consideração inúmeras infecções virais que acometem as aves, como o vírus da bronquite infecciosa (D O'ROURKE *et al.*, 1988); o Coronavírus, já associado a casos de pancreatite em

pombos (QUIAN *et al.*, 2006) e o Adenovírus e o Circovírus, em decorrência das lesões causadas em órgãos linfóides (GREENACRE, 2005). Já causando lesões no sistema nervoso central, são consideradas a encefalomielite equina leste e oeste (GREENAC, 2005), Bornavírus (BOURQUE *et al.*, 2015) e o vírus West Nile (SWAYNE *et al.*, 2001).

Deficiências nutricionais de vitamina A e E, assim como intoxicações, podem cursar com sinais neurológicos semelhantes aos observados na DN, porém as lesões histológicas permitem diferenciar as enfermidades. *Mycoplasma* por vezes acometem o sistema nervoso central e não devem ser desconsiderados no diagnóstico diferencial da DN (SWAYNE, 2008). Quanto a Influenza Aviária, estudos demonstram que os pombos não são susceptíveis a doença, porém cepas de alta patogenicidade devem ser incluídas no diagnóstico diferencial para a tomada de medidas imediatas de controle, já que esta espécie pode carrear a infecção de aves aquáticas para aves comerciais (CHRISTENSEN & WORTHINGTON, 2009).

## REFERÊNCIAS

ALDOUS, E.W.; ALEXANDER, D.J. Technical review: detection and differentiation of Newcastle Disease virus (avian paramyxovirus type 1). **Avian Pathology**, v.30, p. 117– 128, 2001.

ALDOUS, E.W. *et al.* A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. **Avian Pathology**, v.32, n.3, p.239-257, 2003.

ALEXANDER, D.J.; PARSON, G. Avian paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 2 pathogenicity experiments in pigeons and chickens. **The Veterinary Record**, v.12, p.466-468, 1984.

ALEXANDER, D.J. *et al.* Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons - an international collaborative study. **Avian Pathology**, v.14, p.365-376, 1985.

ALEXANDER, D.J. Taxonomy and nomenclature of avian Paramyxoviruses. **Avian Pathology**, v.16, p.547-552, 1987.

ALEXANDER, D.J. Newcastle diseases: Methods of spread. In: D.J. Alexander (Ed). **NewCastle disease**. Kluwer Academic Publishers, Boston. Volume 8, p.256-272, 1988.



ALEXANDER, D.J. *et al.* An outbreak of Newcastle disease in pheasants in Great Britain in May 1996. **Veterinary Record**, v.140, p.20-22, 1997.

ALEXANDER, D.J. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*) — a review. **Avian Pathology**, v.29, p.95-100, 2000a.

ALEXANDER, D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v.19 n.2, p.443-462, 2000b.

ALEXANDER, D.J.; SENNE, D.A. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: SAIF, Y.M.; FADLYA, M.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. (eds), **Disease of poultry**, 12th ed. Blackwell, Ames, p. 75–115, 2008.

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

ALEXANDER, D.J.; ALDOUS, E.W.; FULLER, C.M. The longview: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. **Avian Pathology**, v.41, n.4, p.329-335, 2012.

ARNS, C.W.; SPILKI, F.R.; ALMEIDA, R.S. Paramyxoviridae. In: FLORES, E.F. (ed), **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, p.659-688, 2007.

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

BARTON, J.T. Avian Paramyxovirus Type 1 Infections in Racing Pigeons in California. Clinical Signs, Pathology, and Serology. **Avian Diseases**, v.36, n.2, p. 463-468, 1992.

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

BOURQUE, L. *et al.* Identification of avian bornavirus in a Himalayan monal (Lophophorus impejanus) with neurological disease. **Avian Pathology**, v. 44, n. 4, p. 323–327, 2015.

BRASIL- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa DSA N°32, de 13 de maio de 2002. Aprova as Normas Técnicas de Vigilância para a doença de Newcastle e Influenza Aviária, e de controle e erradicação para a doença de Newcastle. Publicado no Diário Oficial da União em 14 de maio de 2002, Seção 1, Página 28.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria n° 70, de 03 de março de 1994a. Regulamenta a obrigatoriedade de comunicação da suspeita da Doença de Newcastle. Publicado no Diário Oficial da União em 04 de Março de 1994.

BRASIL- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria n.º 162, de 18 de outubro de 1994b. Aprova as Normas complementares anexas à presente Portaria, baixadas pelo Departamento de Defesa Animal, que versam sobre a Fiscalização e o Controle Zoossanitário das Exposições, Feiras, Leilões e outras aglomerações de animais, em todo território Nacional. Publicado no Diário Oficial da União em 21 de outubro de 1994, Seção 1.

BRASIL- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria n.º 144, de 23 de dezembro de 1997. Suspende a entrada em território Nacional de avestruzes, aves ornamentais domésticas e silvestres e ovos férteis dessas mesmas aves. Publicado no Diário Oficial da União em 24 de dezembro de 1997, Seção 2, Página 9761.

BRASIL- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento(MAPA). Instrução Normativa DSA N.º11, de 1.º de setembro de 2003. Declara os plantéis avícolas industriais dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Distrito Federal livres da doença de Newcastle. Publicado no Diário Oficial da União em 05 de setembro de 2003, Seção 1, Página 3.

BRASIL- Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa n.º 46, de 2 de setembro de 2008. Aprova os procedimentos para importação de material genético destinado à reposição de plantéis avícolas de galinhas (*Gallus gallus*), galinha d'angola (*Numida meleagris*), perus (*Meleagris gallopavo*), codornas (*Coturnix coturnix*), aves palmípedes (patos, gansos e marrecos), faisões (*Phasianus colchicus*) e perdizes (gênero *Alectoris*) descritos no Anexo I, e os requisitos zoossanitários para importação de ovos incubáveis e aves de um dia, constantes dos Anexos II e III. Publicado no Diário Oficial da União em 03 de setembro de 2008, Seção 1, Página 3.

BRASIL- Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento (MAPA). Instrução normativa n.º 17, de 3 de agosto de 2010a. Aprova os procedimentos e requisitos zoossanitários para a importação de aves para fins ornamentais e seus ovos férteis pelo Brasil. Publicado no Diário Oficial da União em 04 de agosto de 2010, Seção 1, Página 3.

BRASIL- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento(MAPA). Instrução Normativa n.º 23, de 28 de setembro de 2010b. Altera o art. 3.º do Anexo III da Instrução Normativa n.º 17, de 3 de agosto de 2010. Publicado no Diário Oficial da União em 04 de setembro de 2010, Seção 1.

BROWN, C; KING, D.J.; SEAL, B.S. 1999. Pathogenesis of Newcastle Disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. **Veterinary Pathology**, v.36, p.125–132.

CARRASCO, A.O.T.*et al.* Experimental infection of Newcastle disease virus in pigeons (*Columba livia*): Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. **Veterinary Microbiology**, v.129, p.89–96, 2008.

CASTRO, E.R.; ZANETTI, F.; ARBIZA, J. Genetic characterization of a pigeon Paramyxovirus Type 1 isolated from *Columba livia* in Uruguay. **Avian Disease**, v.56, n.1, p.243-248, 2012.

CATTOLI, G. *et al* Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa—Implications for diagnosis and control. **Veterinary Microbiology**, v.142, p.168–176, 2010.

CATTOLI, G. *et al*. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n.4, p. 637–656, 2011.

CATROXO, M.H.B.*et al*. Research of viral agent in free-living pigeon feces (*Columba livia*) in the city of São Paulo, SP, Brazil, for transmission electron microscopy. **International Journal of Morphology**, v.29, n.2, p.628-635, 2011.

CFSPH - The Center for Food Security & Public Health. Newcastle disease. College of Veterinary Medicine. Iowa State University. Animal Disease Information, p. 1-7. 2008. Disponível em: <<http://cfsph.iastate.edu>>. Acesso em: 07 de fev. de 2016.

