

Soroepidemiologia da doença de Newcastle em plantéis de avestruzes dos Estados da Bahia e de São Paulo

Serologic occurrence of Newcastle disease in ostriches raised in Bahia and São Paulo

Lia Muniz Barretto Fernandes^I Priscila Sousa da Silva^{II*} Izabella Ramos^{III} Tatiane Santana Sales^{II}
Elen Fabiane Guimarães Herval^{II} Thaís de Brito Batinga^{III} Paulo César Costa Maia^I
André Eduardo Rocha César^{III} Luciano Doretto Júnior^{IV} Roberto Meyer^V
Songeli Menezes Freire^V

RESUMO

Estudos sorológicos em Avestruzes (Struthio camelus) são ferramentas úteis para analisar os riscos relacionados à Doença de Newcastle nesses plantéis e à avicultura nacional. No presente estudo, amostras de sangue foram obtidas de avestruzes de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias e sem apresentação de sintomatologia clínica, criadas nos Estados da Bahia e de São Paulo com o objetivo de avaliar a presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle por meio de ELISA indireto. Foram testadas 339 amostras provenientes do Estado da Bahia e 105 amostras do Estado de São Paulo. Apesar de os proprietários afirmarem que não foi utilizada vacina em seus animais, foi verificada positividade na Bahia de 17,9% e de 4,7% em São Paulo, em avestruzes, sugerindo contato com vírus vacinal ou de campo.

Palavras-chave: avestruz, doença de Newcastle, ELISA, diagnóstico.

ABSTRACT

Serological studies in ostriches (Struthio camelus) are important tools to assess the risk of Newcastle disease in these herds and to the national poultry industry. In the present study blood samples were obtained from male and female ostriches without symptoms of the disease, raised in Bahia and São Paulo in order to evaluate the presence of antibodies against Newcastle disease virus using an indirect ELISA. There were collected 339 samples in Bahia and 105 samples in São Paulo. Although the owners guarantee that animals were not vaccinated, it was verified the presence 17,9% positives in Bahia and 4,7% in São Paulo, suggesting contact with vaccinal or field strain.

Key words: ostrich, Newcastle disease, ELISA, diagnosis.

INTRODUÇÃO

Doença de Newcastle é uma infecção viral altamente contagiosa e representa sérios riscos à indústria avícola moderna, seja pelas perdas diretas verificadas na produção, seja pela imposição de barreiras na comercialização de produtos avícolas (ALEXANDER, 2001). O vírus da Doença de Newcastle pertence à família *Paramyxoviridae* e é o único membro do gênero *Avulavirus*. Apesar de os isolados virais pertencerem ao mesmo sorotipo (APMV-1), há uma grande variação entre as diversas cepas no que se refere à patogenicidade (ALEXANDER, 1991; ZHUHUI et al., 2004). Assim, fatores como virulência da amostra, espécie acometida, “status” imunológico, predileção do vírus pelo sistema respiratório, sistema digestivo ou sistema nervoso central, causam grande variação na apresentação de sinais clínicos (SWAYNE & KING, 2003). Os primeiros relatos de Doença de Newcastle em avestruzes foram feitos na década de 50, em animais mantidos em zoológicos (ALEXANDER, 2000). SAMBERG et al. (1989) descreveram um surto em criação de avestruzes em Israel, com manifestação nervosa e alta mortalidade, e enfatizaram o risco decorrente da proximidade existente entre a propriedade afetada e os criatórios comerciais de galinhas. Países

^IDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil.

^{II}Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, UFBA, 41720-010, Salvador, BA, Brasil. E-mail: estrelamaior@gmail.com. *Autor para correspondência.

^{III}Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia (LASAB), UFBA, Salvador, BA, Brasil.

^{IV}Centro de Pesquisas em Animais do Brasil (CPABR), Amparo, SP, Brasil.

^VLaboratório de Imunologia (LABIMUNO), UFBA, Salvador, BA, Brasil.

do Sul da África enfrentaram uma epizootia de Doença de Newcastle entre 1993 e 1995. Várias espécies de aves domésticas foram acometidas e foram efetuados registros de casos em criações de avestruzes (ALLWRIGHT, 1996).

A intensificação na comercialização internacional de avestruzes, verificada a partir da década de 90, suscitou apreensão nas autoridades sanitárias do mundo todo, fazendo com que a maioria dos países criasse legislações específicas relacionadas ao tema. O fortalecimento da comercialização desses animais justamente no momento em que ocorria uma epizootia na África pode ter favorecido a propagação da Doença de Newcastle para vários países importadores (ALEXANDER, 2000).

