

Levantamento Sorológico de *Mycoplasma* spp, *Salmonella* sp e Doença de Newcastle em Pombos Domésticos (*Columba livia*) de Vida Livre

Serosurvey for *Mycoplasma* spp, *Salmonella* sp and Newcastle Disease in Free Living Domestic Pigeons (*Columba livia*)

Adriano de Oliveira Torres Carrasco^{a*}; José Carlos Issakowicz^a; Mary Tere Goulart Fernandez de Moraes^b; Luana Alexandra Fatoetto^b; José Rodrigo Cláudio Pandolfi^c; Luiz César da Silva^d; Aramis Augusto Pinto^e

^a Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR, Brasil

^b Universidade Camilo Castelo Branco, SP, Brasil

^c Embrapa Suínos e Aves, SC, Brasil

^d Universidade do Norte do Paraná, PR, Brasil

^e Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista, SP, Brasil

* E-mail: adriano.carrasco@gmail.com

Recebido: 21 de Junho de 2010. Aceito: 25 de Novembro de 2010.

Resumo

Pombos domésticos descendem dos pombos da região tropical da Europa e, por possuírem boa habilidade de vôo, migraram para as Américas acompanhando as caravelas no momento da colonização. Tais aves podem servir de reservatórios portadoras e transmissoras de diversos agentes patogênicos de importância para criações comerciais de aves ou ainda de risco para a saúde pública. Dentre as principais enfermidades que comprometem a avicultura comercial estão as Salmoneloses, as Micoplasmoses e a Doença de Newcastle (DN), todas estas contempladas no PNSA (Programa Nacional de Sanidade Avícola). Com base nestes aspectos, o presente trabalho teve como objetivo realizar um inquérito sorológico avaliando a presença de anticorpos anti VDN, anti *Salmonella* sp, e anti *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em soros de pombos capturados em condições naturais de campo. Dos 133 animais capturados, apenas um se mostrou positivo sorologicamente para *Salmonella*. Todas as amostras foram negativas para os demais patógenos. Desta forma, o presente estudo demonstra um retrato momentâneo destes agentes na população em estudo, fornecendo indícios da ausência de circulação dos agentes no momento da colheita das amostras.

Palavras Chave: *Columbidae*. *Salmonella*. *Mycoplasma*. Sorologia.

Abstract

Domestic pigeons descend from the tropical region of Europe, and as they have good flying skills, they migrated to America, following the caravels, at colonization time. These birds can serve as reservoirs, carriers and transmitters of different pathogens of importance to poultry or risk to public health. Among the main diseases that compromise the commercial poultry industry are the Salmonella, the Mycoplasmosis and Newcastle Disease (ND), all covered in these PNSA (National Program for Avian Health). Based on these aspects, this work aims to perform a serological survey, assessing the presence of antibodies against NDV, anti *Salmonella* and anti *M. gallisepticum* and *M. synoviae* in sera from feral pigeons. Only one pigeon, out of the 133 animals captured, was serologically positive for *Salmonella*. All samples were negative for other pathogens. Thus, the present study shows a momentary portray of these agents inside the population used in this research, giving traces of the absent of the circulation of these agents in the moment of sample collection.

Key Words: *Columbidae*. *Salmonella*. *Mycoplasma*. Serology.

1 Introdução

A avicultura comercial brasileira representa importante setor na economia nacional, ocupando local de destaque no Produto Interno Bruto (PIB) do País, tendo em vista que o Brasil é o maior exportador mundial de aves e subprodutos. Desta forma, a avicultura brasileira recebe altos investimentos em tecnologia, principalmente voltada a medidas sanitárias dos plantéis. Se elas não forem tomadas corretamente, a ocorrência de algumas enfermidades pode acarretar grandes prejuízos econômicos, devido à interrupção do trânsito de aves e subprodutos, tanto para o mercado nacional quanto para o comércio internacional.