CHOI, K.S. *et al*. Molecular epidemiological investigation of velogenic Newcastle disease viruses from village chickens in Cambodia. **Virus Genes**, v.47, p.244–249, 2013.

CHOI, K.S. *et al*. Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses in Vietnam. **Tropical Animal Health and Production**, v.46, n.1, p.271–277, 2014.

CHRISTENSEN, N.H.; WORTHINGTON, B. Import risk analysis: Pigeons (*Columba livia*) from Australia. **MAF Biosecurity New Zealand**. Disponível em: <<http://taxmithscont.eu/sowiha6114.pdf>>. Acesso em: 10 de fev. de 2015.

CLAVIJO, A.*et al*. Velogenic Newcastle disease in imported caged birds. **Canadian Veterinary Journal**, v.41, p.404-406, 2000.

COLLINS, M. S.; STRONG, I.; ALEXANDER, D. J. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed “pigeon PMV-1 viruses.” **Archive of Virology**, v.134, p.403–411, 1994.

GREENACRE, C.V. Viral diseases of companion birds. **Veterinary Clinical Exotic Animal**, v.8, p.85–105, 2005.

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

CZEGLÉDI, A. *et al*. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. **Virus Research**, v.120, p.36–48, 2006.

DIEL, D.G. *et al.* Characterization of Newcastle disease viruses isolated from cormorant and gull species in the United States in 2010. **Avian diseases**, v.56, n.1, p.128-33, 2012a.

DIEL, D.G. *et al.* Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.2, p.378-387, 2012b.

DIEL, D.G. *et al.* Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, p.1770–1779, 2012c.

DOYLE, T.M. A Hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. **Journal of Comparative Pathology Therapy**, v.40, p.144-169, 1927.

DO'ROURKE, D.; BUTTON, C.; FARAGHER, J.T. Isolation of Infectious Bronchitis virus from a flock of Racing pigeons. **Australian Veterinary Journal**, v.65, n.7, p.228, 1988.

DORTMANS, J.C.F.M. Virulence determinants of Newcastle disease virus. **Tese de doutorado. University Utrecht. Utrecht. 2011.**136f.

ECCO, R. *et al.* Neurological lesions in chickens experimentally infected with virulent Newcastle disease virus isolates. **Avian Pathology**, v.40, n.2, p.145-152, 2011.

FERNANDES, C.C. *et al.* Molecular and phylogenetic characterization based on the complete genome of a virulent pathotype of Newcastle disease virus isolated in the 1970s in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v.26, p.160–167, 2014.

FORNELLS, L.A.M.G. *et al.* Detection of paramyxoviruses in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on the Brazilian tropical coast. **Veterinary Microbiology**, v.156, p.429–433, 2012.

FORRESTER, N.L. *et al.* Identification of a new Newcastle disease virus isolate from Indonesia represents an ancestral lineage of class II genotype XIII. **Virus Genes**, v.47 n.1, p.168–172, 2013.

GOEBEL, S.J. *et al.* Isolation of Avian Paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. **Journal of virology**, v.81, n.22, p.12709-12714, 2007.

GOHM, D.S.; THÜR, B.; HOFMANN, M.A. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR 2000. **Avian Pathology**, v.29, p.143– 152, 2000.

GUO, H. *et al.* A comparative study of pigeons and chickens experimentally infected with PPMV-1 to determine antigenic relationships between PPMV-1 and NDV strains. **Veterinary Microbiology**, v.168, p.88–97, 2014.

- HADDAS, R. *et al.* Newcastle disease virus in Little Owls (*Athene noctua*) and African Penguins (*Spheniscus demersus*) in an Israeli Zoo. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.61, p.79-82, 2014.
- HANSON, R.P; BRANDLY, C.A. Identification of vaccine strains of Newcastle Disease Virus. *Science*, v.122, p.156-157, 1955.
- 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**, v.2012, p.1-17, 2012.
- HUANG, Z. *et al.* The Hemagglutinin-Neuraminidase Protein of Newcastle Disease Virus Determines Tropism and Virulence. **Journal of Virology**, v.78, n.8, p.4176–4184, 2004.
- IRVINE, R.M. *et al.* Outbreak of Newcastle disease due to pigeon paramyxovirus type 1 in grey partridges (*Perdix perdix*) in Scotland in October 2006-2009. **Veterinary Record**, v.165, p.531-535, 2009.
- KALETA, E.F.; ALEXANDER, D.J.; RUSSEL, P.H. The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? **Avian Pathology**, v.14, p.553-557, 1985.
- KIM, L. M. *et al.* Phylogenetic diversity among low-virulence Newcastle Disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. **Journal of Virology**, v.81, n.22, p.12641–12653, 2007.
- KIM, L. M. *et al.* Biological and phylogenetic characterization of pigeon Paramyxovirus Serotype 1 circulating in wild north american pigeons and doves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.10, p. 3303–3310, 2008.
- KUIKEN, T. *et al.* Pathology of Newcastle disease in double-crested cormorants from Saskatchewan, with comparison of diagnostic methods. **Journal of Wildlife Diseases**, v.35, n.1, p.8-23, 1999.
- KOMMERS, G.D. *et al.* Pathogenesis of six pigeon-origin isolates of Newcastle disease virus for domestic chickens. **Veterinary Pathology**, v.39, p.353–362, 2002.
- KRANEVELD, A.J. A poultry disease in the Dutch East Indies. **Nederlands Indische Bladen voor Diergeneeskunde**, v.38, p.448-450, 1926.
- LINDH, E. *et al.* Molecular epidemiology of outbreak-associated and wild-waterfowl-derived Newcastle disease virus strains in Finland, including a Novelclass I genotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.11, p.3664-3673, 2012.
- LIU, H. *et al.* Phylogenetic characterization and virulence of two Newcastle disease viruses isolated from wild birds in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v.20, p.215-224, 2013.

MAMINIAINA, O. F. *et al.* Newcastle Disease virus in Madagascar: identification of an original genotype possibly deriving from a died out ancestor of Genotype IV. **PLoS ONE**, v.5, n.11, p.1-12, 2010.

MEULEMANS, G. *et al.* Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. **Avian Pathology**, n.31, p.515– 519, 2002.

MILLER, P.J.; DECANINI, E.L.; AFONSO, C.L. Newcastle disease: Evolution of the genotypes and the related diagnostic challenges. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10, p.26–35, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SANIDADE ANIMAL (OIE). NEWCASTLE DISEASE: A etiology epidemiology diagnosis prevention and control references. 2013. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/NEWCASTLE\\_DISEASE.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/NEWCASTLE_DISEASE.pdf)>. Acesso em: 23 dez. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SANIDADE ANIMAL (OIE). **Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)**. 7 ed., v.1, 2012a. Online. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 22 out. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SANIDADE ANIMAL (OIE). Disease Information. Immediate Notifications and Follow-ups.2015. Disponível em: <[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary/listoutbreak](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary/listoutbreak)>. Acesso em: 24 nov. 2015.

PAULILLO, A.C.; JÚNIOR, L.C. Doença de Newcastle. In: JÚNIOR, A.B.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (eds), **Doenças das aves**. 2th, ed Facta, Campinas, p. 587-608, 2008.

PEDERSEN, J.C. *et al.* Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.5, p.2329–2334, 2004.

PORTAL MADEIRA. Controlado surto da doença de newcastle em pombos no porto santo. 2015. Disponível em: < <http://www.jm-madeira.pt/artigos/controlado-surto-da-doen%C3%A7a-de-newcastle-em-pombos-no-porto-santo>>. Acesso em: 07 de jan. de 2016.

QUIAN, D.H. *et al.* Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, n.9, p.1575-1579, 2006.

ROTT, R. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxoviruses. **Archives of Virology**, v.59, n.4, p.285-298, 1979.

RUE, C.A. *et al.* Evolutionary changes affecting rapid identification of 2008 Newcastle Disease viruses isolated from double-crested Cormorants. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48 n.7, p.2440–2448, 2010.

SEAL, B.S.; KING, D.J.; BENNETT, J.D. Characterization of Newcastle Disease virus isolates by Reverse Transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.10, p.2624-2630, 1995.