No Brasil, no primeiro momento de expansão da atividade, a distribuição de animais para várias regiões ocorreu sem que as medidas básicas de controle, tais como quarentena, registros de procedência, isolamento das criações e monitoramento de doenças, fossem rigorosamente observadas. Isso levou ao sacrifício de avestruzes no Estado de São Paulo e na Bahia, bem como ao embargo das importações (DORRÉTO JÚNIOR & PAULILLO, 2006). A preocupação com questões de âmbito sanitário culminou com a inclusão das avestruzes no grupo das aves de criação comercial. Assim, os estruticultores passaram a ter que atender às normas dos programas da avicultura industrial. Os estruticultores nacionais se mobilizaram, e o setor passou a participar do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), filiando-se à União Brasileira de Avicultura (UBA). A fiscalização da atividade deixou de ser da competência do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), passando para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2002, e as Normas para Criação de Avestruzes foram publicadas no ano seguinte, constando na Instrução Normativa número 2 (MAPA, 2003; D'ÁVILA, 2005). Entretanto, as diferenças existentes entre avestruzes e galinhas acendem discussões e motivam proposições de revisão na legislação para que as normas sejam específicas para comercialização desses animais (ALEXANDER, 2000).

A inclusão da estruticultura no PNSA foi um passo importante, mas como ação isolada não garante o cumprimento das medidas de biossegurança necessárias para evitar a disseminação da Doença de Newcastle. No ano de 2005, o rebanho brasileiro de avestruzes contava com mais de 200.000 cabeças, criadas de forma semi-extensiva, e distribuídas em todo o território nacional, muitas vezes em áreas próximas a criatórios avícolas industriais. Nesse sentido, um programa de vigilância eficaz depende da pesquisa de

métodos de diagnóstico confiáveis e exequíveis em laboratórios credenciados para tal (MENDES, 2006). Apesar de a presença de anticorpos específicos no soro fornecer poucas informações a respeito da amostra infectante, pode ser suficiente para a definição de estratégias de controle e extremamente útil para confirmar o sucesso de programas de vacinação (ALEXANDER & MANVELL, 2003). O ELISA indireto vem sendo utilizado com sucesso em monitoramentos e estudos de soroprevalência para a Doença de Newcastle (CADMAN et al., 1997; WILLIAMS et al., 1997). O presente trabalho tem o objetivo de verificar a presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle em plantéis de avestruzes dos Estados com maior concentração desses animais, visando a auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle dessa enfermidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras séricas da Bahia: Foram obtidas 340 amostras referentes a 10% do plantel de 20 criadores, o que corresponde a 10% dos 200 criatórios cadastrados na Associação Baiana de Estruticultura (ABCAV), no ano de 2005 (Tabela 1). Foram utilizadas 339 amostras no trabalho (uma amostra insuficiente para realização do teste).

Amostras séricas de São Paulo: Foram obtidas 140 amostras referentes a 10% do plantel de 14 criadores, o que corresponde a 5% dos 280 criatórios cadastrados na Associação dos Empreendedores de Estruticultura (AEPE), em 1998 (Tabela 2). Foram utilizadas 105 amostras no trabalho (35 amostras foram inadequadas ou insuficientes para realização do teste).

Amostras “padrão-ouro” foram cedidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e consistiram de nove amostras soropositivas e nove amostras negativas testadas por meio da inibição da hemaglutinação. Para o teste de inibição da hemaglutinação, foram utilizadas quatro unidades hemaglutinantes do antígeno inativado cepa La Sota cedido pelo Laboratório de Referência Animal (LANAGRO – Campinas – MAPA) e hemácias de avestruz a 1%. Foi realizada a diluição seriada de cada soro padrão, e os títulos expressos como o inverso da maior diluição de soro capaz de inibir a hemaglutinação. Os soros padrão positivos apresentaram títulos iguais a 1:128 (2⁷), e os soros padrão negativos não apresentaram capacidade de inibição de hemaglutinação em nenhuma diluição. As amostras foram avaliadas utilizando-se o teste ELISA, com conjugado anti-avestruz produzido no Laboratório de Sanidade Avícola da Bahia de acordo com WILSON &

Tabela 1 - Número total de animais, de amostras e de positivos nos criatórios da Bahia.

