NOVOS FOCOS DA DOENÇA DE NEWCASTLE NO BRASIL *

RENATO AUGUSTO DA SILVA **, MOACYR ROSSI NILSSON **,
JOSÉ FRANCISCO GUIMARÃES ***, MILTON MARQUES DA SILVA ***
e WILHELM BRADA ***

I. INTRODUÇÃO

A doença de Newcastle, segundo Doyde ⁶, é uma doença infecciosa e contagiosa das aves, de caráter agudo, de grande semelhança com a Peste aviária, causada por um vírus filtrável, caracterizando-se por dificuldade respiratória e alta mortalidade.

No Brasil, a doença de Newcastle foi observada pela primeira vez por Andrade dos Santos e cols. ², no ano de 1953, no Território do Amapá. Ainda, no mesmo ano, Andrade dos Santos e cols constataram a presença da doença em aves, no Município de São Gonçalo, Estado do Rio de Janeiro. Posteriormente, Guimarães e Silva ⁸, descrevem a doença no Município de Volta Grande, Estado de Minas Gerais; Silva ¹¹, isola o vírus de Faisão, procedente do Estado da Guanabara e Alice e cols. ¹, observam a doença na cidade de Salvador, Estado da Bahia, isolando 15 amostras de vírus. Cunha e Silva ⁵, em 1955 relatam o isolamento e a identificação das amostras de vírus referentes ao Território do Amapá e São Gonçalo e Nobrega ¹⁰, estuda os primeiros focos ocorridos em São Paulo. Guimarães ⁹, em 1956 e em 1961, observou focos da doença em Florianópolis, e em Brasília, respectivamente. Giovanonni ⁷, em 1961, isolou o vírus de aves doentes do Estado do Paraná.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1) *Isolamento de vírus*

Fragmentos de órgão das aves sacrificadas ou encontradas mortas, eram encaminhados ao Instituto de Biologia Animal, em líquidos conservadores, como o líquido de Bedson, líquido de Vallée ou mesmo a glicerina pura.

Freqüentemente, recebíamos aves ainda vivas, que mostravam sintomas neuro-respiratórios. Estas aves eram sangradas para provas sorológicas e logo sacrificadas para a coleta dos órgãos.

Os tecidos comumente usados no preparo das suspensões eram o baço, o cérebro, o pulmão e o fígado. Em alguns casos, o muco traqueal e a gema eram utilizados, segundo o quadro I.

Realizamos as suspensões dos órgãos em caldo simples na proporção de 1 gr de material para 5 ml de caldo simples.

No preparo das suspensões, areia estéril era utilizada em alguns casos, a fim de facilitar a trituração do material.

* Entregue para publicação em 24 de novembro de 1960.

** Da Seção de Zoonoses por Vírus, do Instituto de Biologia Animal — Rio de Janeiro.

*** Da Seção de Ornitopatologia, do Instituto de Biologia Animal — Rio de Janeiro.

QUADRO I

Número de registro do material	ORIGEM	Data	Título hemaglutinante	Orgãos utilizados
832	Vigário Geral, Estado da Guanabara.	26- 2-54	1:640	Baço, fígado, pulmão e cérebro.
877	Paciência, Estado da Guanabara.	7- 5-54	1:80	Baço e gema
899	Santa Cruz, Estado da Guanabara.	19- 5-54	1:320	Baço e muco traqueal.
922	Santa Cruz, Estado da Guanabara.	20- 5-54	1:320	Baço, fígado e muco traqueal.
923	Santa Cruz, Estado da Guanabara.	20- 5-54	1:80	Baço, fígado e muco traqueal.
924	Santa Cruz, Estado da Guanabara.	20- 5-54	1:320	Baço, fígado e muco traqueal.
996	Santa Cruz, Estado da Guanabara.	9- 8-54	1:320	Cérebro e baço.
1.059	Galeão (II), Estado da Guanabara.	12-10-54	1:1.280	Baço e cérebro.
1.061	Galeão (III), Estado da Guanabara.	12-10-54	1:2.560	Baço e cérebro.
1.064	Galeão (IV), Estado da Guanabara.	12-10-54	1:640	Baço e cérebro.
1.066	Realengo, Estado da Guanabara.	21-10-54	1:320	Baço e gema.
1.072	São Bento, Estado do Rio de Janeiro.	12-10-54	1:80	Cérebro, baço e muco traqueal.
1.082	João Pessoa, Estado da Paraíba.	12-11-54	1:640	Fígado, baço, cérebro e muco traqueal.
1.088	Jacarepaguá, Estado da Guanabara.	14-10-54	1:320	Cérebro e baço.
1.098	Friburgo, Estado do Rio de Janeiro.	1-10-54	1:320	Cérebro, fígado e traqueia.
1.099	Jacarepaguá, Estado da Guanabara.	8-11-54	1:2.560	Cérebro.
1.103	Campo Grande, Estado da Guanabara.	24-11-54	1:2.560	Cérebro e baço.
1.166	Joazeiro, Estado da Bahia.	11- 4-55	1:640	Cérebro, baço e pulmão.
1.167	Joazeiro, Estado da Bahia.	11- 4-55	1:640	Cérebro, baço e pulmão.
1.223	Campo Grande, Estado da Guanabara.	8- 8-55	1:640	Muco traqueal.