SHENGQING, Y. *et al.* Generation of Velogenic Newcastle Disease Viruses from a Nonpathogenic Waterfowl Isolate by Passaging in Chickens. **Virology**, v.301, p.206–211, 2002.

SNOECK, C.J. *et al.* Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. **Archive of Virology**, v.154, p.47–54, 2009.

SNOECK, C.J. *et al.* High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: cocirculation of genotype XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.7, p.2250–2260, 2013a.

SNOECK, C.J. *et al.* Genetic diversity of Newcastle Disease virus in wild birds and pigeons in West Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n. 24, p.7867–7874, 2013b.

STOKES, D.L.; BOERSMA, P.D. Sattelite tracking of Magellanic penguin migration. **The condor**, v.100, p.376-381, 1998.

SUSTA, L. *et al.* Pathogenicity evaluation of different Newcastle disease virus chimeras in 4-week-old chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v.42, p.1785-1795, 2010.

SWAYNE, D.E., *et al.* Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) Caused by West Nile Virus. **Emerging Infectious Disease**, v.7, n.4, p.751-753, 2001.

SWAYNE, D.E. Nervous system. In: FLETCHER, O.J. (Ed) **Avian Histopathology**. 3th ed. Omni Press, Madison, 2008. P. 260-291.

TAN, S.W. *et al.* Sequence and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Malaysia between 2004 and 2005. **Archives of Virology**, v.155, p. 63-70, 2010.

TOLF, C. *et al.* Prevalence of avian paramyxovirus type 1 in Mallards during autumn migration in the western Baltic Sea region. **Virology Journal**, v.10, n.1, p.285-304, 2013.

UMALI, D.V. *et al.* Surveillance of Avian Paramyxovirus in migratory waterfowls in the San-in region of Western Japan from 2006 to 2012. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.76, n.3, p.423–430, 2014.

- UJVARI, D. *et al.* Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. **Virus Research**, v.96, p. 63 -73, 2003.
- WAKAMATSU, N. *et al.* Experimental pathogenesis for chickens, turkeys, and Pigeons of exotic Newcastle Disease virus from an Outbreak in California during 2002–2003. **Veterinary Pathology**, v.43, p.925–933, 2006.
- WEHMANN, E. *et al.* Occurrence of genotypes IV, V, VI and VIIa in Newcastle disease outbreaks in Germany between 1939 and 1995. **Avian Pathology**, v.32, p.157-163, 2003.
- WERTHER K. Columbiformes (Pomba, Rolinha, Avoante, Juriti). In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R. and CATÃO-DIAS, J. L. (Eds) **Tratado de animais selvagens**. v.1. 1<sup>th</sup> ed. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 18, p. 268-289.
- WESTBURY, H. *et al.* Newcastle disease virus: an evolving pathogen? **Avian Pathology**, v.30, n.1, p.5–11, 2001.
- XIAO, S. *et al.* Complete genome sequences of Newcastle disease virus strains circulating in chicken populations of Indonesia. **Journal of Virology**, v.86, p.5969–5970, 2012.
- XIE, Z. *et al.* Complete genome sequence analysis of a Newcastle disease virus isolated from a wild egret. **Journal of Virology**, v.86, n.24, p.13854–13855, 2012.
- YUSSOF, K.; TAN, W.S. Newcastle disease virus: Macromolecules and opportunities. **Avian Pathology**, v.30, p.439– 455, 2010.
- ZANETTI, F. *et al.* Biological and molecular characterization of a pigeon Paramyxovirus Type-1 isolate found in Argentina. **Avian Diseases**, v.45, p.567-571, 2001.
- ZHU, W. *et al.* Phylogenetic and pathogenic analysis of Newcastle disease virus isolated from house sparrow (*Passer domesticus*) living around poultry farm in southern China. **Virus Genes**, v.40, n.2, p.231–235, 2010.



### **3. ARTIGO**

Neste item é apresentado o artigo intitulado “Infecção por paramixovirus tipo 1 em pombos (*Columba livia*) no Sul do Brasil.” a ser submetido em breve conforme as normas do periódico Pesquisa Veterinária Brasileira.

## Paramyxovirus Type 1 Infection in Pigeons (*Columba livia*) of Southern Brazil

Suyene O. de Souza<sup>1</sup>, Gabriela Fredo<sup>1</sup>, Priscilla M. Dupont<sup>2</sup>, Ronaldo V. Leite-Filho<sup>1</sup>, Jens P. Teifke<sup>3</sup>, Caroline P. de Andrade<sup>1</sup>, Saulo P. Pavarini<sup>1</sup>, Cláudio W. Canal<sup>2</sup> e David Driemeier<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT.** – SOUZA S.O., FREDO G., DUPONT P.M., LEITE-FILHO R.V., TEIFEK J.P., ANDRADE C.P., PAVARINI S.P., CANAL, C.W. & DRIEMEIER D. **Paramyxovirus Type 1 Infection in Pigeons of Southern Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

The Newcastle disease, caused by avian paramyxovirus serotype 1 strains (APMV-1) is an important avian disease involved into high rates of mortality and economic losses. Several outbreaks have been reported over the last 30 years in Columbiformes in different parts of the world, caused by a specific strain of APMV-1, called pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV-1). A mortality surge was analyzed in free-living pigeons (*Columba livia*) from a public square in Porto Alegre in Southern Brazil. A total of 24 pigeons moribund or freshly dead, within five weeks interval were submitted to necropsy, histopathological, immunohistochemical (anti-Newcastle), and RT-PCR followed by sequencing of the amplification products analysis. They presented neurological signs, non-suppurative encephalitis and encephalomyelitis, and mononuclear inflammatory infiltrate in different organs. Immunohistochemical analysis in nine pigeons tissue showed that anti-Newcastle was expressed in brain, kidney, liver and pancreas. The RT-PCR test for the M protein of Newcastle disease virus was positive in six pigeons. The differential diagnosis of *Influenza*, West Nile, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in all pigeons presented negative results. The sequence of amino acids in the cleavage site region of the F protein was <sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup>. The phylogenetic analysis classified this virus strain into Class II and VI genotype.

INDEX TERMS: PPMV-1, Newcastle disease, encephalomyelitis, Columbiformes.

**RESUMO.** – A doença de Newcastle, causada por cepas de paramixovírus aviário 1 (APMV-1), é uma doença de aves importante por causar altos índices de mortalidade e perdas econômicas. Vários surtos têm sido relatados ao longo de 30 anos em aves da ordem Columbiformes, em diferentes partes do mundo, causados por uma cepa específica de APMV-1, denominada *pigeon paramyxovirus tipo 1* (PPMV-1). Foi analisado um surto de mortalidade em pombos domésticos (*Columba livia*), provenientes de uma praça pública, em Porto Alegre no Sul do Brasil. Um total de 24

<sup>1</sup>Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. <sup>3</sup>Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit Südufer 10 D-17493 Greifswald - Insel Riems. Autor para correspondência: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

aves moribundas ou mortas, no intervalo de cinco semanas, foram submetidas ao exame de necropsia, exame histopatológico, imuno-histoquímico anti-Newcastle, RT-PCR e sequenciamento. Apresentaram sinais neurológicos, encefalite e encefalomielite não supurativas, além de infiltrado inflamatório mononuclear em diversos órgãos. Ao exame imuno-histoquímico, nove aves demonstraram-se positivas em órgãos como cérebro, rim, fígado e pâncreas. Seis aves foram positivas no exame de RT-PCR para a proteína M do vírus da Doença de Newcastle. Nos exames de diagnósticos diferenciais de *Influenza*, West Nile, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma sinoviae*, todas as aves testadas foram negativas. A sequência dos aminoácidos na região do sítio de clivagem da proteína F foi <sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup>. De acordo com a análise filogenética o vírus identificado foi classificado como pertencente à classe II e ao genótipo VI.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO: PPMV-1, Doença de Newcastle, encefalomielite, Columbiformes.**

