

# LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE MICOPLASMOSE, SALMONELOSE E DOENÇA DE NEWCASTLE EM POMBOS DOMÉSTICOS (*Columba livia*) DE VIDA LIVRE, DA CIDADE DE RIBEIRÃO PRETO, SP.

Morais MTGF<sup>1</sup>, Pandolfi JR<sup>1\*</sup>, Fatoretto LA<sup>1</sup>, Carrasco AO<sup>2</sup>.

**1. Universidade Camilo Castelo Branco - Unicastelo – Descalvado, SP**

Av Hilário da Silva Passos 950, CEP 13690-000, Descalvado, SP.

**2. UNICENTRO - Faculdade Estadual de Guarapuava, PR**

\*josepandolfi@gmail.com

## RESUMO

No Brasil, um dos maiores exportadores de frangos do mundo, os estudos da epidemiologia da salmonelose, Doença de Newcastle e micoplasmose são muito importantes, pois estas enfermidades causam grande impacto na avicultura e representam uma barreira sanitária para a exportação de aves e seus produtos. Alguns possíveis elos da cadeia epidemiológica, dentre os quais se inclui o pombo doméstico (*Columba livia*), têm sido pouco estudados. O presente estudo teve a finalidade de avaliar o status sorológico de uma população de pombos domésticos, com relação às enfermidades citadas e estudar o risco destas aves na transmissão de doenças para os plantéis avícolas. Para tanto, amostras de soro sanguíneo foram colhidas de 133 animais e submetidas a provas sorológicas como a Reação de Inibição da hemaglutinação (HI) para a presença de anticorpos anti-VDN, Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa para a presença de anticorpos anti - *Salmonella* sp e anti-*M. gallisepticum* e *M. synoviae*. Todas as amostras analisadas foram negativas para *Mycoplasma* e o Vírus da doença de Newcastle. Apenas um animal foi positivo para *Salmonella* no teste realizado com soro bruto, porém o resultado se tornou negativo na diluição do soro em 1:5. Com base nos ensaios aplicados, a população de pombos estudada parece não oferecer risco na transmissão destas enfermidades. Todavia, outros estudos, empregando técnicas mais sensíveis e específicas poderiam ser realizados, principalmente na avaliação do risco de transmissão de salmonelas.

## INTRODUÇÃO

Com relação às enfermidades contempladas pelo PNSA, as principais são as salmoneloses (*Salmonella Pullorum*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*); as micoplasmoses (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*) e a Doença de Newcastle (DN), sendo que a legislação estabelece que empresas avícolas, devem ser livres dessas enfermidades.

Embora estas enfermidades sejam exaustivamente pesquisadas em aves comerciais de corte e postura, alguns possíveis elos da cadeia epidemiológica, dentre os quais se inclui o pombo doméstico (*Columba livia*), têm sido pouco estudados. No caso particular do Brasil, apesar do elevado grau de desenvolvimento da avicultura, nenhum estudo tem sido realizado envolvendo a participação de pombos na cadeia epidemiológica da DN e também de outras enfermidades aviárias.

As salmoneloses são distinguidas em pulorose (*S. Pullorum*), tifo aviário (*S. Gallinarum*) e paratifo aviário (*S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, principalmente), as micoplasmoses são causadas por *M. synoviae* e *M. gallisepticum* e a Doença de Newcastle é causada pelo Vírus da Doença de Newcastle (VDN), um paramyxovírus.

Os columbiformes, de vasta distribuição pelo planeta, provavelmente tenham se originado na região tropical do velho mundo e, daí, migrado para as Américas. São aves, na maioria granívoras e frugívoras, descendo ao solo somente para se alimentarem. São excelentes voadores, os casais formados são inseparáveis e, após a reprodução, têm a peculiaridade de se associarem em bandos (SICK, 1992).

A partir do momento em que aves de vida livre podem ser responsabilizadas por ser a fonte primária de introdução da doença, estudos comparativos de patógenos provenientes destas aves e

amostras provenientes de vacinas e/ou aviculturas comerciais tornaram-se de crucial importância (WOBESER et al., 1993; PANSHIN et al., 2002).