Criatórios da Bahia	Número de animais	Número de amostras processadas	Número de positivos	% de positivos
1	109	10	-	-
2	98	10	3	30
3	69	7	-	-
4	262	26	-	-
5	418	41	10	24,4
6	138	15	5	33,3
7	152	15	2	13,3
8	72	7	-	-
9	516	50	21	42
10	22	5	-	-
11	321	32	2	6,3
12	275	27	8	29,6
13	11	2	1	50
14	449	40	8	20
15	35	4	-	-
16	96	10	-	-
17	79	8	-	-
18	41	5	1	20
19	184	20	-	-
20	53	5	-	-
Total	3400	339	61	17,9%

NAKANE (1978). Para a produção de anti-IgG de avestruz, foram utilizados dois caprinos adultos submetidos a protocolo de imunização com IgG de avestruz, obtida por meio de cromatografia de troca iônica em coluna de QAE – Sephadex A-50 (Sigma) e adjuvante completo de Freund. A placa foi sensibilizada com antígeno La Sota inativado (Vacina viva atenuada produzida pelo Laboratório BIOVET) e diluído em 1:500,

em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6, colocado em placas de poliestireno tipo *high binding*, marca “Costar”, no volume de 100µL em cada um dos seus 96 poços e deixado a 4 graus Celsius por 16 horas. Após duas lavagens com PBS-T20 (solução salina tamponada pH 7,4, com detergente polisorbato 20), foram colocadas as amostras, o “branco” e os controles positivos e negativos (estes últimos em duplicata) num volume de 50µL poço⁻¹ a 1:200, em PBS-T20 (contendo 1% de leite desnatado da marca Molico durante 45 minutos). Após seis lavagens em PBS-T20, foram adicionados às placas 50µL de imunoglobulina de cabra anti-imunoglobulina G de avestruz, conjugada à peroxidase e diluída a 1:2000, em PBS-T20, contendo leite desnatado a 1%. As placas foram incubadas a 37 graus Celsius por 45 minutos.

Em seguida, foram novamente lavadas seis vezes em PBS-T20 e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 50µL poço⁻¹ da solução reveladora, tendo como cromógeno tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida com o acréscimo de 25µL de ácido sulfúrico. A leitura foi feita em leitor de ELISA (marca “BIO RAD”, modelo PR 2100), usando filtro de 620nm de comprimento de onda. O ponto de corte foi definido por meio da curva ROC (Receiver-Operating Curve) ou curva operacional relativa. Essa análise se baseia numa curva em que são colocados os valores de corte, tendo no eixo das ordenadas a sensibilidade e no eixo das abscissas a taxa de falso positivo (ou seja, 1 menos o valor da especificidade). O ponto de corte ideal é o que permite uma maior especificidade, sem perda de sensibilidade (GREINER et al., 1995; XU et al., 1997). Para o ELISA, o ponto de corte para obtenção de máxima sensibilidade e especificidade foi de 0,165. Os testes estatísticos

Tabela 2 - Número total de animais, de amostras e de positivos nos criatórios de São Paulo.

Criatórios de São Paulo	Número de animais	Número de amostras processadas	Número de positivos	% de positivos
1	233	24	1	4,2
2	150	10	-	-
3	32	3	1	33,3
4	59	3	-	-
5	77	5	-	-
6	21	3	-	-
7	35	4	-	-
8	103	5	-	-
9	48	3	-	-
10	67	5	-	-
11	11	9	-	-
12	370	21	2	9,5
13	14	2	-	-
14	80	8	1	12,5
Total	1300	105	5	4,7%