## INTRODUCTION

The Newcastle disease, caused by virulent strains of avian paramyxovirus serotype 1 strain (APMV-1), is considered one of the most important avian diseases involved into high rates of mortality and economic losses, which is notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE 2012). The avian paramyxovirus can be divided into nine serogroups: APMV-1 to APMV-9 (ICTV, 2015), and several avian species, domestic and wild, can be affected by the Newcastle disease virus (NDV) both natural and experimental (Alexander 2000a, Clavijo *et al.*2000). Migratory birds and wild birds may often carry APMV-1 strains of low virulence, that they can spread to commercial poultry (Alexander 2000b, Zhu *et al.*2010). The strains of low virulence after repeated passages in asymptomatic aquatic animals may become pathogenic (Shengqing *et al.*2002). Several outbreaks in Columbiformes have been reported over the past 30 years in many parts of the world caused by a specific APMV-1 strain, denominated pigeon paramyxovirus serotype 1 (PPMV-1)(Alexander 2011). Pigeons must be considered seriously as a potential source of NDV infection and disease for commercial poultry flocks (Kommers *et al.* 2002), and may be infected even without showing clinical signs spreading the virus for a considerable period of time (Carrasco *et al.* 2008, Catroxo *et al.* 2011). This variant has been previously described in high mortality outbreaks worldwide in different species of birds (Alexander *et al.*1985, Alexander *et al.*1987, Alexander *et al.*1997). The specific pigeon strain (PPMV-1) causes severe lesions among infected chickens, mostly affecting the heart and brain (Kommers *et al.*2002). Clinical signs were apathy, anorexia, weight loss, prostration, diarrhea, polyuria, conjunctivitis, periocular edema, ruffled feathers, sneezing, dyspnea, pneumonia, incoordination, lack of balance, tremors, thick saliva, proventricular dilatation, crop emptying problems, leukopenia and death. Some other symptomatic and asymptomatic birds had sudden death (Clavijo *et al.*2000, Catroxo *et al.*2012). NDV strains can be classified into at least three major pathotypes (lentogen, mesogen, and velogen) on the basis of the severity of disease they cause in chickens (Alexander & Senne 2008). The pathotype can be determined by *in vivo* pathogenicity tests, including mean death time (MDT), intracerebral pathogenicity index (ICPI), and intravenous pathogenicity index (IVPI). Alternatively, virulence can also be deduced by amino acid sequence of the fusion protein cleavage site (positions 112–117)(Alexander & Senne 2008, OIE 2012). In this paper, we describe in detail the first outbreak of a

paramyxovirus type 1 infection in free-living pigeons (*Columba livia*) in Southern Brazil in the summer of 2014.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples

The mortality losses of free-living pigeons (*Columba livia*) from a town square in the city of Porto Alegre (30°1'59"S, 51°13'48"W) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, was analyzed and evaluated. A complete necropsy was performed on 24 freshly dead or moribund pigeons with neurological signs. Along the five week surge, gross examination was performed that is, one pigeon in the first week, six pigeons in the following week, one pigeon in the third week, six pigeons in the fourth week, and ten pigeons in the fifth week. Samples from all tissues were collected for histological analyses. Tissues were fixed in 10% neutral-buffered formalin and processed in a routine manner and stained with hematoxylin and eosin for histological examination.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) was performed on brain and liver paraffin sections using the peroxidase method. For antigen retrieval the sections were treated by heating in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) for 5 min at 100°C using a microwave oven. After antigen retrieval all the section were incubated overnight in a humidified chamber at room temperature with the primary antibody (anti-Newcastle, BIOSSE®, bs-4814R-HRP/ Polyclonal antibody, HRP conjugated) used at 1:500 dilution in phosphate-buffered saline (PBS). The sections were revealed by 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, DakoCytomation®, Inc. North America, Carpinteria, California, USA), were counterstained with Mayer's hematoxylin for AEC chromogen for approximately 10 sec. and the coverslips were mounted by use of aqueous mounting medium (S1964, DakoCytomation®), and slides were examined by light microscopy. Positive and negative controls (brain and liver tissues from a RT-PCR positive pigeon for NDV) were incubated with antibody diluent (catalogue no. S3022, DakoCytomation®).

### RNA extraction and reverse transcription PCR (RT-PCR)

Oropharyngeal and cloacal swabs, as well as tissue samples, which were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2, and stored at -80°C for further analysis. Total RNA was isolated from each tissue by using the TRIzol® LS Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's recommendations, and eluted in 50 µL of ultrapure water. Total RNA was extracted from 250 µL of each sample using TRIzol® LS Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and eluted in 50 µL of ultrapure water. The freeze-dried attenuated live vaccine Avinew® (Merial Animal Health Limited, Lyon, France) was used as positive control and ultrapure water was used as a negative control. In order to detect NDV, a previously described RT-PCR based on M protein gene amplified 231 bp (Seal *et al.*, 1995). The cDNA was synthesized with SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies), following the manufacturer's recommendations. The PCR was conducted in a total volume of 25 µL. Reactions were performed in a Veriti 60-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA).

#### **Primers design for complete fusion protein (f) gene**

Twenty seven APMV-1 complete genome sequences were selected in GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) in order to select primers for sequencing of complete F gene. The complete genome sequence of the strain AV 3224/96 (GenBank accession number GQ.429292.1) was selected for primer design due to the high identity with our samples and with the fusion protein sequence of the isolate Amazon/Missouri/31378/1996 (GenBank accession number JN.942032.1). Specific primers were selected to amplify the complete sequence of 1855 base pairs (bp) using Vector NTI Advance® Software (Life Technologies).

#### **Amplification of the F protein gene by RT-PCR**

The complete F protein gene was amplified using the four primers pairs (Table 1). The cDNA was synthesized with SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies) using Exo-Resistant Random Primer (Life Technologies), following the manufacturer's recommendations. Each primer pair was used in a single PCR reaction and was conducted in a total volume of 25 µL containing: 1× PCR buffer, 1 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM of dNTP mix, 0.24 mM of each forward and reverse primer and 1 unit of Platinum® Taq DNA Polymerase (Life Technologies), under the following

conditions: an initial denaturation at 94°C for 3 min, 35 cycles of 45 sec for desnaturation at 94°C, 45 sec of primer annealing at 52°C, 45 sec for extension at 72°C, and 7 min of final extension at 72°C. All the amplification products were separated by gel electrophoresis in 2.0% agarose gels.

### **Sequencing and phylogenetic analysis**

The PCR products generated by M protein primers and the set of primers design in the present study were purified using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and both strands were sequenced with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using a BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). The gene sequences of the fusion protein were assembled using SeqMan (DNASTAR Lasergene® 11, Madison, USA and software MEGA 6). For construction of F protein phylogenetic tree, reference sequences representing recognized genotypes in class II and I were retrieved from Kim *et al.* 2008 and GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and aligned with BioEdit version 7.1.3 software using CLUSTAL W. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA6) (Tamura *et al.* 2013) was used for phylogeny inference according to the Maximum Likelihood criterion and the General Time Reversible model. The robustness of the hypothesis was tested with 1000 non-parametric bootstrap analyses.

### **Additional exams**

Out of 24 pigeons examined, 6 were tested by PCR for the following agents: *Influenza*, West Nile, *Mycoplasma gallisepticum*, and *Mycoplasma synoviae*.

## **RESULTS**

### **Clinical and epidemiological features**

A mortality surge was analyzed in free-living pigeons (*Columba livia*) from a public square in a city of Porto Alegre in Southern Brazil in November of 2014. Clinical signs observed were tremors of the head, stiff neck, lack of balance, incoordination, paresis, paralysis, drooped wings, and vomit (Figure 1-A). The data provide information about the epidemiology namely, the time between the onset of clinical signs and death time with average time of 24-48h. The approximate number of dead pigeons

was 120, which means approximately 80% of the birds. However, the exact number of birds could not be obtained because it is an outbreak of free-living birds. There were no reports that other bird's species died in this square. Only adult free-living pigeons of both sexes with access to a fountain where they fed up with what they found on the ground.