Dentre as principais enfermidades que comprometem a avicultura comercial, podemos citar as Salmoneloses (*Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella*

typhimurium, *Salmonella enteritidis*), as Micoplasmoses (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis*) e a Doença de Newcastle (DN), cujo controle destas enfermidades está contemplado no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)¹. Tais agentes infecciosos podem se perpetuar pela natureza, infectando grande variedade de aves, domésticas e de vida livre. Ainda existe a possibilidade da ocorrência de animais assintomáticos, possibilitando a disseminação na população de aves por mecanismo de transmissão horizontal e vertical². Ademais, a respectiva profilaxia é diretamente dependente de medidas de biossegurança³.

Embora estas enfermidades sejam exaustivamente pesquisadas em aves comerciais, 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, são raros os estudos realizados envolvendo a participação de pombos na cadeia epidemiológica das enfermidades aviárias a despeito que, em muitos locais de produção avícola ocorre a presença de pombos ocupando o mesmo habitat de aves comerciais.

Pombos domésticos descendem dos pombos da região tropical do Velho Mundo que, por possuírem boa habilidade de vôo, migraram para as Américas acompanhando as caravelas no momento da colonização. Estas aves se adaptaram perfeitamente ao ambiente urbano e ao convívio com os seres humanos, encontrando alimento nas ruas e habitação nas construções urbanas⁴. Com alimentação e local de refúgio disponível, a reprodução é intensa, tornando essa ave problema de saúde pública. Tais aves podem servir de reservatórios, portadoras e transmissoras de diversos agentes patogênicos de importância para avicultura ou ainda risco para saúde pública⁵.

Dentre os 2500 sorotipos descritos de *Salmonella*, a *S. pullorum* (SP), *S. gallinarum* (SG), agentes causadores da pulrose e do tifo aviário, respectivamente, a *S. typhimurium* (ST) e *S. enteritidis* (SE), agentes causadores do paratifo aviário são os principais agentes de importância da avicultura. Provas sorológicas têm sido desenvolvidas objetivando a possibilidade de identificação de planteis e lotes de aves infectadas com *Salmonella*. O teste de soroaglutinação que utiliza antígeno corado e soro tem sido empregado com sucesso, devido à sua facilidade de execução. Desta forma, torna-se possível o emprego do teste de aglutinação para o diagnóstico das Salmoneloses mencionadas⁶.

As micoplasmoses são enfermidades causadas por *M. gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) e *M. meleagridis* (MM). O MG causa doença respiratória crônica (DCR) em galinhas, com manifestação de dificuldade respiratória e descargas nasais. A evolução da doença é geralmente lenta e de curso longo. Podem ocorrer infecções secundárias, causadas principalmente por *E. coli*⁷. O *M. synoviae* causa enfermidade caracterizada por inflamação das membranas sinoviais, tendinite exudativa e bursite esternal, também pode causar infecção subclínica no sistema reprodutor e no sistema respiratório superior. Geralmente a morbidade e a mortalidade apresentam-se baixas⁸. O MM é capaz de promover alta taxa de aerossaculite em filhotes de perus, contudo é raro seu envolvimento em quadros da doença em aves adultas⁶.

A Doença de Newcastle (DN) é causada pelo Vírus da Doença de Newcastle (VDN), que são RNA vírus de fita simples, com envoltório⁹. 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 teria se originado de aves comerciais. Porém, na ausência da doença em aves comerciais, estirpes lentogênicas do VDN têm sido isoladas

de pombos apresentando sinais respiratórios^{10,11}.

Para o diagnóstico sorológico das Salmoneloses e Micoplasmoses, existem antígenos comerciais disponíveis para o teste de soroaglutinação em placa, os quais auxiliaram na prevenção de surtos da enfermidade, bem como na adoção de medidas de controle. No diagnóstico das Salmoneloses, o teste de soroaglutinação, que utiliza antígeno corado, adicionado ao sangue total tem sido empregado com sucesso, na identificação de lotes de aves infectadas por SP ou SG⁶.

Em alguns casos podem-se obter reações cruzadas MS com MG. Contudo, os títulos são mais baixos e a reação tardia¹². Desta forma, a confirmação pode ser conseguida pelo teste de inibição da hemaglutinação¹³.