A suspensão, assim preparada, era centrifugada por 10 minutos a 2.500 r. p. m., separando-se o sobrenadante após esta operação. O sedimento era então desprezado. Adicionavam-se 1.000 unidades de penicilina potássica (Squibb) e 1 mg de di-hidro estreptomomicina (Squibb) por mililitro ao sobrenadante, deixando-se em temperatura de 4°C por meia hora.

Contrôle bacteriológico era efetuado antes da inoculação em ovos embrionados em meios de Thioglicolate ou caldo simples.

Para as inoculações em ovos embrionados, utilizávamos ovos de casca branca, provenientes de granjas particulares ou oficiais, as quais periodicamente fazem controle de pulrose. Estes ovos eram incubados em chocadeira elétrica, regulada a 105°F, sendo examinados ao ovoscópio antes da inoculação para marcação da câmara de ar e do embrião. A seguir desinfetavam-se com uma solução de iodo a 1% os dois pontos marcados e com um aparelho elétrico (Dremel-Moto Tool) fazíamos uma perfuração ao nível do embrião, fugindo-se dos grandes vasos e outra na câmara de ar. A seguir passávamos sobre estes orifícios um algodão esterilizado, embebido levemente em álcool. Com uma agulha previamente esterilizada, perfurávamos a membrana da casca da câmara de ar a fim de evitarmos o refluxo do material inoculado.

Para cada material, quatro, cinco ou seis ovos, com 10 dias de incubação eram inoculados com 0,1 ml de suspensão, na cavidade alantoide. Em seguida, os orifícios eram selados com uma mistura de cera e parafina em partes iguais

e logo após esta operação os ovos voltavam à incubadeira, sendo observados diariamente durante dez dias.

Os ovos com embriões mortos nas primeiras 24 horas eram eliminados, procedendo-se ovoscopias pela manhã e a tarde com o fito de separar-se os ovos cujos embriões morriam após aquele primeiro período. Estes ovos eram colocados em temperatura de 4°C, pelo prazo mínimo de 3 horas para condensação da gema. O líquido alantoidiano de cada ovo era então coletado com pipeta Pasteur, fazendo-se abertura total da câmara de ar com todos os cuidados de assepsia e colocado separadamente em tubos de ensaios. Semeaduras em meios de tioglicolate ou caldo simples de cada líquido coletado eram efetuadas a após 48 horas de prova os líquidos alantoidianos eram reunidos e congelados a —20°C, para estudos posteriores. Logo a seguir à coleta do líquido alantoidiano, cada embrião era examinado para a verificação das lesões.

2) *Identificação das amostras de vírus*

Na execução da identificação das amostras procuramos seguir as técnicas recomendadas por Cunningham⁴, que passaremos a descrever.

a) *Prova de Hemaglutinação*

O líquido alantoidiano a ser testado era diluído a 1:5 em soro fisiológico a 8,5 por mil. Em uma série de tubos de hemólise colocávamos 0,25 ml de soro fisiológico a 8,5 por mil, a partir do segundo tubo. No primeiro tubo da série colocávamos 0,25 ml do líquido alantoidiano diluído a 1:5 e no segundo tubo, a mesma quantidade do líquido diluído era colocada, obtendo-se a diluição a 1:10; deste tubo, após misturarmos várias vezes, retirávamos 0,25 ml, transferindo-se para o terceiro tubo e assim sucessivamente até obtermos a diluição 5.120, desprezando-se 0,25 ml da última diluição. Em seguida distribuíamos a todos os tubos da série 0,25 ml de soro fisiológico a 8,5 por mil e 0,25 ml de uma suspensão de glóbulos vermelhos de galinha a 0,5%. Tubos testemunhos de salina e glóbulos eram anexados à prova. Os tubos eram agitados e deixados a temperatura ambiente por 45 minutos, fazendo-se 3 leituras, a primeira aos 15 minutos, a segunda aos 30 minutos e a terceira, aos 45 minutos. Uma reação positiva ou hemaglutinação completa era indicada pelo depósito de numerosos e pequeninos grumos de glóbulos aglutinados no fundo do tubo. Uma reação negativa era dada pelo depósito dos glóbulos em um círculo compacto ocupando apenas o centro do fundo do tubo, como nos tubos testemunhos, com apenas soro fisiológico e glóbulos. Reações intermediárias foram observadas, mas o título do vírus era considerado como a diluição mais alta do líquido alantoidiano antes da segunda adição do soro fisiológico, em que a hemaglutinação era evidente.