Tendo em vista a possibilidade de identificação de plantéis e lotes de aves infectadas com salmonela, provas sorológicas têm sido desenvolvidas. O teste de soroaglutinação que utiliza antígeno corado e sangue total tem sido empregado com sucesso, na identificação de lotes de aves infectadas por *S. Pullorum* (SP) ou *S. Gallinarum* (SG). Face ao compartilhamento do antígeno somático do grupo D entre *S. Enteritidis* (SE), *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, é possível o emprego do teste de aglutinação para o diagnóstico das Salmoneloses mencionadas (DAVIES, 1994).

O *Mycoplasma gallisepticum* causa uma doença infecciosa denominada de doença respiratória crônica (DCR), com manifestação de tosse e descargas nasais nas galinhas e sinusite em perus. A evolução da doença é geralmente lenta e de decurso longo. Infecções secundárias por *E. coli*, principalmente, determinam um quadro de aerossaculite em galinhas e aerossaculite-sinusite em perus (YODER JR, 1997).

Uma investigação realizada entre 1997 e 1999, examinando 1.058 aves de 17 criações e em 10 locais de alimentação de aves e passarinhos, observou, através de soroaglutinação em placa, de PCR, cultura, HI e histopatologia, que os resultados foram positivos em 19,1% dos 671 tentilhões capturados e 11,6% das 387 aves capturadas junto a alimentadores, 40% dos *Baeolophus bicolor* foram positivos para *M. gallisepticum* por PCR e cultura, revelando a existência de reservatórios de vida livre (LUTRELL et al., 2001).

Com relação ao *M. synoviae*, a enfermidade causada por esse agente apresenta-se sob a forma subclínica que acomete preferencialmente sacos aéreos e usualmente associados à doença de Newcastle, bronquite infecciosa, ou ambas. Raramente apresenta-se sob forma sistêmica, que resulta em sinovite, doença de galinhas e perus que pode evoluir de um quadro agudo para crônico, comprometendo inicialmente as membranas sinoviais das articulações e as bainhas de tendões, causando sinovite exsudativa, tendinite ou bursite.

Para o diagnóstico sorológico existem antígenos comerciais disponíveis para o teste de soroaglutinação em placa, podendo-se obter reações cruzadas com *Mycoplasma gallisepticum*, mas os títulos são mais baixos, e a reação, tardia (OLSON et al., 1965) a confirmação pode ser conseguida pelo teste de inibição da hemaglutinação (VARDAMAN; YODER JR, 1969).

O vírus da doença de Newcastle (VDN) pertence à Ordem Mononegavirales, Família Paramyxoviridae, Subfamília Paramyxovirinae e Gênero Avulavírus. Os vírus pertencentes à família Paramyxoviridae são RNA vírus de fita simples, com envoltório, e com genoma não segmentado e de polaridade negativa (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2002).

Grande parte dos relatos da DN em pombos tem ocorrido de forma simultânea aos surtos da doença em aves comerciais, fato que levanta a suspeita de que a estirpe do VDN presente nos pombos teriam originado de aves comerciais. Porém, na ausência da doença em aves comerciais, estirpes lentogênicas do PPMV 1 têm sido isoladas de pombos apresentando sintomatologia respiratória (ALEXANDER, 1985; UJVARI, 2003).

O sorodiagnóstico, usualmente realizado por meio das reações de inibição da hemaglutinação (HI), vírus neutralização (VN) e ensaio imunoenzimático (ELISA), são os procedimentos de diagnóstico mais amplamente utilizados para a detecção e mensuração de anticorpos anti-VDN. Dentre tais testes, o de HI têm por princípio a detecção da presença de anticorpos anti glicoproteína e neuraminidase virais; a HN, que tem a função de hemaglutinação e de neuraminidase, respectivamente, é considerado internacionalmente o teste de referência para o diagnóstico indireto da DN (KOUWENHOVEN, 1993; RICHTZENHAIN et al., 1993; ALEXANDER, 1997; KHO et al., 2000).