### **Gross findings**

Gross findings included multifocal to coalescing subdural hemorrhage in the spinal cord (Figure 1-B). Proventriculus and small intestine serous showed marked congestion. Both the spleen and liver were markedly enlarged, with a widespread reddish color. The pancreas showed mildly increased size, which exhibit multifocal whitish color. In a focally extensive area of the cervical (neck) region, bright areas of hemorrhage extended into subcutis. No other significant gross abnormalities were noted.

### **Microscopic findings**

Histopathologic examination revealed non-suppurative encephalitis and encephalomyelitis involving all compartments of the central nervous system, with prominent perivascular lymphoplasmacytic cuffing (14/24), neuronophagia (8/24), microgliosis (12/24), neuropil vacuolization (4/24), gitter cells (3/24), and lymphoplasmacytic meningitis (4/24) (Figure 2-A). In the spinal cord were observed perivascular lymphoplasmacytic cuffing (7/17), neuronophagia (3/17), microgliosis (5/17), vascular proliferation (3/17), gitter cells (2/17), vessel congestion in the dura mater (3/17), lymphoplasmacytic meningitis (1/17), gliosis (1/17), and neuropil vacuolization (1/17) (Figure 2-B). One pigeon had eosinophilic intracytoplasmic inclusions measuring 3-5  $\mu\text{m}$  in neurons in the gray matter of the spinal cord. In the kidneys, multifocal lymphoplasmacytic and rare macrophages interstitial nephritis (22/24), necrosis of tubular epithelial cells (3/240), hemorrhage (2/24) (Figure 2-C). In the spleen, lymphoid depletion (6/24), lymphoid necrosis associated with fibrin deposition (10/24), hemosiderosis (14/24), macrophage infiltration, and hemorrhage (2/24). In the liver, periportal lymphoplasmatic, macrophage, and heterophil infiltration (20/24) (Figure 2-D). In the pancreas, lymphocytic infiltrate (17/24), sometimes associated with extensive necrosis (6/24) (Figure 2-E). Lymphocytic infiltration was



observed in two female oviduct and and five males had testicle with tubular degeneration sometimes associated with lymphocytic infiltration.

### **Immunohistochemistry**

ND virus antigens were detected in the cytoplasm of astrocytes (Figure 2-F) and in the nucleus of neurons in the brain, in the cytoplasm of macrophages in the liver, in the cytoplasm of epithelial cells of exocrine pancreas, and in the cytoplasm of epithelial cells of the kidney (Table 2).

### **RT-PCR and phylogenetic analysis**

Out of the 24 pigeons tested, 6 pigeons were positive for NDV by RT-PCR for the matrix (M) protein gene (Table 2). The NDV RT-PCR products recovered from the positive pigeons were sequenced and compared with the available NDV sequences present in GenBank. Based on these results, it appears that the sequences were virtually identical to each other. The complete genome sequence and the complete coding sequence of the fusion (F) gene according to the unified NDV classification system showed that isolate had cleavage site <sup>112</sup>RRQKRF<sup>117</sup> which is characteristic of velogenic strains (Table 3). Phylogenetic analysis of protein F showed that this strain could be classified into class II and genotype VI (Figure 3).

### **Additional exams**

All the pigeons tested were negative for *Influenza*, West Nile virus, *Mycoplasma gallisepticum*, and *Mycoplasma synoviae*.

## **DISCUSSION**

The diagnosis of NDV was confirmed through histological, immunohistochemical, and molecular analysis. The pigeons in this study presented neurological signs that included ataxia, imbalance, head tremors, incoordination, torticollis and incoordination to fly. All these signals have been described as the primarily signals observed in the order Columbiformes (Barton *et al.* 1992). The gross findings were nonspecific. However, most of the pigeons presented a focally extensive area of hemorrhage in the cervical (neck) region, which extended into subcutis. It is

known that the order Columbiformes exhibit prominent vascular plexus in the cervical region (Werther 2007), which may have been injured as a result of the tremors and head rotation.

Histological lesions observed in the pigeons were similar to those described in the literature, such as non-suppurative encephalitis, sometimes associated with malacia, demyelination, vasculitis, microgliosis and gitter cells infiltrate (Bhaiyat *et al.* 1994), focal neuronal degeneration, gliosis, perivascular cuffing (Brown *et al.* 1999, Ecco *et al.* 2011). In other organs can be observed mononuclear cells and necrotic areas and may occur in the spleen, degeneration and necrosis of the lymphoid cells (Bhaiyat *et al.* 1994, Kuiken *et al.* 1999). The large amount of virus found in experimentally infected bird brain by PPMV-1 suggests a high of this viral strain to the central nervous system (Kommers *et al.* 2002), justifying the presence of lesions in the CNS of most pigeons analyzed in our study.

Immunohistochemical analysis was positive in nine pigeons in at least one tissue analyzed. The absence of staining in other pigeons can be related to longer period of clinical signals, and in many cases there maybe not association between injury and viral presence. The absence of positive staining may also indicate an ended up of the lesions or that undetectable levels of virus can generate inflammatory lesions (Ecco *et al.* 2011) due to greater sensitivity of nervous tissue (Brown *et al.* 1999). It should be taken into consideration also that viral replication can not be the only mechanism of neuronal damage, probably some damage occurs due the vascular impairment, in addition to direct neuronal necrosis caused by the virus (Ecco *et al.* 2011). There is a report of a bird with deposition of eosinophilic granular material in neuron bodies in an experimental study (Kommers *et al.* 2002), and another with the same structures in the cells of respiratory epithelium and neuroglia cells (Hamid *et al.* 1991). In our study there was no positive staining in these structures observed in the spinal cord by the immunohistochemical analysis. Therefore is not possible to state that these are paramyxovirus particles.

The pigeons examined in the last week of the outbreak were not positive in the RT-PCR, possibly due the longest clinical course. It was not possible identify viral material in the swabs of the cloaca and trachea, and even in the organs. Experimental studies with pigeons viral strains have been demonstrated that the pigeons eliminated the virus mainly in the first days post infection (Dortmans 2011a). In tissues it was seen

more frequently until the sixth day after infection (Hamid *et al.*1991). The RT-PCR analysis and the sequencing were effective for the detection of virus and in the deduction of the virulence (Alexander *et al.*2012). These techniques have been widely used because they are faster and less laborious than *in vivo* tests (Alexander 2000b) allowing through phylogenetic studies determines the source and possible spread and mutation of the strain, in addition these techniques are a good alternative in outbreaks (Aldous & Alexander 2001). In this study they were effective and essential tools for the diagnosis.

Currently, ND is defined to an infection of birds caused by a virus of APMV-1 that has an ICPI greater than 0.7 or if multiple basic amino acids are present in the C-terminus of the F2 protein and the N-terminus of the protein F1 (OIE 2012). With the sequencing was possible to confirm the diagnosis of ND, because the viral strain described here had arginine and lysine residues between positions 113 and 116 and a phenylalanine residue at position 117.

Differential diagnoses included *Influenza*, West Nile virus, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*, agents that can cause damage to the central nervous system (Swayne *et al.* 2001, Swayne 2008). None of the pigeons tested was positive for these agents. All pigeons showed changes in histological analysis, which did not occur in other diagnostic methods used. Therefore it is concluded that is extremely important to associate with histology other diagnostic tools. Whereas the immunohistochemical analysis enable differentiation from other agents and the RT-PCR analysis and sequencing of the samples carried out directly determines the viral virulence.

The potential of the carrier pigeons to introduce the disease in certain areas has been reported since the early 1980s (Alexander 2000b) including countries in South America (Castro *et al.* 2012, Zanetti *et al.* 2001). The strain of the present study showed homology with the strain identified in an outbreak in Argentina (Zanetti *et al.*2001), relatively close area to the state of Rio Grande do Sul. The mortality outbreak occurred near the Guaiba river (in the east of the Rio Grande do Sul State, intersection of the meridian 50° and 52° west longitude and the parallels 30° and 31° south latitude). The hypothesis that the infection has been acquired from aquatic and wild birds, inhabitants of this region (Accordi & Barcellos 2006) can not be ruled out.