Os glóbulos vermelhos para a suspensão a 0,5% eram obtidos por punção cardíaca de uma galinha, sendo o sangue coletado em uma seringa contendo solução de citrato de sódio a 2%. Os glóbulos eram lavados em soro fisiológico e centrifugados a seguir durante 10 minutos a 2.000 r.p.m. Repetia-se esta operação 3 ou 4 vezes até o sobrenadante mostrar-se límpido. O sedimento era então utilizado.

b) *Prova da Inibição da Hemaglutinação*

A prova da inibição da hemaglutinação foi realizada com soro contendo alto teor em anticorpos para o vírus da doença de Newcastle, por nós preparado, hiperimunizando galinhas com a amostra La-Sotta da doença de Newcastle, mais atenuada que a amostra Beaudette-Roakin, aconselhada para a vacinação

das aves em postura, gentilmente cedida pelo falecido cientista norte-americano, Professor F. R. Beaudette, quando de sua vinda ao Brasil, em 1954.

Os líquidos alantoidianos que deram títulos hemaglutinantes eram submetidos a esta prova.

Realizamos o teste que é denominado alpha por Cunningham⁴, seguindo-se a mesma técnica utilizada para a prova de hemaglutinação, sendo que a segunda adição do soro fisiológico era substituída pelo soro imune diluído a 1:5, na mesma quantidade. Deixávamos as misturas de soro e vírus em contato na temperatura ambiente por 10 minutos. Todos os tubos receberam também suspensão de glóbulos vermelhos a 0,5% e a leitura da prova também, era feita dentro dos três tempos, isto é, em 15, 30 e 45 minutos. O título de inibição dos séros era calculado, dividindo-se o título do vírus pelo título do soro e multiplicando-se o resultado pelo fator de diluição do soro. O título do soro era representado pela diluição mais baixa do vírus em que a hemaglutinação era inibida completamente.

III. RESULTADOS

1) *Isolamento das amostras de vírus*

Vinte amostras do vírus da doença de Newcastle foram isoladas, sendo quinze do antigo Distrito Federal, atual Estado da Guanabara, duas do Estado do Rio de Janeiro, uma do Estado da Paraíba e duas do Estado da Bahia.

Com regular frequência todas as amostras isoladas foram 100% letais para os embriões no período de 24 a 96 horas após inoculação. Apenas uma única amostra que recebeu no livro de registro da Seção de Zoonoses por Vírus, o número 1.223, desde a sua primeira passagem apresentou período de incubação de 6 a 7 dias, caracterizando-se por determinar lesões atroficas no embrião. Estudo posterior desta amostra será realizado em face de suas propriedades patogênicas. As lesões observadas nos embriões mortos com as outras amostras eram caracterizadas por manchas arroxeadas na nuca, pontilhado hemorrágico disseminado pelo corpo, congestão intensa do fígado, edema da membrana cório-alantoidiana e congestão dos vasos do saco da gema, estando estas lesões concordes com as descritas por Beaudette³, produzidas pelas amostras norte-americanas.

2) *Identificação das amostras de vírus*

a) *Prova de Hemaglutinação*

Os líquidos alantoidianos provenientes dos ovos inoculados para cada material teve a sua capacidade hemaglutinante examinada. Pela leitura do quadro I, verifica-se que o título hemaglutinante das amostras isoladas variou de 1:80 a 1:2.560.

b) *Prova de Inibição da Hemaglutinação*

Comprovada a infecciosidade dos materiais inoculados para o embrião de galinha e a capacidade hemaglutinante, submetia-se cada amostra de líquido alantoidiano correspondente aos materiais inoculados à prova de inibição da hemaglutinação com soro contendo alto teor em anticorpos para o vírus da doença de Newcastle.

Pela leitura do quadro II, observa-se que a capacidade hemaglutinante das amostras isoladas foi inibida pelo soro imune preparado com amostra de vírus La-Sotta, da doença de Newcastle, obtendo-se títulos de inibição não inferiores a 400.