O sorodiagnóstico da DN é usualmente realizado por meio da reação de inibição da hemaglutinação (HI), tal técnica é considerada internacionalmente como referência para o diagnóstico indireto da DN¹⁴⁻¹⁷. Todavia, a presença de anticorpos anti VDN em soros de pombos pode ser identificada pelos testes de vírus neutralização (VN) e ensaio imunoenzimático (ELISA), contudo sem diferirem do ponto de vista de sensibilidade e especificidade¹⁸.

Com base nestes aspectos, o presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento sorológico de *Mycoplasma* spp, *Salmonella* sp e do Vírus da Doença de Newcastle em Pombos Domésticos de vida livre. Desta forma, avaliar a participação do pombo doméstico na cadeia epidemiológica destas enfermidades objetivando a adoção de medidas eficazes de controle e profilaxia.

2 Material e Métodos

2.1 Avaliação do estado sorológico da população de pombos

Foram capturados num período de 4 meses (junho a setembro) 133 pombos de forma aleatória em um parque da região central de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Todas as aves capturadas estavam clinicamente saudáveis no momento da captura/colheita de materiais. As aves foram capturadas com o uso de armadilhas e a cada coleta era recolhido da armadilha um percentual de 5-6% de toda população residente no local no momento da captura, constituindo dessa forma o N amostral. Tais capturas foram realizadas com anuência do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – Escritório Regional de Ribeirão Preto), embora estas aves sejam consideradas da fauna doméstica do país. Desta forma, torna-se necessário apenas o parecer favorável para a realização do experimento, obtido junto à Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV/UNESP. Todo o processo de captura e experimentação animal foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

A colheita de sangue foi realizada nas aves por punção da veia braquial, a qual foi realizada com agulha (0,45 x 13 – 26G) e seringa de 3 mL. O soro foi então separado do sangue

total inativado em banho maria a 56 °C durante 30 minutos e armazenado à temperatura de -20 °C em frascos estéreis, até o momento de uso para a realização da Reação de Inibição da Hemaglutinação.

As amostras utilizadas nas provas de Soroaglutinação Rápida (SAR), tanto para detecção de anticorpos anti *Salmonella*, quanto para a detecção de anticorpos anti *Mycoplasma*, foram utilizadas frescas, sem a inativação e sem a realização de congelamento.

2.2 Detecção de anticorpos por Soroaglutinação Rápida (SAR)

A prova de soroaglutinação rápida (SAR) em placa de vidro foi realizada segundo a Instrução Normativa 78 do Programa Nacional de Sanidade Avícola¹⁹. Para tanto, foi utilizada uma 25 µL de soro sanguíneo, dispensada em placa. A seguir, uma 25 µL de antígeno corado específico para cada agente foi adicionado ao soro.

O antígeno e o 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 2 minutos, a temperatura ambiente foi 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 pH 7,2).

Para a detecção de anticorpos contra *Salmonella* sp foi utilizado o antígeno Pulo Teste® (Laboratório Biovet, Brasil) e para detecção de anticorpos anti *M. gallisepticum* e *M. synoviae* foram utilizados os antígenos específico corados Myco Galli Teste® e Synoviteste® (Laboratório Biovet, Brasil).

2.4 Interpretação dos resultados das provas de Soroaglutinação Rápida (SAR)

Para fins de classificação inequívoca dos soros das aves pela prova de soroaglutinação rápida, foram considerados positivos, segundo a Instrução Normativa 78, para *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, aqueles que apresentaram título igual a 10, isto é, aglutinação na diluição 1:10 na soroaglutinação rápida. Para classificação de *Salmonella* sp, as amostras positivas na SAR realizada com soro bruto são consideradas positivas¹⁹.

2.5 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 (β) segundo técnica previamente descrita²⁰. Foi utilizada como fonte de antígeno 4 UHA (Unidades Hemaglutinantes) 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 (545nm), com densidade óptica desejada (D.O.) por volta de 0,33-0,35. A leitura da reação foi realizada após período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente (25 °C), 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.