After natural transmission from pigeons to chickens, PPMV-1 strains may become more virulent and lead to major outbreaks (Dortmann 2011b). The specific strain of pigeons, the PPMV-1 can cause severe lesions in infected chickens (Kommers *et al.*2002). Commercial poultry may be susceptible to identified strain in the pigeons of the outbreak presented here. However it is concluded from the present report outbreak that the identified strain is pathogenic for pigeons and that because the clinical signs presented similar to those reported in the literature (Brown *et al.*1999). The lesions found mostly in the central nervous system associated with the identification of the agent through immunohistochemical examination strongly suggests that the strain involved in this study it is a neurotropic strain.

## REFERENCES

- Accordi I. A. & Barcellos A. 2006. Composição da avifauna em oito áreas úmidas da Bacia Hidrográfica do Lago Guaíba, Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Ornitol.* 14(2):101-115.
- Aldous E. W. & Alexander D. J. 2001. Technical review: detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian. Pathol.* 30:117-128.
- Alexander D.J., Russell P.H., Parsons G., Abu Elzein E.M.E., Ballouh A., Cernik K., Engstrom B., Fevereiro M., Fleury H.J.A., Guittet M., Kaleta E.F., Kihm U., Kusters J., Lomniczi B., Meister J., Meulemans G., Nerome K., Petek M., Pokomunski S., Polten B., Prip M., Richte R., Saghy E., Samberg Y., Spanoghe L. & Tumova B. 1985. Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type I isolates from pigeons an international collaborative study. *Avian. Pathol.*14:365-376.
- Alexander D.J., Manvell R.J., Kemp P.A., Parsons G., Collins M.S., Brockman S., Russell P.H. & Lister S.A. 1987. Use of monoclonal antibodies in the characterization of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. *Avian. Pathol.* 16:553-56.
- Alexander D.J. 1990. Avian Paramyxoviridae - recent developments. *Vet. Microb.* 23:103-114.
- Alexander D.J., Manvell R.J., Frost K.M., Pollitt W.J., Welchman D. & Perry K. 1997. An outbreak of Newcastle disease in pheasants in Great Britain in May 1996. *Vet. Rec.* 140:20-22.
- Alexander D.J. 2000a. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*) –a review. *Vet Pathol.* 29: 95–100.

Alexander D.J. 2000b. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 19(2):443-462.

Alexander D. J. & Senne D. A., 2008. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.E. Swayne (eds), Disease of poultry, 12th ed. Blackwell, Ames, pp. 75–115.

Alexander D.J. 2011. Review article: Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. Avian. Pathol. 40(6):547-558.

Alexander D. J., Aldous E.W. & Fuller C.M. 2012. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. Vet. Pathol. 41(4):329-335.

Barton J.T., Bickford A.A., Cooper G.L., Charlton B.R. & Cardona C.J.1992. Avian Paramyxovirus Type 1 Infections in Racing Pigeons in California. I. Clinical Signs, Pathology, and Serology. Avian. Dis. 36 (2): 463-468.

Bhaiyat M.I., Ochiai K., Itakura C., Islam M.A. & Kida H. 1994. Brain lesions in young broiler chickens naturally infected with a mesogenic strain of Newcastle disease virus. Avian. Pathol. 23: 693-708.

Brown C, King D.J. & Seal B.S. 1999. Pathogenesis of Newcastle Disease in Chickens Experimentally Infected with Viruses of Different Virulence. Vet. Pathol. 36:125–132.

Carrasco A.O.T., Sekin M.C., Raso T.F., Paulillo A.C., Pinto A.A. 2008. Experimental infection of Newcastle disease virus in pigeons (*Columba livia*): Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. Vet. Microbiol. 129:89–96.

Castro E.R., Zanetti F. & Arbiza J. 2012. Genetic characterization of a pigeon Paramyxovirus Type 1 isolated from *Columba livia* in Uruguay. Avian. Dis. 56(1):243-248, 2012.

Catroxo M.H.B., Martins A.M.C.R.P.F., Petrella S., Curi N.A. & Melo N.A. 2011 Research of viral agent in free-living pigeon feces (*Columba livia*) in the city of São Paulo, SP, Brazil, for Transmission Electron Microscopy. Int. J. Morphol. 29(2):628-635.

Catroxo M.H.B., Martins A.M.C.P.F., Petrella S., Milanelo L., Aschar M., Souza F., Nastari B.D.B. & Souza R.B. 2012. Avian Paramyxoviruses. Detection by Transmission Electron Microscopy Techniques. Int. J. Morphol. 30(2):723-730.

Clavijo A., Robinson Y., Booth T. & Munroe F. 2000. Velogenic Newcastle disease in imported caged birds. Can. Vet. J. 41:404-406.

Dortmans J.C.F.M., Koch G., Rottier P.J.M. & Peeters B.P.H.A . 2011a. A comparative infection study of pigeon and avian paramyxovirus type 1 viruses in pigeons: evaluation of clinical signs, virus shedding and seroconversion. Avian.Pathol. 40(2):125-130.

Dortmans J.C.F.M. Virulence Determinants of Newcastle Disease Virus. Tese de doutorado. University Utrecht. Utrecht. 2011b.136f.

Ecco R., Susta L., Afonso C.L., Miller P. J. & Brown C. 2011. Neurological lesions in chickens experimentally infected with virulent Newcastle disease virus isolates. *Avian. Pathol.* 40(2):145-152.

Hamid H., Campbell R.S.F. & Parede L. 1991. Studies of the pathology of velogenic Newcastle disease: Virus infection in nonimmune and immune birds. *Avian. Pathol.* 20:561-575.

ICTV 2015- International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <[http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode\\_id=20140755&taxa\\_name=Newcastle%20disease%20virus](http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20140755&taxa_name=Newcastle%20disease%20virus)>. Acesso em: 10 de março 2015.

Kim L.M., King D.J., Guzman H., Tesh R.B., Rosa A.P.A.T., Bueno R.J., Dennett J.A. & Afonso C.L. 2008. Biological and phylogenetic characterization of pigeon Paramyxovirus Serotype 1 Circulating in wild north american pigeons and doves. *J. of Clin. Microbiol.* 46 (10): 3303–3310.

Kommers G.D., King D.J., Seal B.S., Carmichael K.P. & Brown C.C. 2002. Pathogenesis of Six Pigeon-Origin Isolates of Newcastle Disease Virus for Domestic Chickens. *Vet. Pathol.* 39:353–362.

Kuiken T., Wobeser G., Leighton F.A., Haines D. M., Chelack B., Bogdan J., Hassard L., Heckert R.A. & Riva J. 1999. Pathology of Newcastle disease in double-crested cormorants from saskatchewan, with comparison of diagnostic Methods. *J. Zoo Wildl. Med.* 35(1):8–23.

Meulemans G., Van den Berg T.P., Decaesstecker M. & Boschmans M. 2002. Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian. Pathol.* 31:515– 519.

Nei M. & Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford: Oxford University Press. New York.

OIE, 2012- World Organisation for Animal Health: Newcastle disease. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, pp. 555–573. Paris.

Seal B.S., King D.J. & Bennett J.D. 1995. Characterization of Newcastle Disease virus isolates by Reverse Transcription PCR coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. of Clin. Microbiol.* 33:2624–2630.

Shengqing Y., Kishida N., Ito H., Kida H., Otsuki K., Kawaoka Y. & Ito T. 2002. Generation of velogenic Newcastle Disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virol.* 301: 206–211.

Swayne D.E., Beck J.R., Smith C.S., Shieh W. & Zaki S.R. 2001. Fatal Encephalitis and Myocarditis in Young Domestic Geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 7(4):751-753.

Swayne D.E. Nervous system. In: FLETCHER, O.J. (Ed) Avian Histopathology. 3th ed. Omni Press, Madison, 2008.p. 260-291.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A. & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, Mol. Biol.Evol. 30: 2725–2729.