## **OBJETIVO**

Pesquisar: 1. por meio da Reação de Inibição da hemaglutinação (HI), a presença de anticorpos anti-VDN em soros de pombos capturados em condições naturais de campo; 2. por meio da Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa, a presença de anticorpos anti-Salmonella sp em soros de pombos capturados em condições naturais de campo; 3. por meio da Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa, a presença de anticorpos anti-M. gallisepticum e M. synoviae em soros de pombos capturados em condições naturais de campo e avaliar a participação do pombo doméstico na cadeia epidemiológica destas enfermidades, aquilatando informações acerca do seu papel nas respectivas cadeias epidemiológicas;

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Avaliação do estado sorológico da população de pombos**

Foram colhidas amostras de sangue de pombos capturados, de forma aleatória, 133 pombos da região de Ribeirão Preto. Tais capturas foram realizadas com autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Escritório Regional de Ribeirão Preto). Todo o processo de captura e experimentação animal está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O soro foi então separado do sangue total, inativado em banho maria a 56°C durante 30 minutos e armazenados à temperatura de - 20°C em frascos estéreis, até o momento de uso.

#### **Deteção de anticorpos contra *Salmonella* sp (teste de pulrose)**

Prova de soroaglutinação em placa, segundo Brasil (1994): foi utilizada uma gota de soro sanguíneo, dispensada em uma placa. A seguir, uma gota de antígeno corado Nobilis® foi adicionada ao soro. Antígeno e soro foram misturados, com o auxílio de bastão de vidro com movimentos circulares, até a formação de um círculo de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, por dois minutos, a temperatura ambiente superior a 20°C. Além desta análise com o soro bruto, foram realizadas 2 diluições do soro (1:5 e 1:10) em solução salina tamponada com fosfatos (PBS – 0,01 M PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 0,14 M NaCl, pH 7,2).

#### **Deteção de anticorpos contra *M. gallisepticum* e *M. synoviae***

Prova de soroaglutinação em placa (SAR) segundo Brasil (1994): foi utilizada uma gota de soro sanguíneo, dispensada em uma placa. A seguir, uma gota de antígeno específico corado Nobilis® foi adicionada ao soro. O antígeno específico e soro foram homogenizados, com o auxílio de bastão de vidro, com movimentos circulares, até a formação de um círculo de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, por dois minutos, a temperatura ambiente superior a 20° C. Foram realizadas 2 diluições do soro (1:5 e 1:10) em solução salina tamponada com fosfatos (PBS 7,2), conforme descrito anteriormente.

#### **Reação de Inibição da Hemaglutinação (HI)**

A reação de Inibição da Hemaglutinação (HI) foi realizada em microplacas de 96 cavidades, com fundo em "U", pelo procedimento Beta ( $\beta$ ) segundo técnica previamente descrita (BEARD & WILKES, 1973). Foi utilizada como fonte de antígeno 4 UHA da estirpe vacinal lentogênica LaSota do VDN. Os soros foram submetidos a diluições seriadas, em PBS pH 7,2, de razão 2, de 1:2 até 1:2048, num volume de 25µL por cavidade da microplaca. Para a realização da reação, 25µL de antígeno foram colocados em contato com as diferentes diluições dos soros e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir foram adicionadas 25µL da suspensão de eritrócitos oriundos de galinhas, previamente padronizada com a solução tampão PBS pH 7,2 a 1,0% (0,5 mL de hemácias + 50 mL de PBS pH 7,2), acima descrita, padronizada em espectrofotômetro ( $\lambda$ = 545nm), com uma densidade óptica desejada (D.O.) por volta de 0,33-0,35. A leitura da reação foi realizada após um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, tempo em que ocorria a deposição nítida das hemácias nas cavidades dos controles da reação. O título final do soro foi expresso pela recíproca da maior diluição deste, capaz de inibir completamente a atividade

hemaglutinante viral (HA). Obedecendo a padrões e normas da O.I.E., no caso da utilização de antígenos na concentração de 4 UHA, amostras com título igual ou superior a 16 foram consideradas soro reagentes frente ao VDN.