utilizados foram feitos por meio do programa SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*), versão 9.0, desenvolvido pela Universidade de Chicago – EUA e comercializado pela empresa americana SPSS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados obtidos por meio do teste ELISA revelou que avestruzes não vacinadas nos dois Estados estudados apresentaram reação positiva para a Doença de Newcastle, conforme observado na figura 1 e nas tabelas 1 e 2. A porcentagem de avestruzes positivas no Estado da Bahia sugere que houve maior exposição desses animais ao vírus da Doença de Newcastle. A avaliação dos criatórios em cada Estado também demonstrou que 50% dos criatórios baianos possuíam animais positivos, enquanto que, em São Paulo, o resultado foi de 28,5% (Tabelas 1 e 2). Estudo anterior realizado na Bahia demonstrou que as criações de galinhas para subsistência apresentavam títulos elevados para a Doença de Newcastle, sugerindo risco, tanto para a avicultura, quanto para a estrutiocultura (SALES et al., 2007). Apesar da demonstração da susceptibilidade de avestruzes e outras ratitas à infecção natural e experimental pelo vírus da Doença de Newcastle, a idade dos animais e as práticas extensivas de criação, além de fatores relacionados a espécies, tornam imprevisíveis os padrões de disseminação da enfermidade (ALEXANDER, 2000). Dessa maneira, estudos baseados em modelos de simulação para análise de risco (BURBANO et al., 2005), em caracterização filogenética dos isolados de campo (ALDOUS & ALEXANDER, 2001) ou por meio de avaliação epidemiológica clínica e experimental (CHEN & WANG, 2002), devem ser realizados para que possa

haver maior compreensão a respeito da epidemiologia da Doença de Newcastle nos plantéis desses Estados. A análise do número de reagentes por criatório revelou que plantéis de diferentes tamanhos apresentavam grande variação no número de positivos, corroborando as afirmações feitas por HUCHZERMAYER (2002) de que a forma de transmissão da Doença de Newcastle em avestruzes limita a disseminação, já que nesses animais a transmissão depende do contato direto, não se dando por via aerógena.

Apesar de a Inibição da Hemaglutinação ser considerada como teste oficial para Doença de Newcastle, o ELISA vem sendo cada vez mais utilizado, devido a sua maior especificidade e sensibilidade (WILLIAMS et al., 1997). Porém, os kits comerciais são produzidos para uso específico em galinhas. Nesse sentido, a produção do conjugado anti-IgG de avestruz para utilização em kits comerciais capazes de produzir resultados confiáveis torna-se uma alternativa interessante para estudos soroepidemiológicos e para programas de defesa animal.

Estudos anteriores mostram a presença de reação positiva para a Doença de Newcastle utilizando o teste ELISA comercial com conjugado anti-avestruz, conforme observado por CADMAN et al. (1997). Esses autores analisaram amostras de soro de 149 avestruzes criadas em nove propriedades no Zimbábue e verificaram 23% de animais reagentes para Doença de Newcastle.

Algumas amostras de soro utilizadas no presente experimento apresentaram reação positiva para a Doença de Newcastle apesar de os animais não apresentarem nenhuma sintomatologia clínica para a doença e as amostras testadas serem obtidas de criatórios cujos proprietários afirmaram não terem utilizado quaisquer vacinas em seus animais. No Brasil

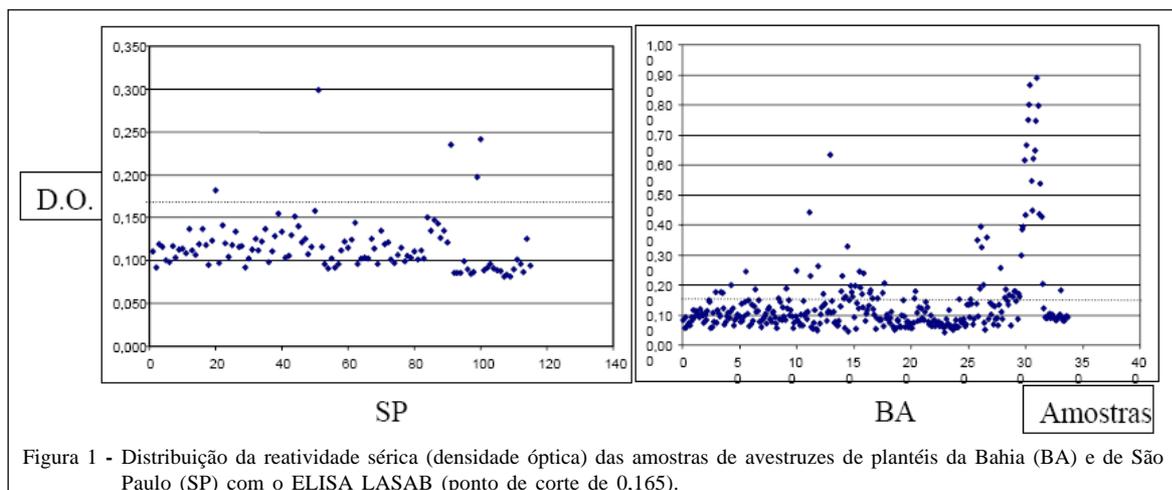


Figura 1 - Distribuição da reatividade sérica (densidade óptica) das amostras de avestruzes de plantéis da Bahia (BA) e de São Paulo (SP) com o ELISA LASAB (ponto de corte de 0,165).