3 Resultados

3.1 Avaliação do estado imunológico da população em estudo

O resultado das amostras de soro sanguíneo colhidas das 133 aves e submetidas às seguintes provas sorológicas: Reação de Inibição da hemaglutinação (HI) para detectar a presença de anticorpos anti VDN, Soroaglutinação Rápida (SAR) em placa para a presença de anticorpos anti *Salmonella* e anti *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, estão dispostos na tabela 01.

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.

Tabela 1: Levantamento sorológico realizado em pombos domésticos (*Columba livia*) de vida livre, com seus respectivos pontos de corte, patógenos e técnicas utilizadas

Patógeno Aviário	Teste	Ponto de Corte	Resultado
<i>Salmonella</i> sp	Soroaglutinação em Placa (SAR)	Aglutinação em soro não diluído	1/133
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Soroaglutinação em Placa (SAR)	Aglutinação na diluição 1:10	0/133
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Soroaglutinação em Placa (SAR)	Aglutinação na diluição 1:10	0/133
Vírus da doença de Newcastle	Inibição da Hemaglutinação (HI)	Título ≥ 16	0/133

4 Discussão

Para avaliação do estado imunológico da população em estudo, foram colhidas amostras de soro sanguíneo de 133 aves 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*. Os animais apresentavam clinicamente boa

saúde, com ausência de qualquer sinal sugestivo das doenças aqui estudadas. Ademais, é importante ressaltar que, um monitoramento sorológico representa um estado momentâneo daquela população, confirmando ou não a ocorrência da circulação de agentes patogênicos em nestas aves²¹.

A distribuição geográfica do *Mycoplasma* spp é cosmopolita e representa um dos mais importantes desafios para a avicultura moderna. Apresenta alta endemicidade em áreas de criação de galinhas e perus, onde as aves doentes e portadoras são as principais fontes de infecção. Todas as amostras analisadas foram sorologicamente negativas para *Mycoplasma* spp, contudo, estudos ecológicos têm revelado que este agente pode ser capaz de infectar aves de vida livre, existindo relação direta entre o tamanho da população dessas aves e valores de prevalência em aves domésticas²².

De 1995 até 2005 não foram notificados focos da Doença de Newcastle no Brasil provavelmente devido ao controle sistemático e intensivo por meio de vacinas eficientes, além da implantação pelo governo federal do PNSA – Programa Nacional de Sanidade Avícola³². Segundo autores^{23,24}, a DN ainda continua endêmica no Brasil, bem como em toda a América do Sul, servindo, por isso, como fonte constante de disseminação do vírus, principalmente por meio do tráfico de aves silvestres. Todas as amostras desta população de pombos mostraram-se negativas para presença de anticorpos anti VDN, talvez porque a manutenção do vírus em uma população aviária exija a necessidade de reservatórios, contudo, a participação e a identificação destes reservatórios são pouco compreendida¹⁶. Em levantamento sorológico realizado em uma população de pombos de um local próximo ao local de coleta utilizado no presente estudo, foi observada positividade de 5,5%³².

A ausência de amostras soro-reagente positiva nas aves capturadas para o estudo, inferem o estado sorológico momentâneo das populações avaliadas²⁵. Ademais, estudos relatam que, mesmo com o uso de técnicas moleculares podem ocorrer falhas, tendo em vista que a eliminação do VDN é intermitente²⁶. Diante disso, os possíveis fatores envolvidos na manutenção do agente em uma população são: presença de indivíduos portadores; introdução de aves susceptíveis; multiplicidade de espécies aviárias (aves comerciais x aves silvestres); heterogenicidade de estirpes do VDN²⁶.

Em oposição, um sorodiagnóstico positivo não deixa de ser sinal indicativo de que a ave teve contato prévio com o agente, seja ele de natureza patogênica ou vacinal, porém não necessariamente indicativo da doença²⁷, particularmente em se tratando de pombos, espécie sabidamente resistente a determinadas estirpes de VDN^{16,25,27}. Por seu turno, a presença de anticorpos em aves de vida livre também pode ser atribuída à exposição a estirpes vacinais lentogênicas, recuperação de infecção ocasionada por uma estirpe mesogênica do VDN ou ainda, a anticorpos de origem materna²⁸.