### **Interpretação dos resultados das provas sorológicas utilizadas**

Para fins de classificação inequívoca dos soros das aves pela prova de soroaglutinação rápida, foram considerados positivos, segundo Brasil (1994), para *S. Pullorum*, *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, aqueles que apresentaram título igual a 10, isto é, aglutinação na diluição 1:10 na soroaglutinação rápida.

## **RESULTADOS E COMENTÁRIOS**

### **Avaliação do estado imunológico da população em estudo**

Para tanto, amostras de soro sanguíneo foram colhidas de 133 animais e submetidas a provas sorológicas como a Reação de Inibição da hemaglutinação (HI) para a presença de anticorpos anti-VDN, Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa para a presença de anticorpos anti-*Salmonella* sp e anti-*M. gallisepticum* e *M. sinoviae*.

Todas as amostras analisadas foram negativas para *Mycoplasma* e o Vírus da doença de Newcastle. Apenas um animal foi positivo para *Salmonella* no teste realizado com soro bruto, porém o resultado se tornou negativo na diluição do soro em 1:5.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com base nos ensaios aplicados, a população de pombos estudada parece não oferecer risco na transmissão destas enfermidades. Todavia, outros estudos, empregando técnicas mais sensíveis e específicas poderiam ser realizados, principalmente na avaliação do risco de transmissão de salmonelas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**Alexander, D.J. et al.** Antigenic and Biological Characterization of Avian Paramyxovirus Type 1 Isolates From Pigeons – an International Collaborative Study. **Avian Pathology**, v.14, p.365-376, 1985.

**Alexander, D.J.** Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviridae Infections *In* Calnek, B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; McDougald, L.R. (ed), **Diseases of Poultry**, 10<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p.541-569, 1997.

**BERCHIERI JÚNIOR, A.** Doenças de transmissão vertical. In: VII SIMPÓSIO TÉCNICO DE PRODUÇÃO DE OVOS, 1997, Campinas. **Anais...** São Paulo: APA, 1997. p. 133-142.

**BERCHIERI JÚNIOR, A.** Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 185-196.

**Clavijo, A.; Robinson, Y.; Booth, T.; Munroe, F.** Velogenic Newcastle Disease in Imported Caged Birds. **Can. Vet. Journal**, v.41, p.404-406, 2000.

**Cunha, R.G.; Silva, R.A.** Isolamento e Identificação do Vírus da Doença de Newcastle no Brasil. **Boletim Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária**, v.23, p.17-33, 1955.

**Demétrio, C.** Levantamento Sorológico e Pesquisa do Vírus da Doença de Newcastle em Irerês Migratórios, *Dendrocygna viduata* (Anseriformes: Anatidae), na Cidade de São Paulo, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, ICB, USP – São Paulo, 62p., 2002.

**Erickson, G.A.; Brugh, M.; Beard, C.W.** Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease in Pigeons: Clinical Disease and Immunization. **Avian Diseases**, v.24, n.1, p.257-267, 1980.

**Gelb, J; Fries, P.A.; Peterson, F.S.** Pathogenicity and Cross-Protection of Pigeon Paramyxovirus-1 and Newcastle Disease Virus in Young Chickens. **Avian Diseases**, v.31, p.601-606, 1987.

**HAGEN, CA; CRUPPER, S.S.; APPLGATE, R.D.; ROBEL, R.J.** Prevalence of mycoplasma antibodies in lesser prairie-chicken sera. **Avian Diseases**, v.46, n.3, p.708-712, 2002.

**IMADA, Y; NONOMURA, S.; HAYASHI, S.; TSURUBUCHI, S.** Immunoperoxidase technique for identification of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. **National Institute Animal Health**, v. 19, p.40-46, 1979.

**JUNGHERR, E.L; LUGINBUHL, R.E.; TOURTELLOTE, M.; BURR, W.E.** Significance of serological testing for chronic respiratory disease. In: 92nd ANNUAL MEET AMERICAN VETETERINARY MEDICINE ASSOCIATION. **Proceedings...** 1955. p.315-321.