ainda não existem vacinas contra a Doença de Newcastle registradas no MAPA para utilização em avestruzes. A vacinação de avestruzes contra a Doença de Newcastle é facultativa, mas recomenda-se que seja realizado estudo epidemiológico para definir a necessidade de sua aplicação (MAPA, 2003). Pode-se supor, portanto, que os anticorpos encontrados no soro dessas avestruzes sejam decorrentes de contato com amostras de campo ou de resposta a amostras procedentes de vacinas empregadas em galinhas, criadas na mesma propriedade ou em propriedades vizinhas. Estudo realizado em avestruzes imunizadas com vacinas vivas e atenuadas produzidas e comercializadas para utilização em galinhas demonstraram que há indução de produção de anticorpos em avestruzes (SAKAI et al., 2006b). Apesar de a recomendação de isolamento das avestruzes e a possibilidade de galinhas servirem como fontes de infecção da Doença de Newcastle para avestruzes ser bastante conhecida, como relatado por HUCHZERMAYER (1997) e LEY et al. (2000), a condição de promiscuidade entre as duas espécies é bastante comum.

A presença de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle em avestruzes não vacinadas também foi observada na Suécia e Holanda (KOCH et al., 1998). A comparação de resultados obtidos nos testes de soroneutralização e inibição da hemaglutinação e no ELISA revelou 66,35%, 61,6% e 57,8% de amostras positivas, respectivamente. Os autores advertiram para a importância da definição de um programa contínuo de estudos sorológicos para analisar a soroconversão e a persistência de anticorpos nessas aves. SAKAI et al. (2006a) também detectaram positividade para Doença de Newcastle em 12% das 191 amostras de avestruzes obtidas de criatórios japoneses que não utilizavam a vacina, sugerindo a possibilidade de entrada da Doença de Newcastle nas fazendas de avestruzes do Japão.

A avaliação de amostras de soro de avestruzes originadas de plantéis americanos, localizados em Ohio e Indiana, revelou que mais de 57% (93/211) dos animais apresentavam reação positiva na inibição da hemaglutinação para Doença de Newcastle (93 amostras do total de 211). Nenhum sinal clínico foi observado nos animais positivos na sorologia (LEY et al., 2000). Essas informações estão de acordo com as descrições feitas por HUCHZERMAYER (1997).

CONCLUSÃO

As amostras de soro de avestruz analisadas, provenientes de criatórios baianos e de criatórios paulistas, apresentaram anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle no ELISA realizado, mesmo sem ter sido feito qualquer relato de vacinação, reforçando a hipótese de que as avestruzes entraram em contato com vírus vacinal ou de campo.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, D.J. Newcastle Disease and other paramyxovirus infections. In: CALNEK, B.W. et al. **Diseases of poultry**. 9.ed. Ames: Iowa State University, 1991. p.496-519.
- ALEXANDER, D.J. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*) - a review. **Avian Pathology**, v.29, n.2, p.95-100, 2000. Disponível em: <http://pdfserve.informaworld.com/684011__713651153.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2007.
- ALEXANDER, D.J. Newcastle disease. **British Poultry Science**, v.42, p.5-22, 2001.
- ALEXANDER, D.J.; MANVELL, R.J. Country reports on avian influenza for 2002 based on responses to the questionnaire. In: ANNUAL MEETINGS OF THE NATIONAL LABORATORIES FOR NEWCASTLE DISEASE AND AVIAN INFLUENZA OF EU MEMBER STATES, 9., 2003, Brussels (Belgium) Arquivos de Medicina Veterinária . **Proceedings...** Belgium: D.J. Alexander. European Commission B-1049 russels, 2003. p.113-129.
- ALLWRIGHT, D. Diseases and other veterinary aspects. Viruses encountered in intensively reared ostriches in southern Africa. In: DEEMINS, D.C. (Ed). **Proceedings of improving our understanding of ratites in a farming environment**. Manchester: Oxford Print Centre, 1996. p.27-33.
- BURBANO, L.A. et al. Risk of introduction of Newcastle disease in Chile through import of ostriches. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.37, n.1, p.55-59, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2005000100008&lng=en&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em: 02 mar. 2007. doi: 10.4067/S0301-732X2005000100008.
- CADMAN, H.F. et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*). **Avian Pathology**, v.26, n.2, p.357-363, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079459708419218>>. Acesso em: 15 de mai. 2007. doi: 10.1080/03079459708419218.
- CHEN, J.P.; WANG, C.H. Clinical epidemiologic and experimental evidence for the transmission of Newcastle disease virus through eggs. **Avian Diseases**, v.46, n.2, p.461-465, 2002. Disponível em: <[http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0461:CEAEEF\]2.0.CO;2](http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1637/0005-2086(2002)046[0461:CEAEEF]2.0.CO;2)>. Acesso em: 24 de abr. 2007. doi: 10.1637/0005-2086(2002)046[0461:CEAEEF]2.0.CO;2.
- D'ÁVILA, Z.S. **Novos tempos, novos rumos**. abril/maio 2005. Disponível em: <<http://www.aepe.com.br/ac=read&nid=114>>. Acesso em: 20 jun. 2006.