Werther K. Columbiformes (Pomba, Rolinha, Avoante, Juriti). 2007. In: CUBAS, Z. S., SILVA, J. C. R. and CATÃO-DIAS, J. L. (Eds) Tratado de animais selvagens. v.1. 1th ed. São Paulo: Roca, p. 268-289.

Zanetti F., Mattiello R., Garbino C., Kaloghlian A., Terrera M. V., Boviez J., Palma E., Carrillo E. and Berinstein A. 2001. Biological and molecular characterization of a pigeon Paramyxovirus Type-1 isolate found in Argentina. Avian. Dis. 45:567-571.

Zhu W., Dong J., Xie Z., Liu Q. & Khan M. I.2010. Phylogenetic and pathogenic analysis of Newcastle disease virus isolated from house sparrow (*Passer domesticus*) living around poultry farm in southern China. Vir. Genes. 40(2):231–235.

### Legendas das Figuras

**Fig.1. Clinical-pathological characterization of Paramyxovirus infection in Columbiformes: A. Pigeon:** note the impaired locomotion making it to stand on its wings. **B. Pigeon, spinal cord:** cross section, areas of subdural hemorrhage.

**Fig.2. Histopathologic and immunohistochemical characterization of Paramyxovirus infection in Columbiformes: A. Brain:** perivascular lymphoplasmacytic cuffing and mild microgliosis. HE, 200x. **B. Spinal cord:** mild nodular microgliosis. HE, 400x **C. Kidney:** lymphoplasmacytic multifocal interstitial infiltrate associated with rare macrophages and necrosis of tubular epithelial cells. HE, 400x. **D. Liver:** focal area of mild periportal inflammatory infiltrate constituted by lymphocytes, plasma cells, macrophages, and heterophils, in addition to mild bile duct proliferation. HE, 400x. **E. Pancreas:** focal area of necrosis of pancreatic acini. HE, 400x. **F. Brain:** positive immunostaining in the cytoplasm of astrocytes. AEC, 400x.

**Fig.3. Molecular Phylogenetic analysis of Paramyxovirus type I F protein by Maximum Likelihood method.** Phylogenetic analysis showed that this strain could be classified into class II and genotype VI clade, which includes the strain described in the present study and the reference strain AY734536.1 / Pigeon-Argentina.

**Table 1.** Primers select to sequence the F protein gene.

Primer	Sequence (5'-3')	Target
NC Fusion-1F	5'CTATCTAATTAGAAAAACACGGGTAGAAG3'	F
NC Fusion-1R	5'TGAGTTAGGGCAGGGGAAGT3'	F
NC Fusion-2F	5'GCAACAGTTTGTCAATGACCAA3'	F
NC Fusion-2R	5'TGTATTGCCGCTCAGACAAGA3'	F
NC Fusion-3F	5'AGGTAGTGACACAAGTCGGCTCTG3'	F
NC Fusion-3R	5'AACGATATAGGTAATGAGAGCAGATGT3'	F
NC Fusion-4F	5'ATCGTGACAGGCAACCTTGATATATC3'	F
NC Fusion-4R	5'CCGTTCTACCCGTGTATTGCT3'	F



**Table 2.** List of animals outbreak period in which they were assessed, results of RT-PCR and immunohistochemistry analysis\*.

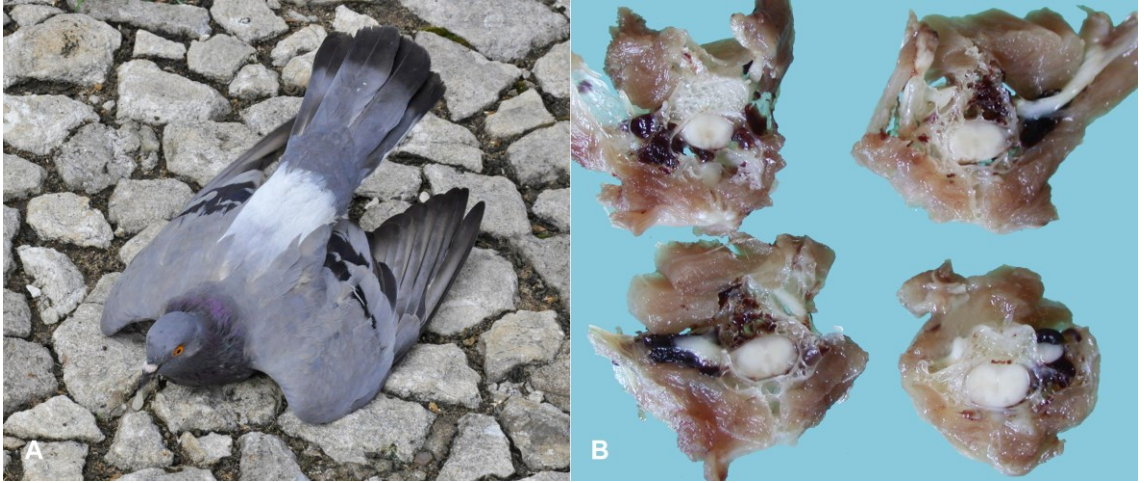
Bird no.	Week of receipt	RT-PCR M protein	Immunohistochemistry
1	1 <sup>a</sup>	ND	+B
2	2 <sup>a</sup>	+	+P +B +K
3	2 <sup>a</sup>	-	-
4	2 <sup>a</sup>	+	-
5	2 <sup>a</sup>	-	+B
6	2 <sup>a</sup>	-	-
7	2 <sup>a</sup>	+	+B
8	3 <sup>a</sup>	-	-
9	4 <sup>a</sup>	-	+B
10	4 <sup>a</sup>	+	+Li
11	4 <sup>a</sup>	-	-
12	4 <sup>a</sup>	-	-
13	4 <sup>a</sup>	+	+Li
14	4 <sup>a</sup>	+	+Li +B
15	5 <sup>a</sup>	-	-
16	5 <sup>a</sup>	-	+Li
17	5 <sup>a</sup>	-	-
18	5 <sup>a</sup>	-	-
19	5 <sup>a</sup>	-	-
20	5 <sup>a</sup>	-	-
21	5 <sup>a</sup>	-	-
22	5 <sup>a</sup>	-	-
23	5 <sup>a</sup>	-	-
24	5 <sup>a</sup>	-	-

\*-, negative; +B, positive brain; +P, positive pâncreas; +Li, liver; +K, kidney; ND, not done.