**Kho, C. L. et al.** Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. **J. Virol. Methods**, v. 86, p. 71-83, 2000.

**Kowuenhoven, B.** Newcastle Disease. **In Virus Infection in Birds**. McFerran, J.B.; McNulty, M.S.(eds), Amsterdam, Elsevier Science, 3<sup>rd</sup> ed., p.341-361, 1993.

**LEVISOHN, S.** Diagnostico serológico y molecular de mycoplasma aviaries. In: XVI CONGRESO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA, 1999, Lima - Peru. **Anales...** 1999. p.53-54.

**Meulemans, G.; Van Der Berg, T.P.; Dceesstecker, M.; Boshmans, M.** Evolution of Pigeon Newcastle Disease Virus Strains, **Avian Pathology**, v.31, p.515-519, 2002.

**PEVZNER, I.Y.; STONE, H.A.; NORDSKOG, A.W.** Immune response and disease resistance in chickens. I. Selection for high and low titer to *Salmonella pullorum* antigen. **Poultry Science**, v.60, p.920-926, 1981.

**RICHTZENHAIN, L.J.** Doença de Newcastle: Estudo comparativo das reações de ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay") e da inibição da hemaglutinação na quantificação da resposta imune humoral e na estimativa da imunidade de poedeiras frente ao desafio experimental, **Tese de Doutorado**, ICB – USP, S.P., 100p. 1988

**Richtzenhain, L.J.; Paulillo, A.C.; Pinto, A.A.; Kronka, S.N.** Relation Between the Hemagglutination Inhibition Test and the Indirect Elisa in the Serologic Monitoring of Laying Hens Submitted to Different Systems of Vaccination Against Newcastle Disease. **Rev. Microbiol., São Paulo**, v.24, n.3, p.187-191, 1993.

**ROSS, R.F.; YOUNG, T.F.** The nature and detection of mycoplasmal immunogens. **Veterinary Microbiology**, v.37, n.3-4, p.369-380, 1993.

**Seal, B.S.; King, D.J.; Locke, D.P.; Senne, D.A.; Jackwood, M.W.** Phylogenetic Relationship Among High Virulent NDV Isolates Obtained From Exotic Birds and Poultry from 1989 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.4, p.1141-1145, 1998.

**Seal, B.S.; King, D.J.; Sellers, H.S.** The Avian Response to Newcastle Disease Virus. **Developmental & Comparative Immunology**, v.24, n.257-268, 2000.

**SESTI, L.A.C.** Biosseguridade em um programa de melhoramento genético de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2001, p. 98-102, 2001

**Stone, H.D.** Efficacy of Oil-Emulsion Vaccines Prepared with Pigeon Paramyxovirus-1, Ulster, and La Sota Newcastle Disease Viruses. **Avian Diseases**, v.33, p.157-162, 1989.

**TANGREDI, B.P.** Avian Paramyxovirus Type 1 infections in pigeons: recent changes in clinical observation. **Avian Diseases**, Kenett Square, v.32, p. 839-841, 1988.

**Utterbach, W,W.; Schwatz, J.H.** Epizootiology of Velogenic Viscerotropic Newcastle Disease in Southern California. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.163, p.1080-1088, 1973.

**VICKERS, M.L.; HANSON, R.P.** Experimental infection and serologic survey for selected paramyxoviruses in Red-Winged Blackbirds (*Agelaius phoeniceus*) **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, v.16, n.1, p.125-130, 1980

**ZANETTI, F.; MATTIELLO, R.; GARBINO, C.; KALOGHLIAN, A.; TERRERA, M.V.; BOVIEZ, J.; PALMA, E.; CARRILLO, E.; BERINSTEIN, A.** Biological and Molecular Characterization of a Pigeon

Paramyxovirus Type-1 Isolate Found in Argentina. **Avian Diseases**, Kenett Square, v.45, p.567-571, 2001.