- DORETTO JÚNIOR, L.; PAULILLO, A.C. Doença de Newcastle. In: ANDREATTI FILHO, R.L. (Ed). **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca. 2006. p.168-181.
- GREINER, M. et al. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v.185, n.1, p.123-132, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T2Y-3Y6PRCB-3X-4&_cdi=4931&_user=686342&_orig=browse&_coverDate=09%2F11%2F1995&_sk=998149998&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkzV&md5=316fa1f7eb6e9f43d88ef05ffb0fa222&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2007. doi: 10.1016/0022-1759(95)00121-P.
- HUCHZERMEYER, F.W. Animal health risks associated with ostrich products. **Revue Scientifique et Technique / Office International des Epizooties**, v.16, p.111-116, 1997.
- HUCHZERMEYER, F.W. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. **Revue Scientifique et Technique / Office International des Epizooties**, v.21, n.2, p.265-276, 2002.
- KOCH, G. et al. Detection of Newcastle disease virus-specific antibodies in ostrich sera by three serological methods. **Veterinary Record**, v.143, p.10-12, 1998.
- LEY, E.C. et al. Serologic survey of slaughter-age ostriches (*Struthio camelus*) for antibodies to selected avian pathogens. **Avian Diseases**, v.44, p.989-992, 2000.
- MAPA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. IN 2/2003. Acesso em: 17 jan. 2008.
- MENDES, A. Riscos e estratégias de prevenção da Influenza Aviária. **Revista Avicultura Industrial**. ed.1143, p.50-52, 2006.
- SAKAI, K. et al. Serological and virological studies of Newcastle disease and avian influenza in slaughter-age ostriches (*Struthio camelus*) in Japan. **Journal Veterinary Medical Science**, v.68, n.5, p.491-494, 2006a.
- SAKAI, K. et al. Antibody responses in ostriches (*Struthio camelus*) vaccinated with commercial live and killed Newcastle disease vaccines. **Journal Veterinary Medical Science**, v.68, n.6, p.627-629, 2006b.
- SALES, T.S. et al. Títulos de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle em três diferentes sistemas de criação avícola na região de Feira de Santana – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.4, p.386-393, 2007.
- SAMBERG, Y. et al. Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*): field case and experimental infection. **Avian Pathology**, v.18, p.221-226, 1989. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/03079458908418597>>. Acesso em: 01 mar. 2008. doi: 10.1080/03079458908418597.
- SWAYNE, D.E.; KING, D.J. Avian influenza and Newcastle disease. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.222, n.11, p.1534-1540, 2003.
- WILLIAMS, R. et al. Detection of antibodies to Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*) by an indirect ELISA. **Avian Diseases**, v.41, n.4, p.864-869, 1997.
- WILSON, M.B; NAKANE, P.K. Recent developments in periodate method conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: KNAPP, W. et al. (Eds.). **Imunofluorescence and related techniques**. Amsterdam: Elsevier-North Holland Biomedicas. 1978. p.215.
- XU, H. et al. The selection of ELISA cut-off points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TGROC) analysis. **Journal of Immunological Methods**, v.208, n.1, p.61-64, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(97\)00128-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(97)00128-2)>. Acesso em: 13 mai. 2008. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00128-2.
- ZHUHUI, H. 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. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/reprint/78/8/4176>>. Acesso em: 23 mai. 2008. doi: 10.1128/JVI.78.8.4176-4184.2004.