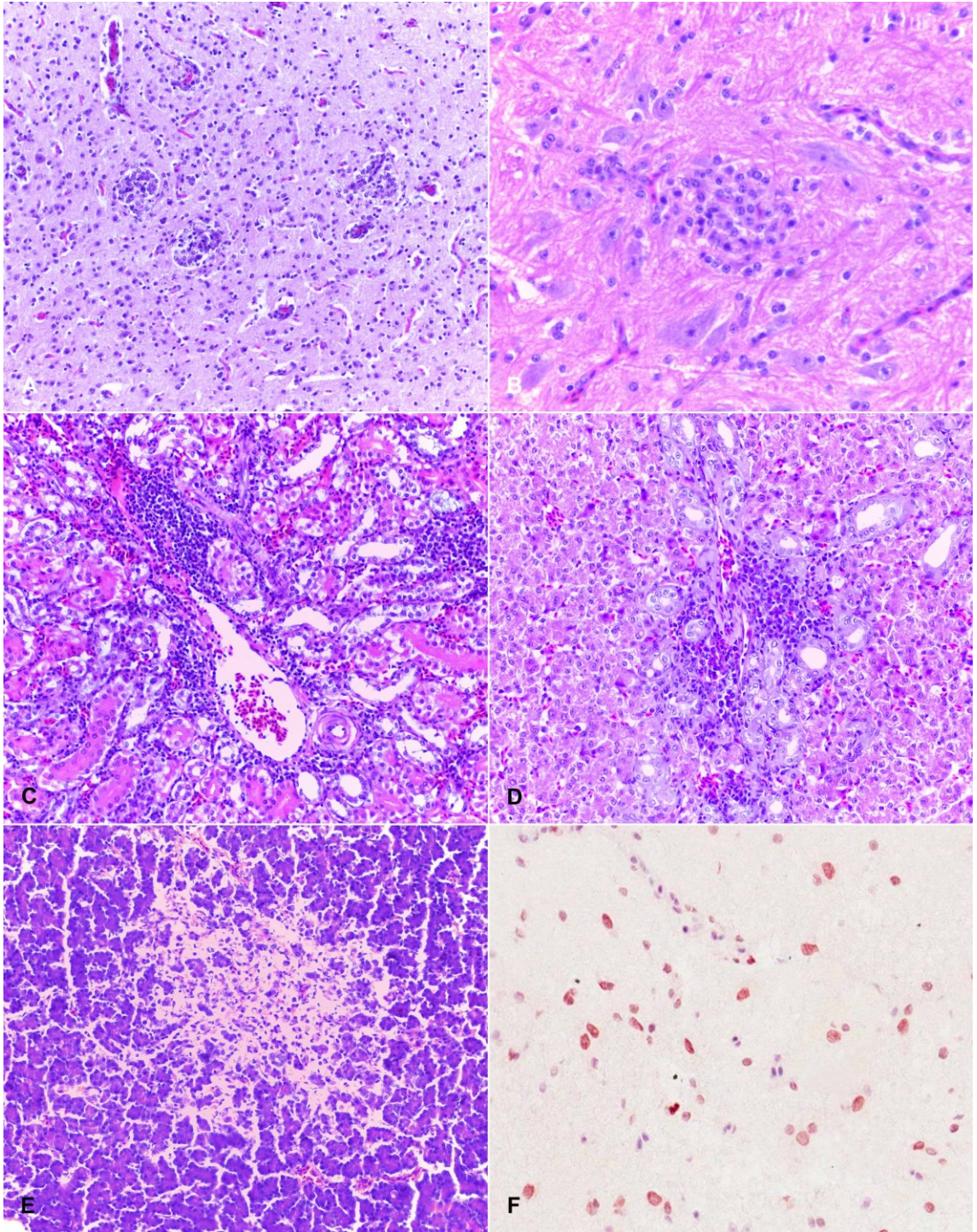
**Table 3.** Comparison between the amino acid sequence at the cleavage site of the F protein.

Strain	Sequence of amino acid	GenBank accession number
PPMV-1 (1168/84)	<sup>112</sup> GRQKRF <sup>117</sup>	S69419.1
Beaudette C	<sup>112</sup> RRQKRF <sup>117</sup>	X04719.1
Texas GB	<sup>112</sup> RRQKRF <sup>117</sup>	GU978777
N1065/14	<sup>112</sup> RRQKRF <sup>117</sup>	N/A*

\*Genbank accession number under analyses.



**Figure 1**



**Figure 2**

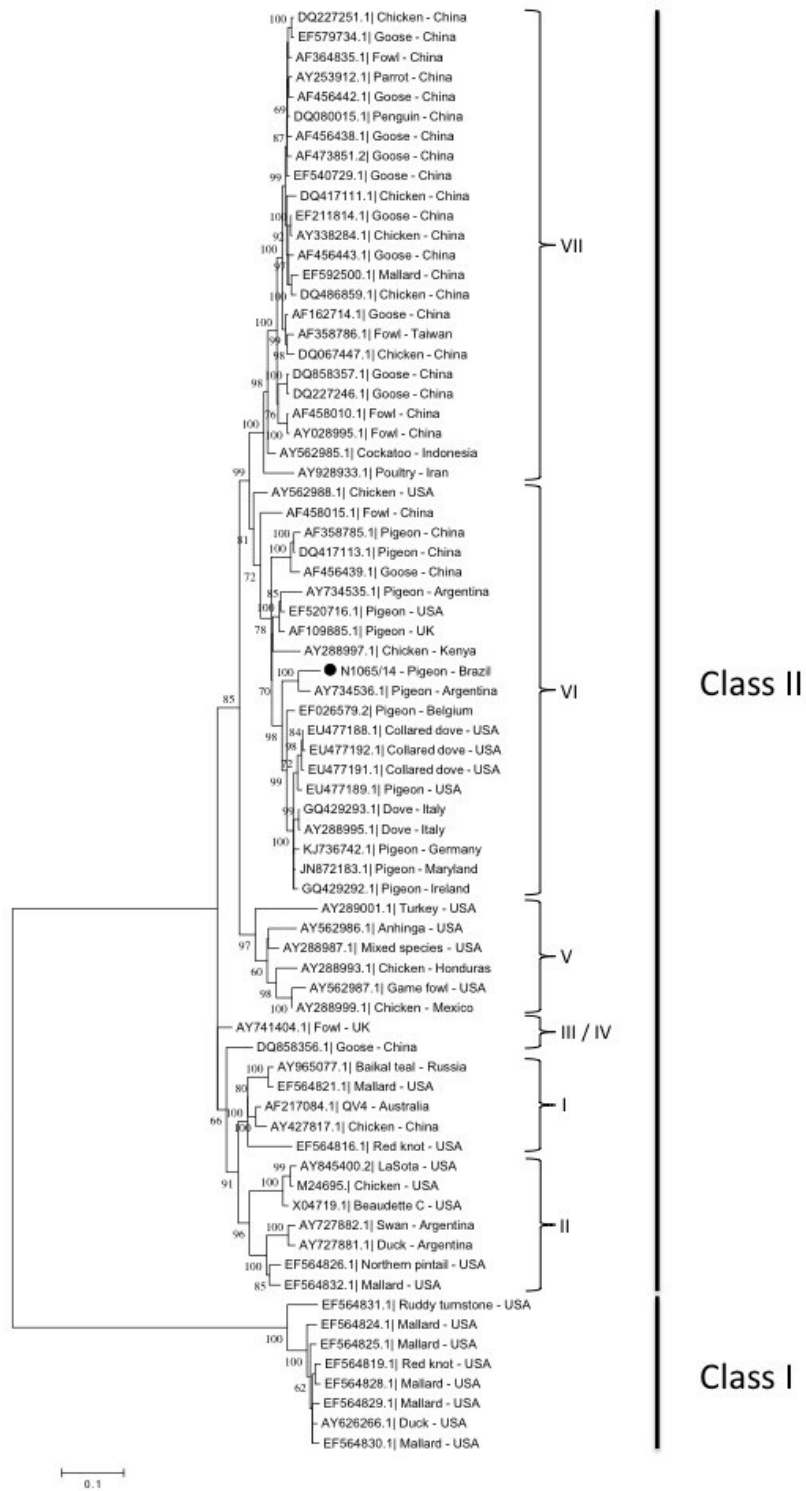


Figure 2

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As lesões no sistema nervoso central das aves analisadas confirmam a afinidade da cepa viral identificada por estes tecidos. As aves examinadas na última semana do surto não foram positivas no exame de RT-PCR e, possivelmente, pelo curso clínico mais longo da infecção não tenha sido possível identificar material viral nos swabs de cloaca e de traqueia e nem mesmo em órgãos. No entanto, em casos de surtos, o exame de RT-PCR e de sequenciamento se mostraram eficientes para a detecção do vírus e virulência da estirpe.

Todas as aves apresentaram alterações no exame histológico, o que não ocorreu nos demais métodos diagnósticos utilizados. Portanto conclui-se que é de extrema importância associar o exame histológico a outras ferramentas diagnósticas.

Conclui-se que a cepa do presente estudo é patogênica para pombos, devido aos sinais clínicos, as lesões observadas, especialmente no sistema nervoso central, associados à identificação do agente através do exame imuno-histoquímico. Com isso sugere-se que a cepa envolvida no presente estudo é uma cepa neurotrópica.

A infecção por Paramixovírus aviário tipo I ocorre em pombos no Estado do Rio Grande do Sul e deve ser incluída no diagnóstico diferencial de doenças nessa espécie. Assim, um diagnóstico rápido e eficiente nessas aves, que representam um reservatório da DN para aves comerciais, pode auxiliar no controle desta enfermidade.