QUADRO II

Inibição da hemaglutinação das amostras isoladas pelo soro imune da doença de Newcastle

AMOSTRAS DE VIRUS	Soro imune I.B.A.	DILUIÇÃO DO LÍQUIDO ALANTOIDIANO VIRULENTO											Título de inibição
		1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.280	1/2.560	1/5.120	
Amostra n.º 832	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.200
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Amostra n.º 877	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400
	Salina	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Amostra n.º 899	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.600
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Amostra n.º 922	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.600
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Amostra n.º 923	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400
	Salina	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Amostra n.º 924	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.600
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Amostra n.º 996	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.600
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Amostra n.º 1.059	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.400
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Amostra n.º 1.061	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.800
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Amostra n.º 1.094	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.200
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Amostra n.º 1.066	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.600
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Amostra n.º 1.072	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400
	Salina	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Amostra n.º 1.082	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.200
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Amostra n.º 1.088	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.600
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Amostra n.º 1.098	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.600
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Amostra n.º 1.099	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.800
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Amostra n.º 1.103	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.800
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Amostra n.º 1.166	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.200
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Amostra n.º 1.167	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.200
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Amostra n.º 1.223	Soro imune	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.200
	Salina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

(-) = Ausência de Hemaglutinação.
 (+) = Hemaglutinação.

IV. RESUMO

No presente trabalho os autores descrevem o isolamento e a identificação de 20 amostras de vírus da doença de Newcastle, sendo quinze amostras do antigo Distrito Federal, atual Estado da Guanabara, duas do Estado do Rio de Janeiro, uma do Estado da Paraíba e duas do Estado da Bahia. Os líquidos alantoidianos coletados dos ovos embrionados infectados revelaram a propriedade de aglutinar glóbulos vermelhos de galinha. Prova de inibição da hema-glutinação com sôro imune preparado no Instituto de Biologia Animal, foi realizada obtendo-se altos títulos de inibição.

NEW OUTBREAKS OF NEWCASTLE DISEASE IN BRAZIL

Abstract

This article deals with the isolation and identification of twenty strains of Newcastle Disease Virus. Fifteen of these strains have been found in the State of Guanabara (early Distrito Federal); two in the State of Rio de Janeiro, one of them has been encountered in the State of Paraíba and the remainder two in the State of Bahia. The allantoic fluid from the embrionated infected eggs has been shown to agglutinate chicken blood cells. Hemagglutination-inhibition tests made with specific immune-sera prepared at the Instituto de Biologia Animal (Ministério da Agricultura, Brasil) revealed high titers of inhibition.

V. REFERÊNCIAS

- 1) ALICE, F.J.; NETTO, R.M. & RIBEIRO, M.B. (1956). — Ocorrência da doença de Newcastle na Bahia. *Bol. Inst. Biológico da Bahia*, 3 (1): 124-131.
- 2) ANDRADE DOS SANTOS, J.; SILVA, R.A.; BRADA, W.; MARINHO, E. & CUNHA, R.G. (1954). — Sobre a ocorrência da doença de Newcastle no Brasil (Nota Prévia). *Rev. Mil. Rem. Vet.* 14: 9-11.
- 3) BEAUDETTE, F.R. (1946). — Newcastle Disease in Poultry. *Cornell Vet.* 36: 105-117.
- 4) CUNNINGHAM, C.H. (1952). — Methods Employed in the Diagnosis and Investigation of Infectious Bronchitis and Newcastle Disease. *Proc. Book. Am. Vet. Med. Ass. 89th Annual Meeting*: 250-257.
- 5) CUNHA, R.G. & SILVA, R.A. (1955). — Isolamento e identificação do vírus da doença de Newcastle no Brasil. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 23: 17-33.
- 6) DOYLE, T.M. (1927). — A Hitherto Unrecorded Disease of Fowls Due a Filter Passing Virus. *Jour. Comp. Path. and Therap.*, 40: 144-169.
- 7) GIOVANONNI M. — *Comunicação pessoal.*
- 8) GUIMARÃES, J.F. & SILVA, R.A. (1954). — Doença de Newcastle em Minas Gerais (Nota prévia). *Veterinária*, 8 (4): 32-33. Rio de Janeiro.
- 9) GUIMARÃES, J.F. — *Comunicação pessoal.*
- 10) NÓREGA, P. — *Comunicação pessoal.*
- 11) SILVA, R.A. (1954). — Isolamento do vírus da doença de Newcastle em faisão. *Veterinária*, 8 (4): 41-43. Rio de Janeiro.