A persistência da *Salmonella* na natureza tem sido favorecida em face ao elevado número de espécies de aves

hospedeiras (vida livre e fundo de quintal), o que dificulta a erradicação, embora seja possível conseguir planteis industriais livres da mesma²⁹. O pombo doméstico é visto como um dos principais disseminadores da *Salmonella*, mas esta doença não é somente interessante aos outros animais como também é uma das principais zoonoses bacterianas transmitidas por pombos domésticos com importantes implicações na saúde pública³⁰.

Entretanto, portadores eliminam agentes de doenças por longo tempo na ausência de sinais e, portanto, são identificados apenas por recursos laboratoriais (provas sorológicas e/ou isolamento) ou pela análise criteriosa dos indicadores de saúde²⁹. Apenas um animal foi positivo para *Salmonella* no teste realizado com soro bruto, indicando o contato da ave com o agente. Infelizmente, não foi possível a realização do isolamento do agente, o que traria mais subsídios, confirmando a presença do agente de forma irrefutável. Porém, mesmo em estudos que avaliaram a detecção direta de *Salmonella* em amostras teciduais de pombos, foi encontrada positividade de 7,94%³³.

Todavia, devido ao fato das demais aves que compartilhavam o mesmo habitat com a ave positiva não apresentarem anticorpos anti *Salmonella*, nos direciona que a ave infectada não estava eliminando o agente e, consequentemente contaminando o ambiente. Tendo em vista que a *Salmonella* é transmitida aos pombos por meio de ingestão de água e ração contaminada ou ainda por contato direto com penas, fezes e poeira infectados³³.

5 Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho remetem a avaliar a necessidade de estudos mais abrangentes, possibilitando talvez coletas durante o período de doze meses, na tentativa de observar sazonalidade de ocorrência e/ou transmissão das enfermidades.

No estudo em tela, foi observada a ausência de anticorpos na grande maioria das amostras, demonstrando que, durante o intervalo do período das coletas, a circulação do agente foi insignificante, mesmo um animal apresentando anticorpos anti *Salmonella*. Também existe a relevância de se investigar as populações de pombos em regiões próximas aquele local, bem como nas áreas de criações comerciais, e/ou rotas de aves migratórias, pois estes animais podem apresentar seu real potencial como transmissores de doenças e responsáveis por prejuízos na avicultura. Somado a este fato, a realização de provas diagnósticas diretas podem possibilitar um melhor embasamento técnico para a adoção de medidas profiláticas.

Referências

1. Brasil. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Portaria 193. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília - DF, 19 set. 1994.
2. Berchieri Jr A. Salmoneloses aviárias. In: Berchieri Junior A, Macari M. Doenças das aves. Campinas: FACTA; 2000. p. 183-90.

3. Nascimento VP. Programas de monitorização em salmonelas: uma garantia na preservação da imagem dos produtos avícolas junto ao consumidor. In: Anais do 6º Simpósio Técnico de Produção de Ovos, 1995, Campinas, Brasil. São Paulo: APA; 1995. p.95-108.
4. Sick, H. Ornitologia brasileira. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1992.
5. Werther K. Columbiformes. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Roca; 2006. p.268-89.
6. Davies RH, Wray C. Guideline on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference to *Salmonella* Enteritidis. Austria: WHO; 1994.
7. Yoder Jr HW. *Mycoplasmosis*. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder Jr HW. Diseases of poultry. Ames: Iowa State University Press; 1991.p.198-212.
8. Nascimento ER, Pereira VLA, Nascimento MGF, Barreto ML. Avian Mycoplasmosis Update. Braz J Poultry Sci 2005; 7(1):1-9.
9. International Committee on Taxonomy of viruses ICTV db index of viruses: family 01.048. Paramyxoviridae. 2002. [acesso em 9 dez 2008]. Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ITCvdb/Ictv/fs_param.htm.
10. Alexander DJ, Russel PH, Parsos G, Abu Elzein EME, Ballouh A, Cernik K *et al.* Antigenic and biological characterization of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons: an international collaborative study. Avian Pathol 1985;14:365-76.
11. Ujvari D, Wehmann E, Kaleta EF, Werner O, Savic V, Nagy E *et al.* Phylogenetic analysis reveals extensive evolution of avian paramyxovirus type 1 strains of pigeons (*Columba livia*) and suggests multiple species transmission. Virus Res 2003;96:63-73.
12. Olson NO, Yamamoto R, Ortmayer H. Antigenic relationship between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum*. Am J Vet Res 1965;26:195-8.
13. Vardaman TH, Yoder Jr HW. Preparation of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinating antigen and its use in the hemagglutination-inhibition test. Avian Dis 1969;13:654-61.
14. Kowuenhoven B. Newcastle disease. In: McFerran JB, McNulty M.S. Virus infection in birds. Amsterdam: Elsevier Science; 1993.
15. Richtzenhain LJ, Paulillo AC, Pinto AA, Kronka SN. 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 1993;24(3):187-91.
16. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR. Diseases of poultry. Ames: Iowa State University Press; 1997.
17. Kho CL, Mohd-azmi ML, Arshad SS, Yusoff K. Performance of an RT-Nested PCR Elisa for detection of newcastle disease virus. J Virol Methods 2000;86:71-83.
18. Carrasco AOT, Seki MC, Sousa RLM, Raso TF, Pinto AA. Protection levels of vaccinated pigeons (*Columba livia*) against a highly pathogenic Newcastle Disease. Trop Anim Health Prod 2009;41:1325-33.
19. Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa 78. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Brasília; 2003.
20. Beard CW, Wilkes WJ. A simple and rapid microtest procedure for determining Newcastle hemagglutination-inhibition (HI) antibody titers. Proc. annu. meet. U.S. Anim Health Assoc 1973;77:596-600.
21. Carrasco AOT. Infecção experimental de pombos com estirpes do vírus da doença de Newcastle de baixa e alta patogenicidade. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2005.
22. Dhondt AA, Hartup BK, Sydenstricker KV, Hochachka WM, Kollias GV. Host range and dynamics of mycoplasmal conjunctivitis among birds in North America. J Wildl Dis 2001;37(1):72-81.
23. Seal BS, King DJ, Locke DP, Senne DA, Jackwood MW. Phylogenetic relationship among high virulent NDV isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. J Clin Microbiol 1998;36(4):1141-5.
24. Clavijo A, Robinson Y, Booth T, Munroe F. Velogenic Newcastle disease in imported caged birds. Can Vet J 2000;41:404-6.
25. Carrasco AOT, Seki MC, Raso TF, Paulillo AC, Pinto AA. Experimental infection of Newcastle Disease virus in pigeons (*Columba livia*): Humoral antibody response, contact transmission and viral genome shedding. Vet Microbiol 2008;129(1/2):89-96.
26. Awan MA, Otte MJ, James AD. The epidemiology of Newcastle Disease in rural poultry: a review. Avian Pathol 1994;23:405-23.
27. Stone HD. Efficacy of oil-emulsion vaccines prepared with Pigeon Paramyxovirus -1, ulster and LaSotaNewcastle Disease Viruses. Avian Diseases 1989; 33:157-162.
28. Parede L, Young PL. The pathogenesis of Velogenic Newcastle Disease Virus infection of chickens of different ages and different levels of immunity. Avian Dis 1990; 34:803-8.
29. Snoeyenbos GH. Pullorum disease. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder Jr. HW. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press; 1991. p.73-86.
30. González-Acuña D, Silva FG, Moreno LS, Cerda FL, Donoso SE, Cabello JC *et al.* Detección de algunos agentes zoonóticos en la Paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Chile. Rev Chil Infectol 2007;3(24):199-203.
31. Flores ML, Segabinazi SD, Santos HF, Bassan JDL. Epidemiologia da doença de newcastle: revisão bibliográfica. Hora Vet 2006;26(153):57-61.
32. Sousa E, Bercieri Junior A, Pinto AA, Machado RZ, Carrasco AOT, Marciano JÁ *et al.* Prevalence of salmonella spp. antibodies to *Toxoplasma gondii*, and Newcastle disease virus in feral pigeons (*Columba livia*) in the city of Jaboticabal, Brazil. J Zoo Wildl Med 2010;41(4):603-7.

